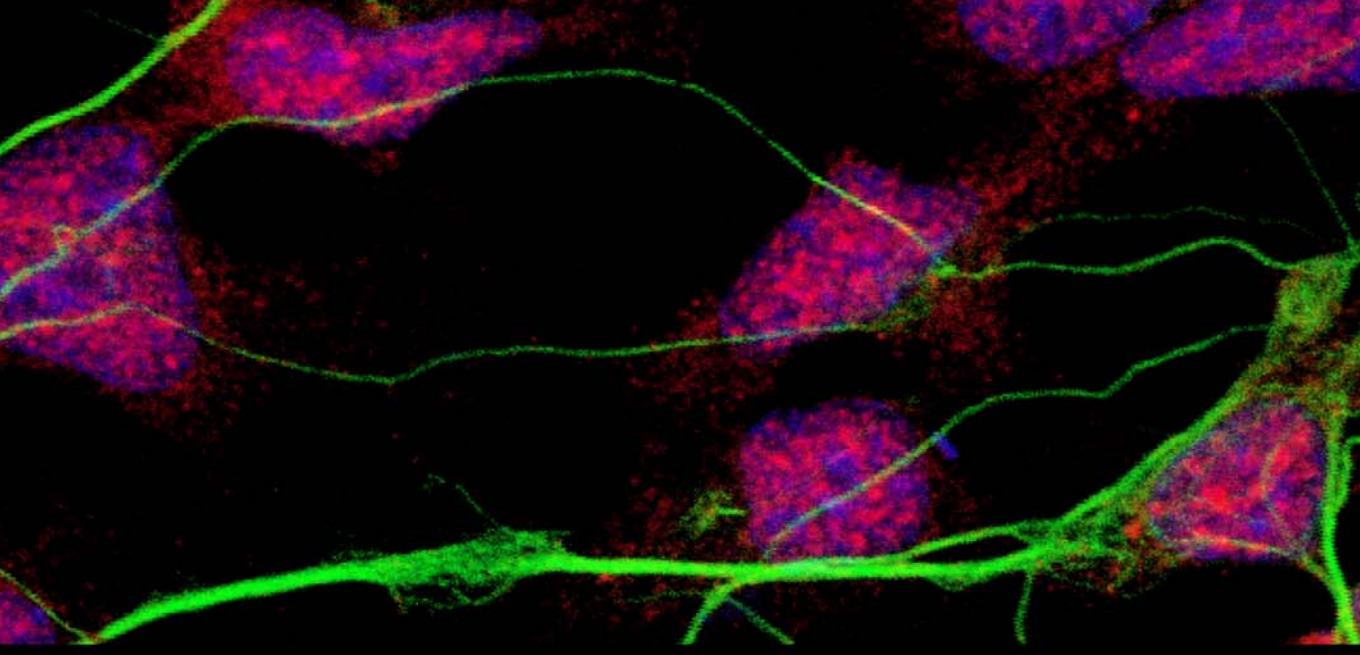
Implicación de las proteínas G y de la PKA en la regulación local de la vía de Sonic Hedgehog en el cilio primario

Mercedes Barzi Diéguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

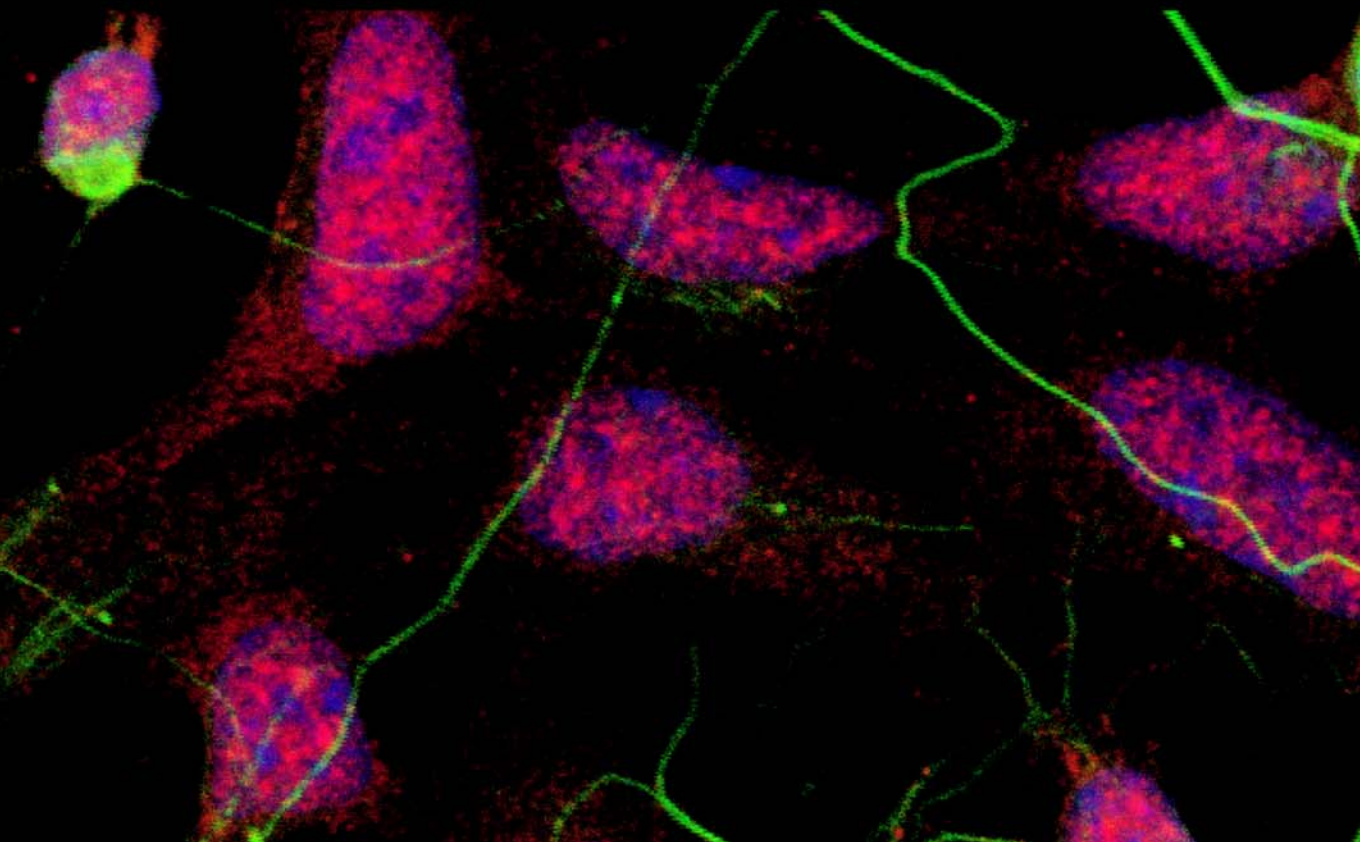
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Implicación de las proteínas G y de la PKA en la regulación local de la vía de Sonic Hedgehog en el cilio primario

Mercedes Barzi Diéguez

Junio de 2011



Implicación de las proteínas G y de la PKA en la regulación local de la vía de Sonic Hedgehog en el cilio primario

Tesis Doctoral Presentada por
Mercedes Barzi Diéguez

Barcelona, junio de 2011

UNIVERSITAT DE BARCELONA

IDIBAPS

Institut
D'Investigacions
Biomèdiques
August Pi i Sunyer

CSIC

CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

Departamento de Muerte y Proliferación Celular
Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Tesis doctoral presentada para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona, Programa de Doctorado de Biología y Patología Celulares (Departamento de Biología Celular, Inmunología i Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona).

Este trabajo ha sido financiado por proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia (MCI BFU2005-01599 y MCI BFU2008-024024BFI) y ha sido realizado mediante el soporte económico de una beca predoctoral del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

El tutor,

Dr. Carles Enrich Bastús
Profesor Titular de la Universidad de Barcelona (UB)
Facultad de Medicina
Departamento de Biologia Celular, Inmunología y Neurociencias

El director,

Dr. Sebastián Pons Fuxà
Científico Titular del CSIC-IDIBAPS
Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB)
Departamento de Muerte y Proliferación

La doctoranda,

María de las Mercedes Barzi Diéguez
Barcelona, 22 de junio de 2011

A mi Familia

"No existe signo más claro de locura que el de hacer lo mismo una y otra vez y esperar resultados distintos"

- Albert Einstein-

"Si no nos perdemos nunca, tampoco encontraremos otros caminos"

-Joan Littlewood-

Muchos de mis resultados fueron fruto del método del ensayo y error (y en algunas ocasiones, al revés):

"Yo no me he equivocado, lo que pasa es que he tenido diez mil ideas que no han funcionado"

- Benjamin Franklin-

"Equivóquese, equivóquese otra vez. Pero equivóquese mejor"

- Samuel Becket-

Agradecimientos

Durante estos años fueron muchas las personas que me ayudaron a elaborar esta tesis. Es difícil para mí limitarme en este apartado únicamente a las personas que han participado directamente en el trabajo de laboratorio o de escritura. Por ello, mis agradecimientos se extienden a familiares y amigos que me han ayudado, con su apoyo y amistad, en mi proyecto personal (que se ha visto reflejado en el profesional). Y como sé que la mayoría se leerá sólo esta parte, intentaré esmerarme con cada uno lo mejor que pueda. Así que pido mis disculpas de antemano si me alargo más de lo habitual, si me quedo corta con alguno o me olvido de alguien.

En primer lugar, quiero agradecer mi familia. A mi madre, por su gran apoyo en todos los sentidos, por su gran fortaleza y por habernos brindado la oportunidad de vivir algo distinto (a pesar de lo que ello supuso para todos). A mi papá, por sus poéticos mails y porque no deja de hacerme reír con sus creativas locuras y sus páginas "huevs". A Ignacio, por su gran paciencia catalana, por acompañar a mi madre en sus proyectos y porque logró superar con creces la ardua tarea de asumir el rol de padre. A todos mis hermanos simplemente por existir y en especial a Andrés, que me ayudó en el formato final de la tesis con mucho esmero y sin rezongar. A Wanda, la genia de la cocina que me alimenta tan bien. A mis abuelos Jorge y Beba, porque los quiero y los tengo presente siempre. Gracias Beba por lograr adaptarte a las nuevas tecnologías con el esfuerzo que eso supone para vos: por chatear conmigo de vez en cuando o por mandarme esos lindos mails informativos que me encanta recibir. Por mandar mails a gmail y contarme anécdotas tan graciosas como que "tu compu se llenó de microbios". A Chiri, por su gran oído y paciencia semanales. Porque me ayudaste a conocerme un poco más, a tomar importantes decisiones y a enfrentarme a difíciles retos personales. Gracias también por hacerme sentir como una más en tu hermosa familia, por fabricar tan lindos hijos y, en estos últimos días, por la corrección sintáctica que mi tesis tanto necesitaba.

A mi director de tesis Sebastián Pons, por haberme permitido realizar mi tesis en su laboratorio. Le agradezco mucho el haber confiado en mí y el haberme dado la libertad de crecer y de pensar por mí misma (y que en muy pocos otros jefes he visto). A su mujer, Elisa Martí, por esas maravillosas fotos de las *In situs* y por incluirme en la realización de uno de sus artículos. Por facilitarme también, durante todo este tiempo, una gran cantidad de plásmidos, anticuerpos, horas de confocal y millones de secuenciaciones (entre otras muchas cosas). A ambos, por su trato tan cercano y por organizar los famosos POMAS, concursos de ping pong, cenas en familia o tiroteos en el bosque. Gracias también por pasearme en barco y por dejar volar mi creatividad creando panes que parecían piedras lunares y permitirme ser protagonista de una verdadera guerra de tomates (y que, muy a mi pesar, quedé lejos de ganar!). Por todo ello y mucho más, les estoy muy agradecida. A su hijo Ginés, por ser uno de los pocos que se ríe de mis chistes malos; y a Amalia, por su gigante cartel de "cuidado con los controles" que siempre me hizo acordar de ellos (siempre que terminaba los experimentos, claro).

A mis compañeros de laboratorio con los que he compartido camino a lo largo de este proceso. En primer lugar a Rubén, al que le debo la mitad de mi tesis y mi futuro postdoc. Por su extremada paciencia en mis primeros pasos (sobre todo con mis constantes y repetitivas preguntas y mis grandes "pifiadas", algunas de las cuales sé que todavía le hacen reír). Por enseñarme a diseñar bien mis experimentos y analizar con un gran ojo crítico los resultados obtenidos. Por alegrarme con su humor, su gran creatividad e inteligencia (y por permitirme tomar prestadas unas cuantas figuras) Al "barbas", por nuestros buenos (y no tan buenos) momentos en el laboratorio. Por sus detalladas explicaciones y sus prácticas creaciones que tan buen resultado han tenido. Por la distribución de múltiples bromas o noticias por las paredes del laboratorio, que en muchas ocasiones me han sido mi único contacto informativo del mundo exterior. A Anghara, la chica "yeyé"sin cual el laboratorio ya se habría hundido y la mitad de mis experimentos no se hubieran realizado. Por aguantar mi carácter y mis estreses de último momento, por los múltiples favores que me has hecho (y me sigues haciendo) y por tener los buffers, los productos, los protocolos, les célules, les maxis, les minis, les digestiones etc,etc,etc.. TODO siempre a punto para tus mejores becarios (ejem). "Gracias for sharing withmigo" tantas y tantas otras cosas: por aguantar mis payasadas, los bailes tontos y los abrazos forzozos que tanto te gustan; por la técnica del FuGene y las bromas constantes, las sesiones de cine (con llantos inlcuídos) o por "malvivir" en el laboratorio. Por azorronar o enjaritarme de palabros que nunca logro recordar. Serás para mí la técnico de oro que siempre querré tener (de paso te confieso la ilusión que me haría que antes de que me vaya me entregaras de una vez la pipeta de oro que tanto me prometiste. Me la he ganado, no?). A Tony ("el Pisha"), por ser mi pollo preferido. Por tus aires sureños que tan bien le vinieron al grupo y porque tu humor andaluz y tu espontaniedad son la causa de las mejores risas del laboratorio. Por demostrarme tus alegrías (y tus enojos también) con tanta transparencia. Gracias por tu compañerismo y tu amistad. Has logrado que te vaya a extrañar mucho cuando me vaya. A Laura, "la Vuolo", por su acento esdrújulo que siempre me tienta y porque no olvidaré nunca el día que me la llegué a imaginar en el agua con una piragua. A las chicas que pasaron con sus prácticas por el laboratorio: Dorota, por los millones de contajes que ayudaron a reforzar mis resultados y a hacer que Sebastián confiara un poco más en mí; a Lale, por las extensas charlas del corazón durante las comidas; y Blanca, porque tengo fé en que estará a la altura de ocupar mi escritorio (yo diría que medimos más o menos lo mismo).

De los viejos fichajes de Elisa quiero agradecer especialmente a "la super pequeñita" Lidia su gran apoyo en mis inicios catastróficos. Y porque bajo esa apariencia de científica frickie hay una gran mujer con una extrema sensibilidad y que no dejó de sorprenderme con sus danzas del vientre, sus multi-tattoos y sus artes manuales. Estoy segura de que Aram será muy bueno en letras. A "iRobert" su gran simpatía y sus juegos de palabras que tanto me hacen reír. Por ser más fan que yo de Liniers (e incluso de mi hermano!) y porque el día de su tesis logró demostrarme ser la persona que más palabras por minuto pronuncia que conozco (y haciéndose entender perfectamente!). Espero que sigas alegrando mi paisaje feisbuquero con tu gran creatividad y que cuides de bien de bartolo (y de sus uñas!). Y a los becarios y postdocs más nuevos, por permitirme seguir siendo la pedigüeña de turno y por dejarme requisar material en cada una de mis visitas. A Susana, por facilitarme cDNAs e información constantemente; y a Ángeles, por su extremada eficiencia en obtener tubos neurales, y porque casi me hizo caer de la silla cuando me

dijo el factor de impacto de su paper (en el que estoy contentísima de haber participado).

A todos los becarios y técnicos del IIBB que mantienen un gran ambiente en el clan, tanto dentro y como fuera del centro y sin permitir que los "problemas superiores" interferan en ello. Por las casas rurales, las calçotadas a las que fui (y a las que no fui), las cervezas, todos los cafés de cenas de tesis a los que me apunté y todas las fiestas o celebraciones organizadas. Gracias a todos!

Quiero hacer especial mención a "los Suñol" porque el roce hace el cariño.. y viceversa! Por esos momentos compartidos de risas, penas, frío, calor, frío, frío (y más frío), discrepancias musicales, broncas, bailes, etc… A Sara, por ser mi sabinera preferida, la organizadora oficial de eventos (por cierto, espero que te lo curres para la fiesta de mi tesis) y la instauradora del cachondeo en el laboratorio. Y porque, aunque a ninguna de las dos nos guste mucho, las dos sabemos que nuestros carácteres se parecen bastante más de lo que nos creemos. A Aineta, la única "pseudoPons" de corazón habida y por haber. Aquella noia dispersa que fa "de tot" i amb la que he compartit molts dinars i xerrades metafísiques. Y porque, al ser partícipe de "tantxs movimientxs subversivxs", consiguió que hasta yo me metiera en la recuperación de plaza Catalunya! A Víctor, por su fino humor cuando está de humor, su siempre tan "agradable música" y sus chistes que no siempre ganan concursos. A su Elena, por esas clases de música tan interesantes y… porque es que me cae de maravilla, vamos! A los que se fueron o pasaron por el laboratorio: Zoila y Iolanda, Daniel, Rita, Fran (mi "gaita" y su humor negro) y Marcelo, por dejar que mi sueño de ser una " teacher" se cumpliera. A Mireia, por sus grandes detalles silenciosos, las agradables charlas en los rincones del centro, su gran sensibilidad y porque siempre me hace acordar que, ante todo, somos personas y esto es un trabajo.

A nuestros vecinos "los Pacos" por llenar los pasillos de extrañas melodías y en especial a Laia y Mersheditas, mis irremplazables compañeras de viajes isleños a las que tanto torturé con mis sesiones fotográficas. Por esos pulpos tomando sol, ese raki que no tan bien nos sentó y porque el despertar en "Casa Nostra" con el ruido del agua bajo los pies no tiene descripción. A Laia en concreto, per les nostres xerrades hispano-catalanes amb les que tan bé ens entenem i per les aterrades a Montjuic amb accent català (ho sento, però això ho havia d'aclarir!). A Noemichu por los momentos de desencuentros encontrados, por la convivencia en familia y por haberme hecho tía postiza del mulatito de piel y ojos más hermosos de toda Barcelona.

A todas las personas con las coincidí al comenzar mi tesis y que se fueron del centro dejando una gran huella. A la niña Iraola (Susana "la gusana"), porque la amistad entre cascabelito y boqueroncito logró trascender las puertas del 631. A Lucila, mi corrector@ enzimátic@ que no para de "kikear" y que aunque dice que quiere, todos sabemos que en realidad no se quiere ir. Por sus favores poco favorables, nuestro coincidente humor simple, nuestros "In Treatments" enfermizos y nuestras salidas nocturnas. Y porque espero que después de nuestras respectivas partidas nos podamos encontrar frente al Nahuel Huapi con doce uvas y una copa de cava en mano. A Olga, por esos sofocos provocados por ciertos desodorantes y porque su contagiosa risa brilló por su ausencia durante mucho tiempo en el laboratorio. A Eli, porque es una dulce.

A Joan, porque a pesar de la distancia sigue piropéandome a través del ciber espacio. A Raúl, porque sus historias (sigilosas allá en "las jotas") siempre fueron buenísimas. Y por presentarme a mis lacayos de escalada (Arnau, Pere, Josep "el culilindo", Esquius i Aram, con los que hice muy buenas migas y que abrieron la puerta a muchas otras personas). Abraham, "el pulpito", porque su humor espontáneo es inigualable y sus payasadas (no tanto sus chistes) ganarían con gran ventaja el linchis de oro. Porque con ellos logró hacerme caer al suelo de la risa. Gracias también por esa Fête de la musique de la que tan buenos recuerdos tengo. A Santi, porque fue un gusto escuchar sus discursos y por sus (aún) respuestas instantáneas a cada una de mis dudas o urgencias médicas telefónicas. Gracias por los arcos y las flechas, los viajes en tren en los que coincidimos y todos los detalles que tuviste conmigo. En conjunto: a Rubén, Santi y Abraham, porque dudo que ese excéntrico trío de personalidades vuelva a alinearse y cruzarse de nuevo en mi carrera profesional. Por esas interesantísimas charlas de ciencia (y de lo que no lo es) y ese fino humor que fue la causa de las mejores risas en los mediodías de mis primeros años de tesis.

A todas las personas del centro que con su simpatía lograron robarme más de una sonrisa: Leo, Laura, Cedric, Nacho, Petar, Joanna, Unai, Anna Serra, Marco, Guido (porque matarte fue lo más divertido de ese fin de semana), Gemma, Sabrina, Raquel, Oriol (por financiarnos cafés) Lupe, Silvia y Rocío (porque creo que es la única que respeta mi vocación de jefa). Y a aquellas con las que pude entablar una buena amistad: en especial a Emma, por abrirme su corazón en cultivos y por las largas charlas vegetarianas que tanto nos gustan; a mi "homóloga-hormidóloga" Anna, por esos mensajes en clave y los ciberparéntesis que tan bien me fueron durante la escritura de mi tesis. Y porque realmente creo que haríamos un buen equipo: yo los clonings y tú los bichos, no lo olvides! Y "Eeeelsklin", porque fue realmente un gusto conocerte un poco más este último año. Y, por supuesto, el compartir asaditos en tu terraza y encuentros con "Bombita" y amigos, entre los que destaco a Martín y a su buen gusto musical.

A todas aquellas personas que me han facilitado material para mis experimentos o me han ayudado con algún aparato (y que no son pocas!). Las que mi memoria fugaz me permite recordar: Tomàs, Esther Pozas, Míriam, Marina, Lluís, Ramón Trullàs, Pablo García, Carmen García, Izabel ("la bolita"), entre muchas otras que seguramente me estaré dejando. Gracias también a todas ellas. A las técnicos de confocal que ah resolvido mis problemas técnicos con gran paciencia: Lidia, Mònica, Maria, Anna y Elena. A Eva por su buen trabajo con la granja de ratas, ratones, gallinas y conejos.

A todo el personal del centro que nos facilitan el trabajo: a los miembros de recepción y secretaría, a quienes yo les complico el suyo con mis facturas erróneas cada vez que puedo; a Eduard, porque siempre se "desvive" por ayudarnos; a todas las señoras de la limpieza que están o han pasado por el centro, en especial a mi Loli (la famosa mujer de la crema de manos e inspiración de mis cantares) y a Montse, por sus consejos anticales y antigrasa que tan bien me fueron; y a las eficientes secretarias Montse Roig y a María Jaramillo, que me ha ayudado varias veces con mis cositas aunque no le correspondiera y el estrés la superara.

A Albert Quintana, porque si no fuera por él no hubiera empezado un doctorado. Gracias por mostrarme que en un laboratorio, entre esas largas horas de trabajo puede uno cantar, tanguear y, sobre todo, reír mucho. Gracias también por tus consejos desde la distancia.

A mis grandes amigos Marc, por su "rechinar de dientes nocturno"; Arantxa (y el grupo de Sabadell), por su rica pastelería y porque el vínculo creado entre nosotras es muy difícil de romper; Noemí, por esos viajes en autobús, horas de estudio y viajes salados; y Diana la andorrana, por mimarme tanto después de mis clases y escuchar tan atentamente mis historias. A Yoyo, Mònica y Javi por esos vinos y risas en "A casas Portuguesas". A Tonuzzu, por nuestros encuentros yóguico-natatorios y por las lindas e informativas charlas que les siguen en los desayunos. A Nacho, por esas hermosas fotos, esas apuestas y promesas no siempre cumplidas y por lo mucho que me cuida cuando puede. A Paul por las historias y preguntas de sus largos y tendidos mails. Por su gran fé en mí y por quererme tanto haciendo yo tan poco. Y porque espero que cuando vengas de estancia a Barcelona cumplas con tus palabras, saques a Colón y me pongas a mí en su lugar de una vez! A todos los del grupo de argento-alemanes (que son muchos), por hacerme sentir como en casa estando tan lejos de mi tierra. Por esas inolvidables fiestas con danza del vientre y tango, las clases de técnica o pilates, y los buenos encuentros con mate, empanadas y guitarreo. Por esas charlas psicoanalíticas y ese sentido metafórico que tanto me gustan. A todos mis amigos bolsonenses que en la distancia me siguen quierendo y a los que están o han vivido en algún momento acá. Porque nos une un lugar mágico y único, que espero siga mantiendo su esencia. A July, por su constante amistad a distancia y por presentarme a Mariana. A ella, principalmente porque la quiero mucho y por la tranquilidad que me da saber que está siempre ahí. También por todos los viajes y momentos que compartimos y por incluírme en sus planes veterinarios dándome a conocer a mucha gente linda. Por adoptarme, junto con Ricart, en incontables cenas, fiestas de barrio, sesiones "padrinastras" y dejarme ser "la jetas" de turno en las insuperables (aunque escasas, todo hay que decirlo) paellas domingueras. A ambos, porque sé que aunque esté lejos, Lisa va a crecer sabiendo quién soy.

Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
AKAP	A Kinase Anchoring Protein
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico
Ci	*Cubitus Interruptus*
CKI	Casein Kinase I
Cos2	Costal 2
C-PKA	Subunidad catalítica de PKA
DBA	Dibutiril AMPc
FRET	Förster/Fluorescence Resonanse Emission Transference
FSK	Forskolin
Gli	Glioma asociated oncogene
GPCR	G protein Coupled Receptor
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
GTPasa	Actividad de hidrólisis de GTP
Hh	Hedgehog
IFT	Intraflagelar Transport
Kif3A	Kinesin intraflagelar 3A
Kif3B	Kinesin intraflagelar 3B
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
N-Myc	Avian myelocytomatosis viral related concogene neuroblastoma derived
PDE	Phosphodiesterase
PI3K	Phosphoinositide 3 Kinase
PLC	Phospholipase C
PKA	Protein Kinase A
pCREB	Phosfo-CREB (cAMP Response Element-Binding)
PNGCs	Progenitores neuronales de células granulares de cerebelo
Ptc(h)	Receptor Patched (humano)
PTX	Pertussis Toxin
RII-PKA	Subunidad reguladora tipo II de PKA
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
Sufu	Supressor of Fused
TEM	Transmission Electron Microscopy (microscopía electrónica de transmisión)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL 25

El CEREBELO 26

Introducción 26

División anatómica del cerebelo 27

División funcional del cerebelo 27

Filogenia del cerebelo 28

Histología y conectividad del cerebelo 28

Desarrollo embrionario del cerebelo 30

- Neurulación Primaria 31
- Aparición de las vesículas encefálicas 31
- Delimitación entre mesencéfalo y metencéfalo 31
- Formación de los labios rómbicos 32
- Formación de las capas germinales del cerebelo 33
- Migración de las células granulares y maduración del cerebelo 35

SONIC HEDGEHOG 35

Introducción 35

Función de Shh 35

Producción, procesamiento y secreción de Shh 36

Ruta de señalización mediada por Shh 36

Ganancia o pérdida de función de Shh 38

RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G 39

Introducción 39

Estructura de los GPCRs 40

PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS 41

Introducción 41

Activación de las proteínas G a través de GPCR 41

Terminación de la señalización mediada por GPCRs 42

Clasificación y función de las proteínas G 43

Señalización mediada por el complejo Gβγ 45

Regulación de los niveles de AMPc 46
Producción de AMPc: Las Adenilato Ciclasas 46
Degradación de AMPc: Las Fosfodiesterasas 47

PROTEÍNA QUINASA A 47
Introducción 47
Función, Estructura y Activación de PKA 48
Estructura, dominios y activación de la subunidad Catalítica 48
Estructura, dominios y activación de la subunidad Reguladora 49
Expresión restrictiva de las holoenzimas tipo I y tipo II de PKA 50
Señalización de PKA en compartimentos subcelulares. Las AKAPs 50
Dominios de interacción entre AKAPS y subunidades R 50
AKAPs y el control local de la producción de AMPc 53
Localización intracelular específica de las AKAPs 54
Mutantes de PKA y su relevancia en la vía de Hh 54

EL CILIO PRIMARIO 55
Cilios y Flagelos. Introducción general 55
Estructura, Clasificación y Función de los Cilios 56
Estructura básica de los cilios 56
Clasificación y Función de los cilios 56
El ciclo celular, el centriolo y el cilio primario 59
La ciliogénesis 60
El transporte intraflagelar 61
Transporte anterógrado: quinesina 2 y complejo B 63
Transporte retrógrado: dineína 1b citoplasmática y complejo A 63
Regulación del IFT 65
Transporte selectivo de moléculas al compartimento ciliar 66
Defectos en el cilio primario. Las ciliopatías 68
El cilio primario y la vía de señalización de Sonic Hedgehog 70

OBJETIVOS 75
Objetivo General 76
Objetivos concretos 76

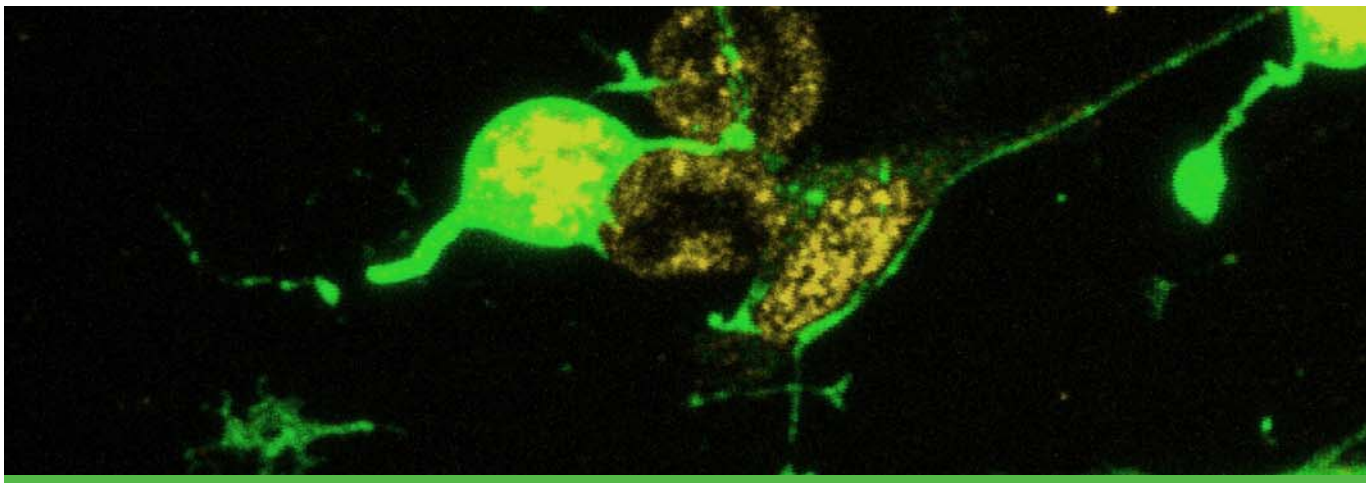
MATERIAL Y MÉTODOS 77
Cultivo primario de células granulares de cerebelo 78
Transfecciones transitorias 78
Preparación de plásmidos 79
Anticuerpos y reactivos 80
Ensayos de proliferación y medición de los niveles de cAMP 80
Inmunofluorescencia y análisis cuantitativo de las imágenes 81
Western Blot 81
Cuantificación del mRNA por RT-PCR semicuantitativa 82
Hibridación *In Situ* 82
Análisis estadístico 82

RESULTADOS 83
Resumen del artículo 1 84
Artículo 1 85
Resumen del artículo 2 97
Artículo 2 98

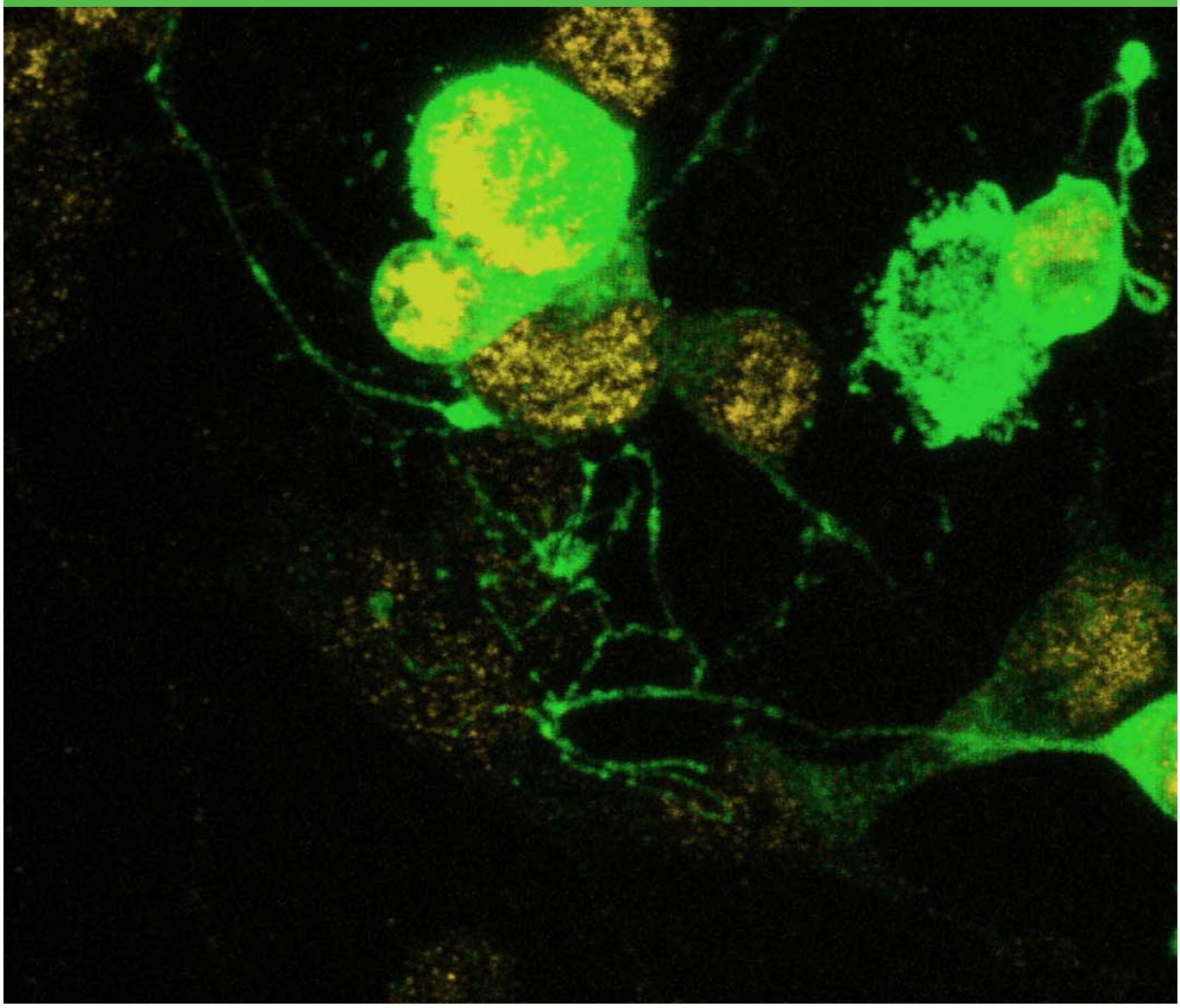
DISCUSIÓN GENERAL 111
Señalización de Smoothened a través de proteínas G inhibitorias 112
Especificidad de Smo por miembros de la familia Gαi/o 113
Regulación de la señal de AMPc mediada por Shh en el entorno del cilio primario 115
Implicación de las AKAPs en la localización de PKA en la base del cilio Primario 118
Papel dual de la PKA en la señalización de Hh 120
Gli2/3 y el cilio primario 124
Modelo resumen 126

CONCLUSIONES 127

BIBLIOGRAFÍA 129



INTRODUCCIÓN GENERAL



EL CEREBELO

Introducción

El cerebelo (del latín *cerebellum*, o cerebro pequeño) es la región del cerebro que poseen los vertebrados y cuya función es la de integrar las vías sensitivas y motoras. Es un órgano único y su tamaño depende del grado evolutivo de la especie. En humanos se ubica en la porción posterior de la cabeza, sobre el tronco encefálico. Presenta una porción central e impar, el vermis, y otras dos porciones mayores que se extienden a ambos lados, los hemisferios (Figura 1). Se apoya en tres pares de pedúnculos cerebelosos (superior, medio y inferior), que lo unen con el resto del cerebro. Existen una gran cantidad de haces nerviosos que conectan el cerebelo con otras estructuras encefálicas y con la médula espinal.

En mamíferos, el aumento de superficie de la corteza cerebelar provoca la formación de unos plegamientos que, en los primates, se llega a expandir hacia los lados formando los hemisferios. Alcanza el máximo desarrollo en el hombre, y aunque sólo representa el 10% del volumen encefálico, contiene el 50% de las neuronas totales.

División anatómica del cerebelo

En el cerebelo maduro de humanos, los plegamientos de la corteza cerebelosa generan un gran número de fisuras transversales, dos de las cuales son más profundas y permiten delimitar morfológicamente el cerebelo en tres lóbulos principales: el *lóbulo anterior*, situado en la parte más rostral; el *lóbulo posterior*, que se separa del anterior por la fisura primaria; y el *lóbulo floculonodular*, que ocupa la posición más caudal y que se separa del posterior por la fisura posterior (Figura 2) (Martin J.H, 2003).

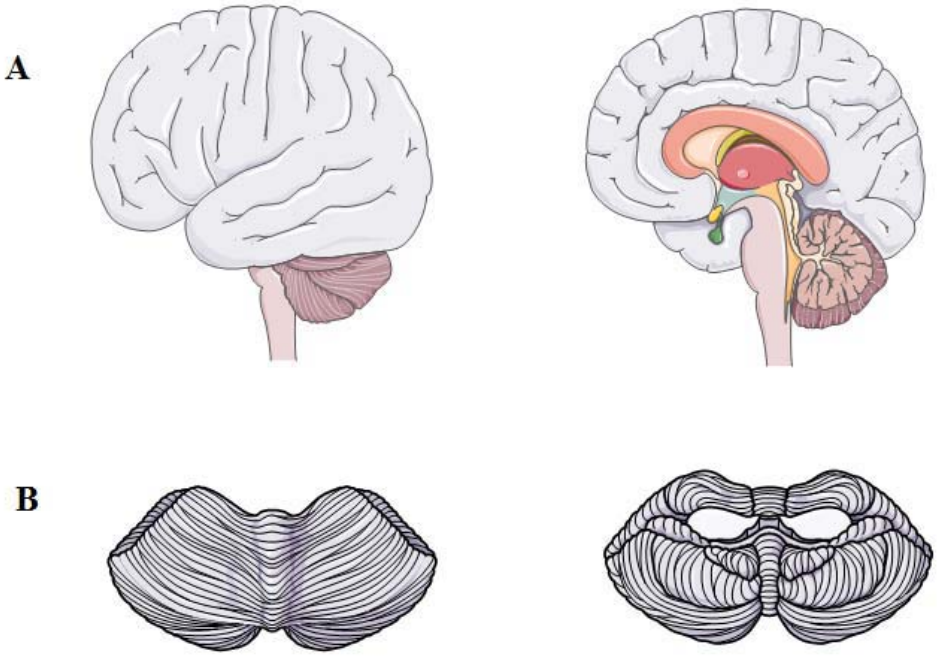


FIGURA 1. A Visión lateral (izquierda) y corte sagital (derecha) del cerebro humano en el que se puede observar el cerebelo en color rosado. B visión dorsal (izquierda) y ventral (derecha) del cerebelo.

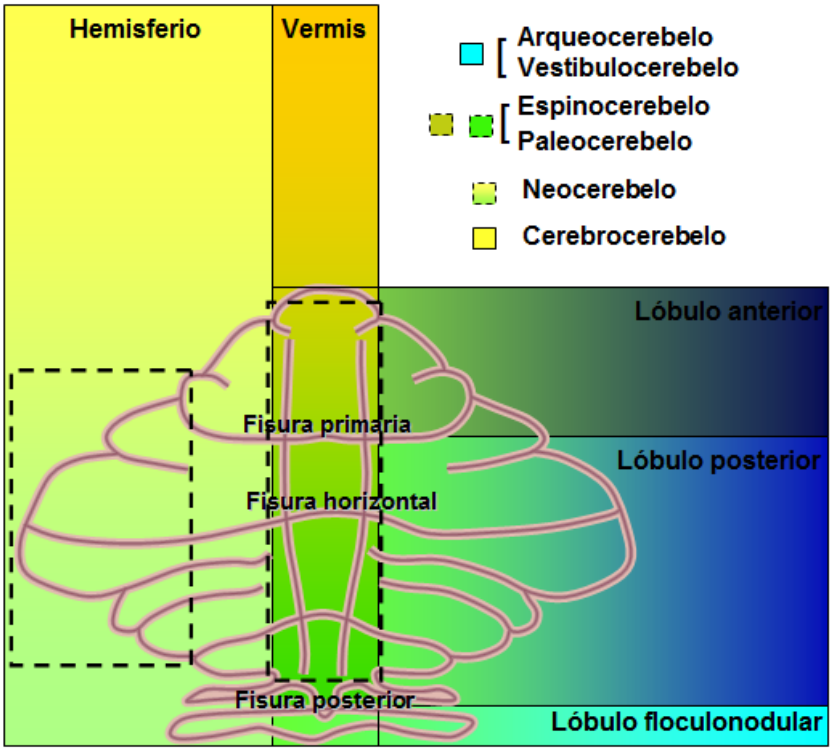


FIGURA 2. Cerebelo desarrollado en el que se distinguen las diferentes fisuras y los lóbulos que éstas determinan. Se pueden observar, además, las regiones funcionales y filogenéticamente distinguibles.

División funcional del cerebelo

Se pueden distinguir en el cerebelo tres áreas diferentes dependiendo de la función que realizan y de las conexiones que establecen. El *vestibulocerebelo* se corresponde con el lóbulo floculonodular y recibe aferencias de la corteza visual y de los canales semicirculares del sistema vestibular y controla, por tanto, los movimientos oculares y el equilibrio corporal. El *espinocerebelo* se sitúa en la banda vermiana y las bandas paravermianas de la corteza cerebelosa y modula la actividad de las vías motoras aferentes que parten de la corteza cerebral y del tronco del encéfalo hacia la médula espinal, controlando así los movimientos de las extremidades y del tronco. Por último, el *cerebrocerebelo*, que se sitúa en la zona lateral de la corteza (en los hemisferios cerebelosos), participa en algunas funciones cognitivas (como la percepción espacial, el procesamiento lingüístico y la modulación de las emociones), el aprendizaje motor y la planificación general de actividades motoras secuenciadas (Figura 2).

Filogenia del cerebelo

Desde el punto de vista filogenético, el cerebelo puede dividirse en tres porciones, cada una de las cuales posee cierta identidad funcional. El *arqueocerebelo* es la parte de cerebelo evolutivamente más antigua y, en los vertebrados primitivos, se corresponde con el único folio presente. Se sitúa en el lóbulo floculonodular y tiene una gran correspondencia con el vestibulocerebelo.

El *paleocerebelo* es el siguiente paso evolutivo y tiene cierta correspondencia funcional con el espinocerebelo. La porción más moderna de todas, el *neocerebelo*, está formado por casi la totalidad del lóbulo posterior y se identifica con el cerebrocerebelo, ya que recibe aferencias principalmente de la corteza cerebral. El gran desarrollo que representa el neocerebelo en primates va en paralelo al desarrollo de la corteza cerebral.

Histología y conectividad del cerebelo

La superficie del cerebelo se encuentra llena de fisuras y de surcos producidos por los plegamientos que le permiten aumentar su superficie total hasta unos 500 cm2. Debido a éstos, la visión del cerebelo en un corte sagital recuerda a un árbol, por lo que clásicamente se le llamó árbol de la vida o *arbol vitae* (Figura 3A). En su interior, el cerebelo presenta una zona de *sustancia blanca* formada por haces axónicos de neuronas mielínicas rodeada por la *corteza cerebelosa*, una zona externa de *sustancia gris* formada por cuerpos neuronales y sus prolongaciones amielínicas. En el interior de la sustancia blanca se encuentran los cuatro pares de núcleos de sustancia gris, denomindados *núcleos profundos*. De mediales a laterales se distinguen: los *núcleos fastigiales* (conectados con el arqueocerebelo), los *núcleos globosos y emboliformes* (que reciben fibras del paleocerebelo) y los *núcleos dentados* (relacionados con el neocerebelo y conectados con la corteza cerebral).

Una vez el órgano se desarrolla, la corteza adquiere una organización celular muy uniforme y con las neuronas dispuestas en capas bien definidas: la *capa granular interna*, la *capa de las células de Purkinje* y la *capa molecular* (de más interna a más externa) (Figura 3C). Esta organización es prácticamente idéntica en todos los vertebrados y hace que las conexiones nerviosas sean relativamente fáciles de estudiar (Haines D.E, 2008).

La capa granular contiene unos 50.000 millones de somas de *células granulares* (Figura 3B i). Éstas són neuronas glutamatérgicas (excitadoras) pequeñas, con escaso citoplasma y un núcleo que se tiñe intensamente y que le confiere a la capa la apariencia granulosa. Contienen de cuatro a seis dendritas cortas y un axón principal que parte hacia la capa más externa donde se bifurca y da lugar a las denominadas fibras paralelas que pueden alcanzar una longitud de hasta 2 o 3 mm. En ella también se encuentran las *células de Golgi*, GABAérgicas o inhibitorias, que contactan con las células granulares. El siguiente estrato se compone por una monocapa de *células de Purkinje*, también GABAérgicas y de tamaño superior a las granulares (Figura 3B ii). De la parte apical de su soma parte un grueso tronco dendrítico con múltiples ramificaciones que se extiende hacia la capa superior, la capa molecular. De la parte inferior del soma surge un único axón que proyecta hacia el interior y que llega a alcanzar la sustancia blanca y se dirige a los núcleos cerebelosos y vestibulares profundos. La capa molecular destaca por la escasa presencia de somas neuronales y por contener, en cambio, una gran cantidad de axones de las células granulares y de los árboles dendríticos de las células de Purkinje. A través de las fibras paralelas, cada célula granular puede contactar con unas 50 o 100 células de Purkinje y éstas a su vez pueden recibir impulsos de unas 200.000 o 300.000 fibras paralelas. En esta capa también se encuentran las *células estrelladas*, más externas, y las células en cesta (Figura 3B

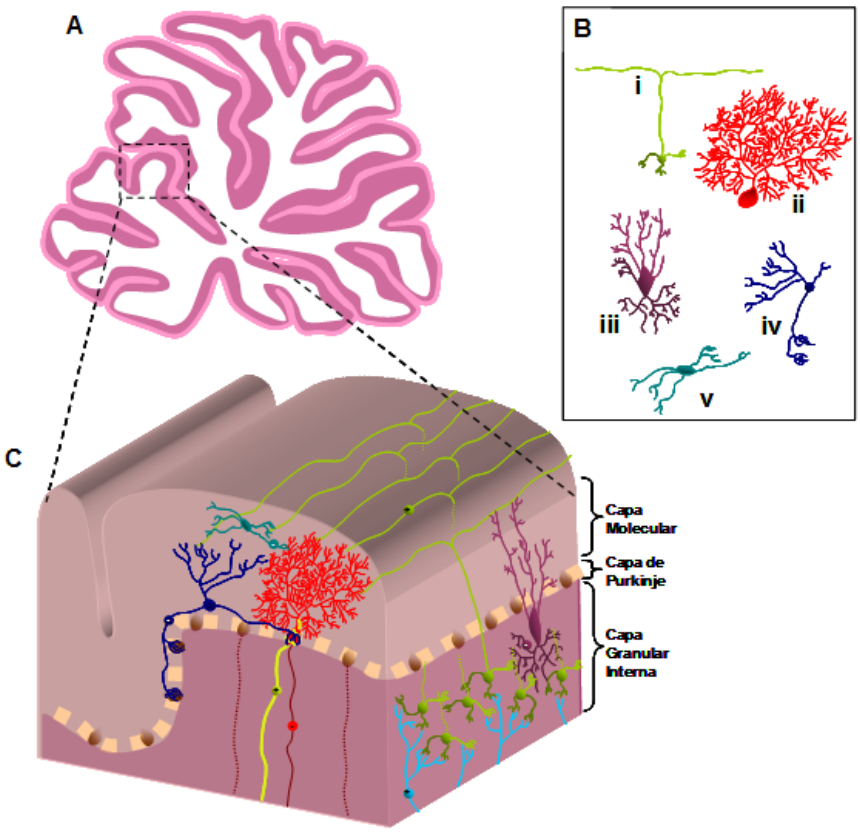


FIGURA 3. Esquema de la corteza cerebelosa y las células que la componen. A. Corte sagital de un cerebelo con su apariencia de "arbol vitae". En el interior se aprecia la sustancia blanca (color blanco) rodeada de la sustancia gris (de color rosa). B. Tipos de células que se encuentran en la corteza cerebelosa: i) células granulares de cerebelo (CGC); ii) células de Purkinje (CP); iii) células de Golgi; iv) Células en cesta; y v) células estrelladas. C. Detalle de un corte sagital de un cerebelo maduro donde se aprecian las tres capas de la corteza cerebelosa, las sinapsis activadoras o glutamatérgicas (+) y las inhibitorias o GABAérgicas (-). Las fibras amarillas representan a las fibras trepadoras mientras que las celestes corresponden a las musgosas.

iii, iv). Ambas son GABAérgicas y pueden contactar con las células granulares y con el árbol dendrítico de las células de Purkinje. Las células en cesto, como su nombre indica, recubren a sus células diana para inhibirlas en una estructura que recuerda a un cesto (Figura 3C).

La sustancia blanca cerebelosa, situada por debajo de la corteza, está compuesta por los astrocitos y los oligodendrocitos productores de mielina junto con el conjunto total de fibras. Las diferentes partes del cerebelo se comunican entre sí por las *fibras intrínsecas*, mientras que se conecta con el resto del sistema nervioso a través de las *fibras extrínsecas*, que pueden ser *eferentes* o *aferentes*. Las primeras parten del cerebelo para controlar las vías motoras descendentes y se corresponden con los axones de las neuronas de Purkinje, las segundas provienen de otras partes del sistema nervioso y entran en el cerebelo a través de las vías motoras y sensitivas (a excepción de la olfactoria). Hay dos clases de fibras extrínsecas aferentes: las *fibras musgosas* y las *trepadoras*, ambas glutamatérgicas o excitadoras. Las fibras musgosas recogen información de prácticamente todo el sistema nervioso (los ganglios, los núcleos vestibulares, la médula espinal, la formación reticular, los núcleos del puente e incluso de la

corteza cerebral) y proyectan colateralmente a los núcleos profundos del cerebelo y hacia la corteza cerebelar, donde contactan con las células granulares y las células de Purkinje. Las fibras trepadoras provienen del núcleo olivar inferior y en su recorrido proyectan hacia los núcleos profundos, atraviesan la capa granular y alcanzan la siguiente capa, donde cada fibra se ramifica en torno al árbol dendrítico de las células Purkinje. Cada célula trepadora puede contactar con 5 o 10 células Purkinje y realizar unas 300 sinapsis por neurona.

Una vez la información llega a la corteza cerebelosa por las fibras aferentes ésta la procesa y, a través de sus vías intrínsecas, la envía a los núcleos profundos por medio de los axones de las células de Purkinje. La información será nuevamente procesada y podrá partir en dirección ascendente hacia el tálamo y la corteza cerebral, o en dirección descendente hacia la médula espinal.

El circuito funcional del cerebelo está constituído por dos arcos, el *principal* o *excitador*, que pasa por los núcleos profundos, y otro *secundario* o *inhibidor*, que pasa por la corteza cerebelosa y que regula al arco principal. El arco principal o excitador se compone de las ramas colaterales de las fibras musgosas y trepadoras que excitan, mediante el neurotransmisor glutamato, a las neuronas de los núcleos profundos. Desde éstos pueden enviarse, o bien señales inhibitorias al núcleo olivar inferior, o bien señales excitatorias a otros centros nerviosos. Todas ellas salen del cerebelo a través de los pedúnculos cerebelares. El arco secundario o inhibidor está constituído principalmente por las células de Purkinje, que ejercen su acción inhibitoria sobre los núcleos cerebelosos y vestibulares. En el árbol dendrítico de las células de Purkinje convergen a su vez señales excitatorias e inhibitorias. Las de tipo excitarorio provienen de la estimulación por contacto con las fibras trepadoras (estimulación directa) o por medio de las fibras musgosas que contactan con las células granulares que, mediante sus fibras paralelas, hacen sinapsis con las células de Purkinje (estimulación indirecta). Según el tipo de estímulo excitatorio, las células de Purkinje generarán un potencial de acción u otro. Este potencial está a su vez regulado por las señales inhibitorias que pueden provenir de forma indirecta desde las células de Golgi o por contacto directo con las células estrelladas y con las células en cesta. Éstas últimas son estimuladas a su vez por las fibras paralelas de las granulares, previamente activadas por las fibras musgosas. Mediante este circuito inhibidor se regula la actividad de las células de Purkinje por la acción directa de las fibras trepadoras. Las células de Golgi, en cambio, son estimuladas por las fibras paralelas de las granulares y por las fibras musgosas ejerciendo su efecto inhibidor sobre las dendritas de las propias granulares. Se genera así un circuito de retroalimentación negativa sobre las células granulares que regulará indirectamente la activación de las Purkinje. (Josep et al., 2004).

Desarrollo embrionario del cerebelo

El cerebelo es una de las primeras estructuras del cerebro humano que empieza a diferenciarse y una de las últimas en alcanzar su madurez. Su organización celular continúa cambiando hasta varios meses después del nacimiento.

Neurulación primaria

Al igual que la piel y el resto de estructuras del sistema nervioso central, el cerebelo deriva de la capa ectodérmica del disco germinativo trilaminar. El encéfalo se forma durante el desarrollo embrionario a partir de un engrosamiento de un grupo de células localizadas en el ectodermo dorsal y medial, que se denomina *placa neural* y que se extiende rostrocaudalmente en el embrión. Las partes más laterales de la placa neural se elevan en forma de pliegues y la parte más central se hunde formando una invaginación.

Conforme avanza el desarrollo, los pliegues elevados se acercan y se fusionan formando un tubo cerrado, denominado *tubo neural,* y que queda en el interior del embrión.

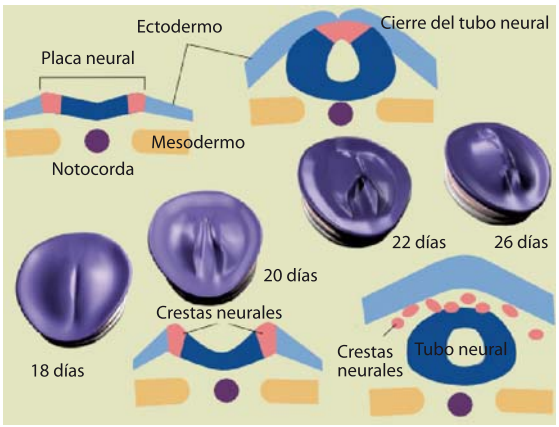


FIGURA 4. Esquema del proceso de neurulacion primaria en un embrión humano. (imagen obtenida de internet: http: // webs. uvigo. es/ mmegias/ 2-organos-a/ guiada_o_a_01snc . php).

Aparición de las vesículas encefálicas

En las fases más tempranas del desarrollo embrionario, el tercio cefálico del tubo neural presenta tres dilataciones denominadas *vesículas encefálicas primarias* y que permiten dividirlo en tres segmentos distintos: el *prosencéfalo* o cerebro anterior, el *mesencéfalo* o cerebro medio, y el *romboencéfalo* o cerebro posterior, que se continúa con la médula espinal hacia porciones más caudales del embrión.

En humanos, alrededor de la quinta semana del desarrollo embrionario, se aprecian cuatro *vesículas encefálicas secundarias* que aparecen por división de las primarias: el *telencéfalo* y el *diencéfalo* (derivados del prosencéfalo), el *metencéfalo* y el *mielencéfalo* (derivados del romboencéfalo), compartimentos cerebrales que se encuentran en todos los vertebrados. El metencéfalo (la porción más cefálica) dará lugar al cerebelo y al puente o protuberancia, mientras que del mielencéfalo se originará la médula oblongada, más comúnmente conocida como bulbo raquídeo. El límite entre estas dos porciones está marcado por la curvatura protuberencial o póntica.

Delimitación entre mesencéfalo y metencéfalo

Tanto el mesencéfalo como el metencéfalo contribuyen en el desarrollo del cerebelo y su delimitación es crítica para que el desarrollo se dé correctamente. El límite se establece por el patrón de expresión de dos genes que se inhiben recíprocamente: *Otx2* -que se expresa en el prosencéfalo y el mesencéfalo- y *Gbx2* - que se expresa en la parte más rostral del romboencéfalo (Li et al., 2001). La supresión de Otx2 en ratón evita la formación del mesencéfalo y produce una extensión anómala del metencéfalo que da lugar a una hiperplasia del cerebelo. La deleción de Gbx2, por el contrario, tiene un efecto opuesto y evita la formación del cerebelo en el ratón mutante (Acampora et al., 2001). En la zona fronteriza empiezan a secretarse los factores FGFs (Fibroblast Growth Factor) y Wnt (Wingless), necesarios para la delimitación, la diferenciación y el modelaje de ambas zonas (Hidalgo-Sanchez et al., 1999).

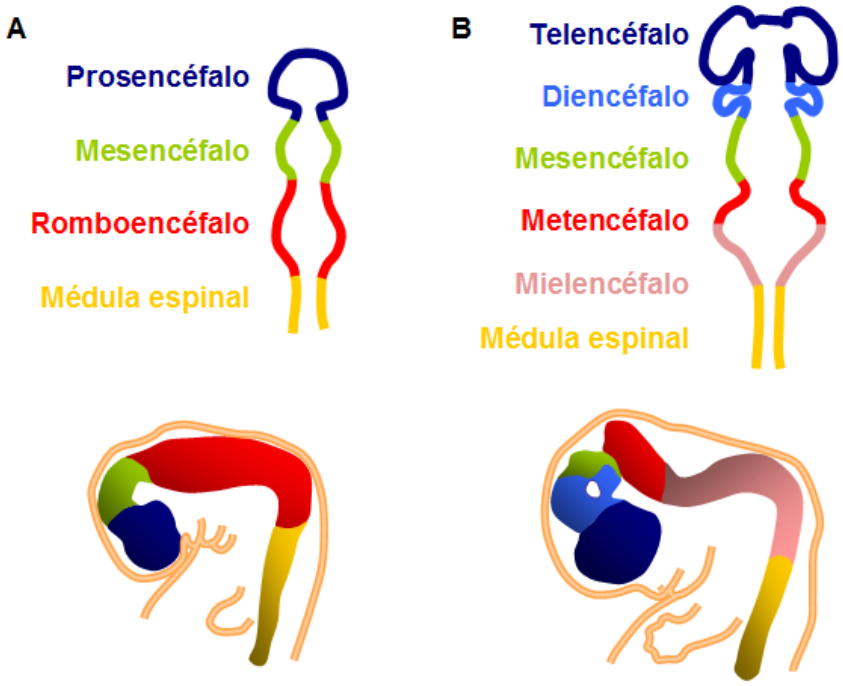


FIGURA 5. Esquema representativo de las vesículas encefálicas primarias (A) y secundarias (B) del desarrollo embrionario. Visión dorsal de las mismas (arriba), y su correspondiente visión lateral en el embrión (debajo).

Formación de los labios rómbicos

Conforme avanza el desarrollo, en el neuroepitelio del tubo neural se produce una fase de proliferación que da lugar a las tres capas características: la *capa neuroepitelial*, la *capa del manto* y la *capa marginal* (de más profunda a superficial). Al final de la cuarta semana de gestación empiezan a agregarse las neuronas del tubo neural en desarrollo y, en consecuencia, se forman dos columnas celulares: las placas alares (dorsales) y placas basales (ventrales), separadas dorsal y ventralmente por estrechamientos agudos del tejido neural, denominados *placa del techo* y *placa del suelo*, respectivamente.

En la novena semana de desarrollo aparece una apertura en la zona dorsal de las paredes del romboencéfalo que hace que la placa del

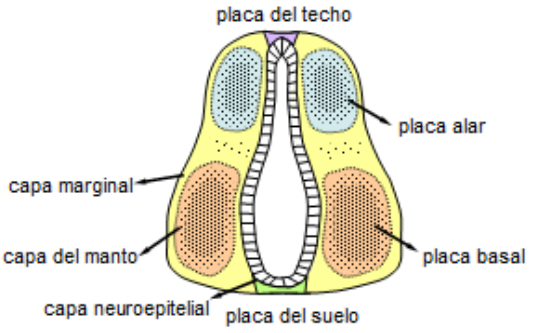


FIGURA 6. Esquema de las diferentes partes del tubo neural en la cuarta semana de desarrollo. Las placas alares y la placa del techo están en posición dorsal y las placas basales y la placa del suelo se sitúan en posición ventral. Se pueden observar también las diferentes capas que componen el tubo neural en esta etapa.

techo se ensanche en forma de membrana transparente y que recubra el denominado canal neural romboencefálico (futuro cuarto ventrículo). En este punto, las porciones dorsolaterales de las placas alares del romboencéfalo se incurvan para formar los denomindados labios rómbicos (Figura 7). En su porción caudal los labios rómbicos se aproximan a la línea media mientras que en la porción cefálica del mesencéfalo están muy separados. En esta última zona se ensanchan y se doblan sobre el techo del canal, formando la placa cerebelosa que dará lugar al cerebelo.

Formación de las capas germinales del cerebelo

En zona más interna de los labios rómbicos se inicia una fase de proliferación y se forma la denominada *capa germinal interna* o *ventricular* (Figura 7). Alrededor de las doce y trece semanas de gestación aparece una segunda capa de células proliferantes en la zona dorsolateral: la *capa germinal externa* o *capa granular externa* (CGE) originada a partir de la migración de algunos progenitores de la capa ventricular hacia la zona más superficial de la capa marginal (Larsen William J, 1993). Ambas capas germinales experimentan una serie de divisiones finamente reguladas que darán origen a las poblaciones de neuroblastos cerebelares.

La capa germinal interna dará lugar a los neuroblastos nucleares primitivos que migrarán para formar los núcleos profundos. Ésta misma capa también producirá neuroblastos primitivos de Purkinje y de Golgi. La capa granular externa experimentará tres tandas proliferativas para producir sucesivamente los neuroblastos en cesto, los neuroblastos granulares y los neuroblastos estrellados. Entre la semana catorce y diecisiete los neuroblastos de Purkinje de la capa germinal interna dejan de proliferar y migran hacia la capa marginal para colocarse debajo de la capa granular externa en forma de monocapa, la *capa de Purkinje* (CP), a la vez que extienden su axón y contactan con los núcleos cerebelosos en desarrollo. Estos axones representarán las únicas vías eferentes en el cerebelo maduro (Altman et al., 1997).

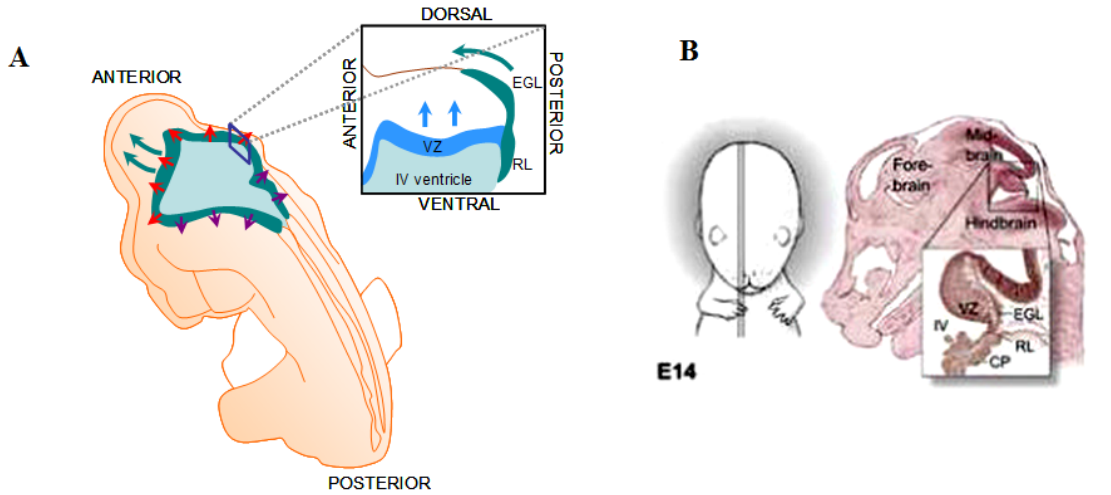


FIGURA 7. A. Visión dorsal de un embrión en el que se observan los labios rómbicos (RL) y las dos capas germinales: la capa ventricular (VZ) y la capa granular externa (EGL), que se extiende en dirección cranial. Las flechas rojas representan la expansión de los márgenes en dirección anterior, mientras que las violetas, en posterior. B. Corte sagital de un embrión de ratón de 14 días (E14), en el que se pueden apreciar las diferentes zonas. IV, cuarto ventrículo; CP, plexo coroideo (Schuller et al., 2008).

A partir de esta etapa las células de la capa granular externa proliferan en respuesta al factor de secreción *Sonic Hedgehog* (Shh), producido por las células de Purkinje (Wechsler-Reya et al., 1999). Posteriormente, en la placa cerebelosa se apreciará la existencia de tres porciones: el vermis, en la línea media, y dos hemisferios, a ambos lados. Al poco tiempo, una fisura transversal separará el nódulo del resto del vermis y los flóculos del resto de los hemisferios.

En humanos, la proliferación de la capa granular externa puede mantenerse hasta un año después del nacimiento y dará lugar al plegamiento progesivo de la placa cerbelosa y a la característica rugosidad del cerebelo maduro (Abraham et al., 2001).

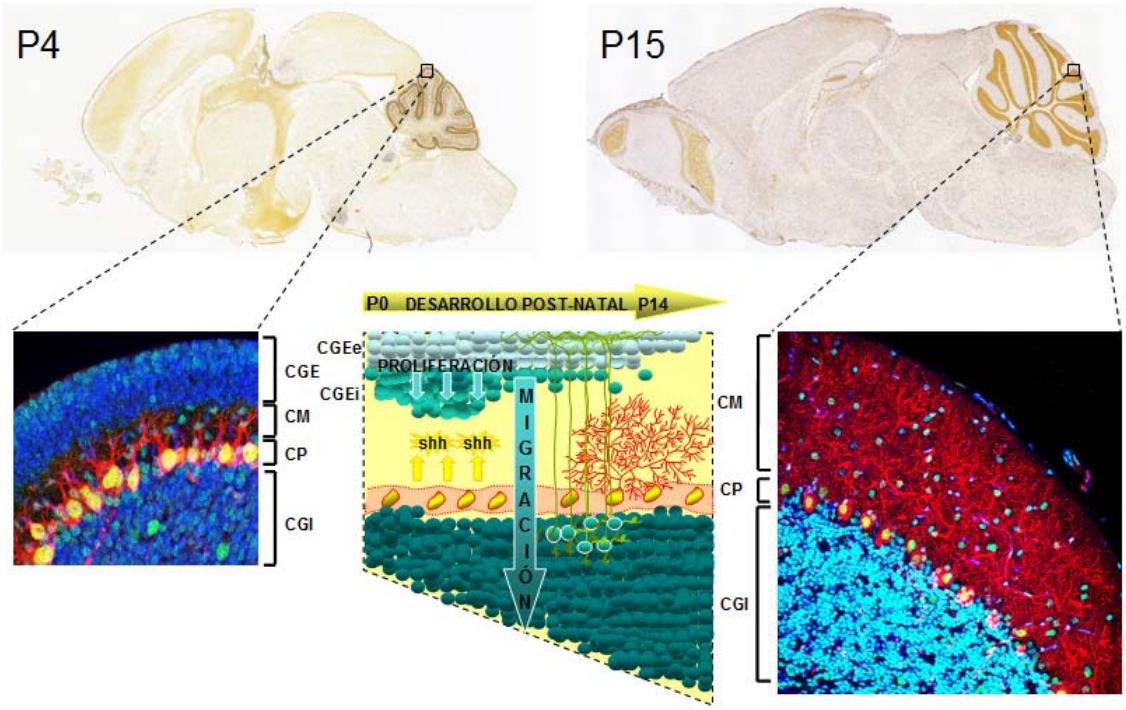


FIGURA 8. A diferencia del cerebelo de humanos, el de ratón alcanza su madurez a los 14 días del desarrollo post-natal. En la parte superior de la figura aparecen dos cortes sagitales de cerebros de ratón en los se obervan las diferencias en el tamaño y la forma entre un cerebelo post-natal de cuatro días (P4) y uno de quince días (P15), ya maduro. En la parte inferior de la figura se aprecia la aparienciacelular de ambos. En el ratón P15 la capa granular externa (CGE) desaparece y en su lugar sólo se observan los axones de las células de Purkinje (rojo), que forman la capa molecular (CM). En el centro, un esquema representativo de los dos procesos que tienen lugar. Por un lado, el crecimiento de la CGE debido a la proliferación de los precursores de las células granulares de cerebelo de la parte más externa (CGEe) en respuesta al factor de secreción Sonic Hedgehog (Shh) producido por las células de Purkinje. La migración de las células granulares comienza a medida que las éstas salen de ciclo celular. Primero se colocan en la parte más interna de la CGE (CGEi) y posteriormente descienden atravesando la capa de células de Purkinje (CP) y dejando su axón en la CM para colocarse finalmente en la capa granular interna (CGI) (Imágenes de inmunohistoquímica obtenidas por Jordi Berenger de Felipe. Núcleos teñidos con DAPI y células de Purkinje marcadas con un anticuerpo contra Calbindina).

Migración de las células granulares y maduración del cerebelo

A medida que avanza el desarrrollo, las células de la capa granular externa comienzan a salir de ciclo celular y a diferenciarse para migrar hacia una zona más interna: la *capa granular interna* (CGI). Estas células atraviesan la capa de Purkinje siguiendo la glia radial de Bergman y en su recorrido descendente dejan atrás el axón que, al bifurcarse, forma las dos fibras paralelas (Figura 8) (Hatten, 1999).
Algunas de las células en cesta y estrelladas acompañan a las granulares y se sitúan en la capa granular interna. Esta migración puede darse hasta dos años después del nacimiento y se completa cuando la capa granular externa se queda sin células, cuyo espacio queda cubierto por los axones que forman la capa molecular. En este momento, el cerebelo adquiere su conformación madura con su corteza dividida en tres capas (Figura 3).
El último paso para maduración completa del cerebelo es la formación de las conexiones con las fibras musgosas y con las células de Golgi, en la capa granular interna.

En su transición a su estado post-mitótico, las células granulares acumulan inhibidores del ciclo celular, entre los cuales destaca *p27/Kip1*. En ratón, la deleción de este gen da lugar a un incremento de la proliferación de estas células con el consecuente agrandamiento del cerebelo (Miyazawa et al., 2000). Se han propuesto varios efectores extracelulares que promueven la salida de ciclo como PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating peptide) (Nicot et al., 2002), bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) (Fogarty et al., 2007) y BMP2 (Bone Morphogenetic Protein) (Alvarez-Rodriguez et al., 2007; Rios et al., 2004).

SONIC HEDGEHOG

Introducción

Sonic Hedgehog (Shh) es una proteína de mamíferos que pertenece a la familia de genes denominada Hedgehog. El gen *Hedgehog* (*Hh*) se identificó en la especie *Drosophila melanogaster* y en ella se determinó su papel como controlador del patrón de segmentación. Los fenotipos que resultaron de la pérdida de función de este gen dieron lugar a embriones con proyecciones pequeñas y punteadas que recordaban el aspecto de un erizo (Nusslein-Volhard et al., 1980). Cuando se buscaron los equivalentes en mamífero se identificaron tres genes homólogos. Los dos primeros, denominados *Desert Hedgehog* e *Indian Hedgehog*, llevan el nombre de las especies de erizo conocidas mientras que Sonic Hedgehog, el último en descubrirse, lleva el nombre del protagonista del conocido videojuego de Sega "Sonic The Hedgehog", muy popular en los años 90 (Echelard et al., 1993).

Función de Shh

Shh es el ligando más estudiado de la familia de genes *Hedgehog* de mamíferos y se considera un modelo de *morfógeno*. Los morfógenos son moléculas secretadas que difunden y forman un gradiente de concentración en el embrión al cual responden las células del mismo generando distintos tipos celulares en función de la cantidad de ligando al que están expuestas. Durante el desarrollo del tubo neural, por ejemplo, las células de la placa del suelo y de la notocorda son las responsables de secretar Shh y generan un gradiente de concentración dorsoventral que controlará el

"*Patterning*" (o adquisición de una identidad determinada por parte de las células, en este caso neuronal) a lo largo del eje (Briscoe et al., 2000). Tiene, por tanto, importantes funciones en la regulación del desarrollo embrionario y en la organogénesis de vertebrados como lo son la formación de las extremidades, del cerebro, del cerebelo y del tubo neural (Echelard et al., 1993).

En algunas zonas específicas, Shh tiene un potente efecto mitogénico, como es el caso de la capa granular externa del cerebelo y de los folículos capilares (Dahmane et al., 1999; Mill et al., 2005; Rowitch et al., 1999; Wechsler-Reya et al., 1999). Controla además, la proliferación de los precursores de oligodendrocitos, de las células del tubo neural y de la cresta neural (Ahlgren et al., 1999; Davies et al., 2001; Garg et al., 2001).

Producción, procesamiento y secreción de Shh

Shh es un factor de secreción que sufre una serie de procesamientos post-traduccionales antes de salir al medio extracelular. Estas modificaciones se encuentran conservadas evolutivamente y son aplicables a los tres homólogos humanos (Ingham et al., 2001). La molécula completa pesa unos 45 kDa (pre-proteína) y tiene un péptido señal que hace que se transloque desde el Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) al Liso (REL). Una vez allí, una peptidasa elimina el péptido señal y el Shh se autoprocesa (gracias a la actividad proteolítica que posee en la zona carboxi-terminal) generando dos fragmentos - uno amino-terminal de 20 kDa (N-Shh) y otro carboxi-terminal de 25 kDa, con ninguna otra función conocida hasta ahora-. Durante esta reacción se le añade una molécula de colesterol a la fracción carboxi-terminal de N-Shh que le proporciona la capacidad de unirse a la membrana (Bumcrot et al., 1995; Porter et al., 1996) y, mediante la participación de la proteína *Skinny hedgehog*, se le añade un palmitoil en la zona amino-terminal (Chamoun et al., 2001; Lee et al., 2001; Pepinsky et al., 1998). Estas dos modificaciones hidrofóbicas le confieren a la molécula una potencia treinta veces superior a la no modificada. Aunque se ignora su forma *in vivo*, una posible hipótesis es que la función de estas modificaciones sea la de crear un medio hidrofóbico para la formación de un hexámero cuya parte proteica se expondría hacia afuera mientras que la lipídica lo haría hacia adentro, de manera que la molécula podría difundir mucho más y alcanzar tejidos diana más alejados (Goetz et al., 2006; Zeng et al., 2001). La secreción de la molécula modificada con el colesterol depende de la actividad de la proteína transmembrana *Dispatched* (Disp) (Burke et al., 1999).

Ruta de señalización mediada por Shh

Patched (Ptc), el receptor de Shh, es una proteína que posee doce pasos transmembrana y un dominio de unión al ligando en su porción extracelular (Stone et al., 1996). Este receptor forma un complejo con *Smoothened* (Smo), una molécula siete pasos transmembrana que guarda homología con la familia de receptores que se acoplan a *proteínas G heterotriméricas* (GPCR, G-protein coupled receptors) y que se encarga de transducir la señal (Ruiz-Gomez et al., 2007). Se ha descrito que sus moléculas efectoras son las proteínas G inhibitorias (Gαi) con capacidad para inhibir a las *Adenilato Ciclasas* (ACs), las encargadas de producir

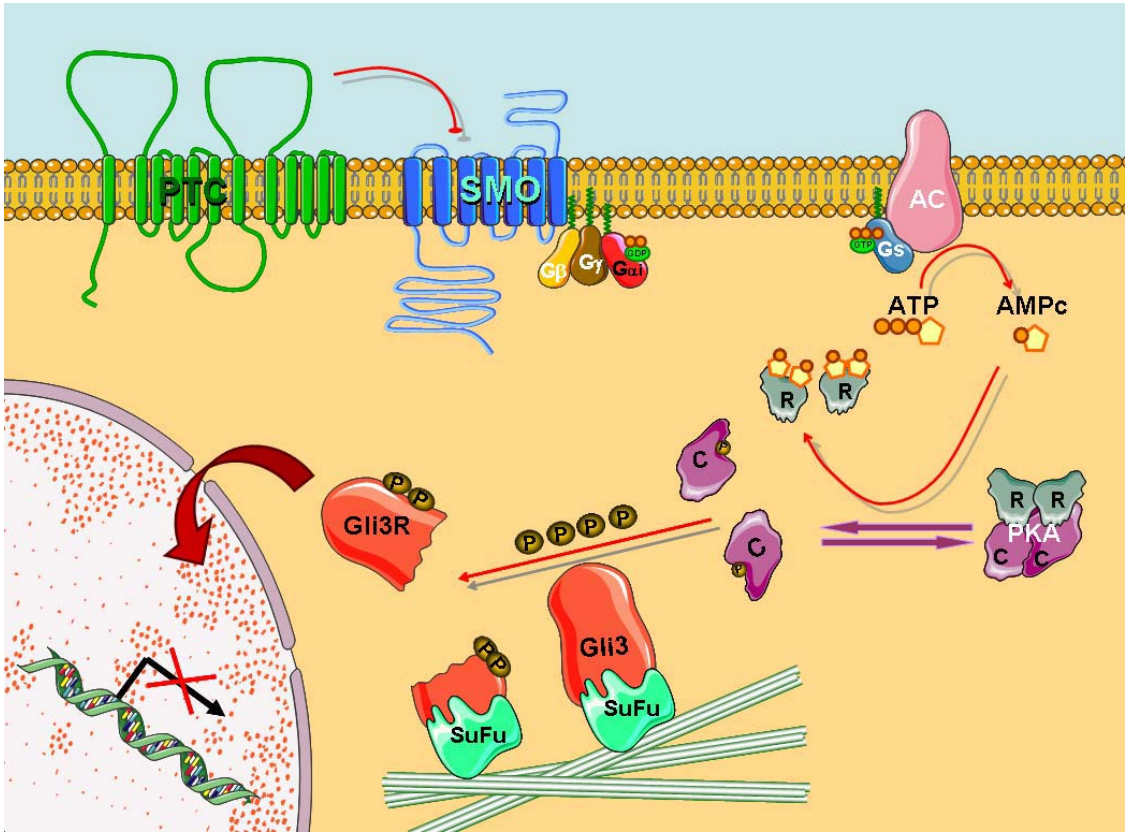


FIGURA 9. Vía de señalización de Shh en ausencia de ligando.

AMP cíclico (AMPc) (Ogden et al., 2008).

El receptor Ptc tiene la capacidad para reprimir a Smo de forma constitutiva. De manera que en ausencia de Shh, Smo se encuentra inactivo y no puede transducir la señal a través de Gαis. Por tanto, las ACs se mantienen activas y pueden producir AMPc. Como consecuencia de ello, la proteína quinasa A (PKA) dependiente de este segundo mensajero, se activa y puede fosforilar a sus sustratos diana. Entre éstos se encuentra *Gli3*, un factor de transcripción clave en la vía de Shh. Esta primera fosforilación por PKA promueve la fosforilación de Gli3 por las quinasas GSK3β (quinasa sintetizadora de glicógeno 3 beta) y CKI (Caseína quinasa I) que inducen una ubiquitinización de Gli3 para que sea degradado por el proteasoma (Tempe et al., 2006; Wang et al., 2006). Como consecuencia de ello, se libera un fragmento amino-terminal de la molécula con actividad represora (Gli3-R) que puede translocarse al núcleo y, gracias a que conserva los dedos de Zinc que le confieren la capacidad de unirse al ADN, puede colocarse en sus promotores diana y bloquear la transcripción de los genes de la ruta de Shh (Wang et al., 2000). En ausencia de Shh, Gli3 se encuentra unido a SuFu (Supressor of Fused), una molécula que lo retiene en el citoplasma y que permite que sea fosforilado. En vertebrados SuFu se considera un gen supresor de la vía y su pérdida da lugar a un potente fenotipo de ganancia de función de Shh (Figura 9) (Merchant et al., 2004; Stone et al., 1999).

La unión de Shh a Ptc hace que éste deje de reprimir a Smo y que a través de un mecanismo poco estudiado, este último transduzca la señal bloqueando la actividad de PKA. Por lo tanto, el procesamiento proteolítico de Gli3

no tiene lugar. La asociación de este factor de transcripción a SuFu desaparece y la molécula, en su forma completa, puede dirigirse al núcleo para activar a sus genes diana (ya que conserva el dominio de transcativación en la fracción carboxilo-terminal) (Figura 10) (Altaba et al., 2002; Wang et al., 2001).

El efecto proliferativo de Shh vendrá dado por la activación de genes de ciclo celular o de regulación de la apoptosis como *Ciclina D1* y *D2* o *BCL-2* (Katoh et al., 2009; Kenney et al., 2000) y por la activación de otros factores de transcripción tales como Gli1 y N-Myc, que extenderán la cascada de señalización induciendo a su vez la transcripción de otros genes diana (Dahmane et al., 1997; Oliver et al., 2003).

La ruta posee un mecanismo de control o *feedback* negativo, ya que uno de los genes que se activa es el propio receptor Ptch (Goodrich et al., 1996; Marigo et al., 1996).

Ganancia o pérdida de función de Shh

Una inhibición del gen o de la vía de Shh durante el desarrollo fetal puede causar malformaciones en el cerebro, entre las que destacan la holoprosencefalia y la ciclopía (Belloni et al., 1996). También da lugar a defectos en los miembros y en la médula espinal ya que interfiere en el mantenimiento

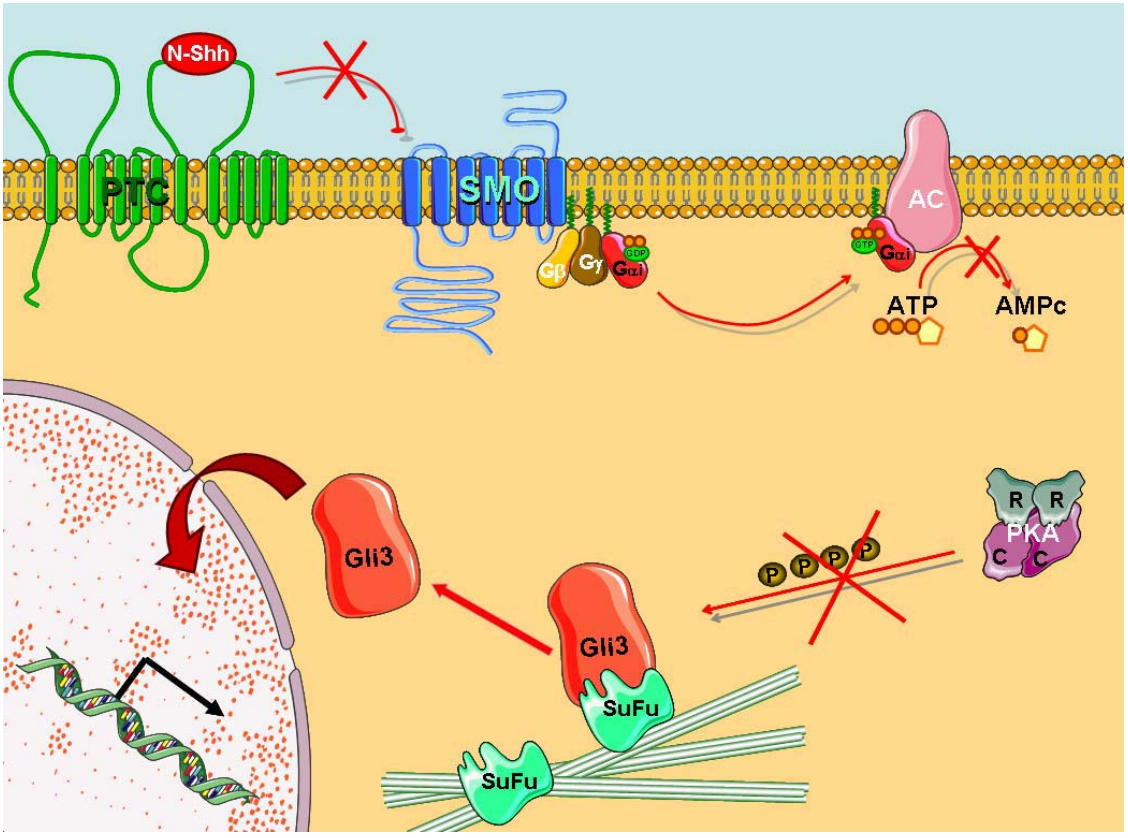


FIGURA 10. Vía de señalización de Shh en presencia de ligando.

de la notocorda y de la placa del suelo, lo que afectará en la inducción de los tipos celulares ventrales (Belloni et al., 1996a; Chiang et al., 1996).

Una hiperactivación de la ruta, en cambio, puede generar un meduloblastomas o tumores de cerebelo, como ocurre en los casos en los que los genes *Ptch* o *Sufu* -los dos genes supresores de la vía- están ausentes (Raffel et al., 1997; Taylor et al., 2002). También puede provocar neuroblastoma por una amplificación de N-myc (Seeger et al., 1985). La pérdida de *Ptch* está asociada al Síndorme de Gorlin caracterizado por una tendencia a desarrollar meduloblastomas, nevus de células basales, queratocistos odontogénicos múltiples, malformaciones esqueléticas y alto riesgo de cáncer de piel (Gorlin et al., 1960; Gorlin, 1987). Un incremento de la vía puede derivar en otras neoplasias del sistema nervioso como astrocitoma y oligodendroglioma (Xu et al., 2002, Dahmane, 2001).

RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G

Cuando en *Drosophila melanogaster* se identificó a Smo como efector de la vía de Hh, desde un principio se le consideró un *receptor acoplado a proteína G* (GPCR) por su gran similitud estructural con los miembros de esta familia (Alcedo et al., 1996; Van den Heuvel et al., 1996). Se postuló además que era el receptor del ligando Hh. Análisis bioquímicos mostraron posteriormente que es Ptc y no Smo la molécula que actúa como receptor del ligando (Marigo et al., 1996)

Introducción

Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (también conocidos como receptores ligados a proteínas G, GPLRs, receptores siete pasos transmembrana, 7TM, o "en serpentina") constituyen una superfamilia de receptores transmembrana que responden a una gran variedad de estímulos químicos extracelulares, desde pequeños péptidos a proteínas grandes (hormonas, neurotransmisores, quimioatrayentes e iones de calcio, entre otros) o estímulos sensoriales (como la luz, moléculas gustativas y odorantes o feromonas) (Vilardaga et al., 2010).

El tamaño exacto de la superfamilia de los GPCRs se desconoce pero, por análisis de secuencia, se predijeron aproximadamente 800 genes diferentes (aproximadamente el 4% del genoma codificante). Hoy en día se sabe que están involucrados en muchas enfermedades y son la diana de aproximadamente el 30% de todas las drogas medicinales modernas (Overington et al., 2006).

Por la homología en su secuencia y la similitud en cuanto a función, los GPCR se agrupan en 6 clases (Foord et al., 2005). Smo pertenece a la *clase F* de esta superfamilia (*Frizzled/Smoothed*). Aunque las diferentes clases no comparten homología en secuencia, todos los GPCRs comparten una estructura y un mecanismo de transducción de la señal común. Son receptores de superficie celular que detectan señales extracelulares y que pueden activar, a través de segundos mensajeros, rutas de transducción dentro de la célula. En última estancia, pueden dar lugar a respuestas celulares. Una vez activados por su agonista, los GPCR interaccionan y activan a proteínas heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G).

En el caso de Smo, no es el propio ligando el que lo activa, sino que cuando Shh se une al receptor Ptch se produce una liberación en la represión que éste ejerce sobre Smo.

Estructura de los GPCRs

Los GPCRs son proteínas integrales de membrana que poseen siete hélices α hidrofóbicas que la atraviesan (de tm-1 a tm-7) unidas por tres bucles intracelulares (de il-1 a il-3) y 3 bucles extracelulares (de e-1 a e-3). El extremo amino-terminal de la proteína se localiza en el esopacio extracelular mientras que el extremo carboxi-terminal lo hace intracelularmente.

Estos receptores suelen tener en común varios sitios que les permiten ser modificados post-traduccionalmente. Los dominios extracelulares suelen estar glicosilados y poseer residuos de cisteína que alteran la conformación del receptor formando puentes disulfuro. Los dominios intracelulares tienen los sitios de unión a proteínas G y a otras proteínas reguladoras. Poseen además sitios de fosforilación para serina o treonina quinasas, así como para tirosina quinasas, implicadas en procesos de internalización y de desensibilización (Qanbar et al., 2003; Vilardaga et al., 2010). La fosforilación, por lo tanto, es uno de los mecanismos que controlan el estado de un GPCR en la señalización de una vía y Smo no es una excepción. En *Drosophila melanogaster*, la fosforilación de Smo en su fracción carboxi-terminal por PKA, GSK3β y CKI es esencial para su actividad (Apionishev et al., 2005; Jia et al., 2004; Zhang et al., 2004). Sin embargo, estos sitios de fosforilación no se encuentran conservados en el homólogo de mamíferos (Varjosalo et al., 2006).
Muchos de los GPCR pueden ser, además, palmitoilados en los residuos cisteína de su extremo carboxi-terminal. De esta manera se crea un sitio de unión extra a la membrana y se pueden formar otros bucles intracelulares (Qanbar et al., 2003).
La mayoría de los GPCR se organizan en una estructura terciaria que recuerda a un barril constituído por la unión de las siete hélices transmembrana. La cavidad que éstas dejan dentro de la membrana plasmática sirve para la unión del ligando (que normalmente se cubre por el dominio extracelular e-2). No obstante, los ligandos se pueden unir en otros bucles extracelulares o en la fracción amino-terminal (Figura 11).

En muchos casos los GPCR homo o hétero-dimerizan al activarse. El mecanismo de dimerización se ha descrito mediante ensayos de transmisión de energía de resonancia (FRET), tanto para la molécula de Smo de *Drosophila melanogaster* como para la de

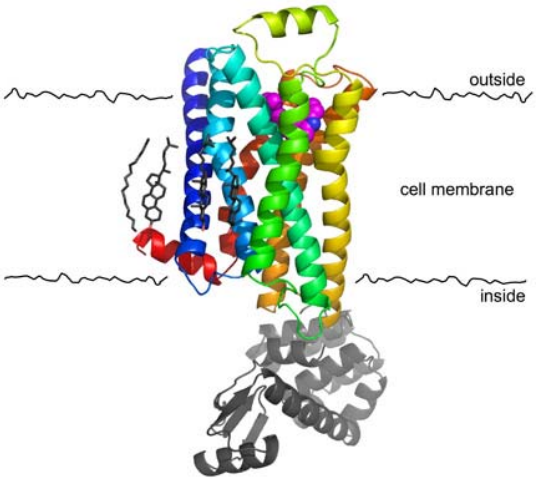


FIGURA 11.Estructura en forma de barril del receptor β2-Adrenérgico. La fracción amino-terminal (verde claro) se encuentra en la porción extracelular de la célula (outside) mientras que la porción intracelular (gris) se encuentra dentro de la misma. Imagen obtenida de internet (http://www.aps.anl.gov/Science/Highlights/2007/20071203.html)

vertebrados. En estos ensayos se demostró que Smo dimeriza a través de su fracción amino-terminal y que esta interacción es necesaria para la transducción de la señal (Figura 12) (Zhao et al., 2007).

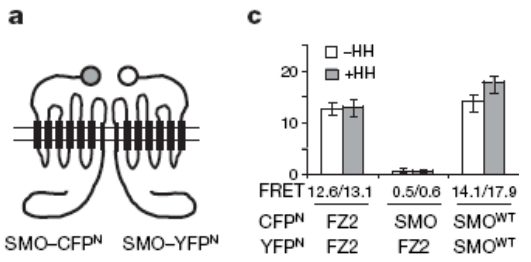


FIGURA 12. a) Smo de Drosophila melanogaster marcado con las moléculas fluorescentes azul y amarilla (SMO-CFPN y SMO-YFPN, repectivamente) en fracción amino-terminal.
b) FRET obtenido por la dimerización del receptor Frizzled 2, Fz2 (conocido por formar oligómeros) y por la dimerización de moléculas de Smo salvaje, en presencia y ausencia de Hh. Obsérvese la ausencia de FRET entre Smo y Fz2 (Zhao et al., 2007).

PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉTRICAS

Introducción

Las proteínas G se suelen acoplar a los GPCRs y transmitir la señal hacia dentro de la célula por medio de un segundo mensajero. Estas proteínas forman un complejo heterotrimérico compuesto por tres subunidades. La subunidad α (Gα) pesa unos 33-55kDa y tiene capacidad para disociarse del complejo; las subunidades β y γ (de unos 35kDa y 15kDa, respectivamente) suelen encontrarse unidas formando el conocido dímero Gβγ.

Activación de las proteínas G a través de GPCR

Los mecanismos exactos de interacción entre el GPCR y las proteínas G, así como la activación de estas últimas por parte del receptor, aún no se conocen. Existen dos modelos opuestos para explicar cómo las proteínas G se unen a receptores activados. El modelo de "acoplamiento por colisión" propone que estas interacciones ocurren como el resultado de la difusión lateral contínua de las proteínas G dentro de la membrana plasmática y por su colisión únicamente con

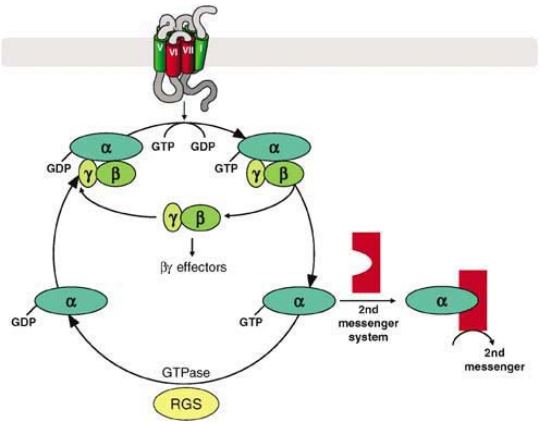


FIGURA 13. Activación de las subunidades por GTP y separación de la de la subunidad G del complejo G (Milligan et al., 2006).

receptores activados (Tolkovsky et al., 1978). El modelo alternativo sugiere que las proteínas G pueden interaccionar con receptores antes de que el agonista se una y que cuando esto sucede, se activan (Gales et al., 2006). Sea cual sea el modelo más acertado, se sabe que en el momento de interaccionar con el receptor, la proteína G se encuentra en su estado inactivo (Oldham et al., 2008).

La unión del agonista al GPCR provoca un cambio conformacional en el receptor haciendo que éste libere, de una forma mecánica, el GDP de la subunidad Gα de la proteína G con la que

está interaccionando en ese momento. El ratio entre el GTP citosólico respecto al GDP es 10, de manera que la célula se asegura que este último sea intercambiado rápidamente por un GTP (Neer, 1995b). Una vez activada, la subunidad α se disocia del complejo Gβγ para modular proteínas de señalización intracelulares o proteínas funcionales, dependiendo del tipo de subunidad α que se trate. El dímero Gβγ libre también tiene capacidad para regular positiva o negativamente la actividad de efectores enzimáticos y de canales iónicos (Figura 13) (Clapham et al., 1993; Neer, 1995).

Aunque la subunidad α se disocia del complejo, su alcance de difusión se encuentra bastante limitado debido a que todas las subunidades α, a excepción de la subunidad Gαt, poseen una modificación post-traduccional con un ácido palmítico en su porción amino-terminal, que las mantiene unidas a la membrana plasmática. Los miembros de la familia Gαi poseen, además, una miristolación en esta porción. Estas modificaciones regulan no sólo la localización, sino que también modulan las interacciones proteína-proteína (Chen et al., 2001; Smotrys et al., 2004). En el caso de las subunidades Gγ, su fracción carboxilo-terminal une covalentemente un glicosilfosfatidilinosiltol (GPI), molécula que contiene dos grupos hidrofóbicos que la anclan en la membrana y a zonas específicas de la misma como los "lípid rafts" (Oldham et al., 2008).

Terminación de la señalización mediada por GPCRs

La actividad de los GPCRs supone un balance entre los mecanismos moleculares implicados en la señalización, la desensibilización y en la resensibilización. La desensibilización resulta en una disminución de la respuesta incluso en presencia continuada del estímulo. Hasta la fecha se han descrito tres familias de moléculas reguladoras que contribuyen a la desensibilización de GPCR: las quinasas de receptores GPCR (GRKs) y las proteína-quinasas dependientes de segundos mensajeros, que fosforilan al receptor (Bouvier et al., 1988; Hausdorff et al., 1989) y las arrestinas, que contribuyen en la internalización de los GPCR (Lefkowitz, 1993). Ambos mecanismos se han descrito en el receptor Smo, el cual es fosforilado por GRK2 para interaccionar posteriormente con β-Arrestina (Chen et al., 2004).

El control de la finalización de la señal a través de GPCR puede ocurrir, por lo tanto a varios niveles, pero sobre todo tiene lugar por la hidrólisis del GTP unido a la subunidad Gα. Esto le permitirá unirse nuevamente al dímero Gβγ para volver a formar el heterotrímero inactivo e iniciar otra ronda de activación regulada por el receptor. La propia subunidad α tiene capacidad de hidrolizar el GTP de manera intrínseca y de determinar, por tanto, la vida media de su estado activo (Bourne et al., 1989). El dominio GTPasa se encuentra conservado en todos los miembros de la superfamilia de proteínas G, incluyendo las proteínas G monoméricas y los factores de elongación. En el caso de la subunidad Gα, este dominio le proporciona además la superficie de unión al dímero Gβγ, a los GPCRs y a las proteínas efectoras (Oldham et al., 2008).

La actividad GTPasa de la subunidad α, por sí sola, es relativamente baja, con un ratio de hidrólisis de aproximadamente 0.02 veces/segundo. A una subunidad le tomaría unos 50 segundos hidrolizar el GTP que lleva unido. Por ello, esta actividad se encuentra regulada a su vez por unas proteínas accesorias denominadas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS). Éstas pertenecen al tipo de proteínas activadoras de actividad GTPasa

(GAP) y se unen a la subunidad α por este dominio acelerando el proceso hasta unas 30 veces/segundo. Este aumento de hasta 1500 veces le permite a la célula responder a señales externas de una manera muy rápida y con una resolución espacial y temporal muy concreta, ya que la generación del segundo mensajero tendrá lugar en cantidades muy controladas puesto que la difusión de la proteína G y, por lo tanto, la activación o inhibición de sus dianas en 0.03 segundos, se encuentra muy limitada (Berman et al., 1998).

Clasificación y función de las proteínas G

A pesar de la gran diversidad de miembros que posee la superfamilia GCPR, éstos interaccionan con un número relativamente pequeño de proteínas G capaces de iniciar las cascadas de señalización intracelular. En humanos existen 21 subunidades α (codificadas en 16 genes), 6 subunidades β (codificadas en 5 genes) y 12 subunidades γ (Downes et al., 1999).

Las propiedades de transducción de la señal por las posibles combinaciones de subunidades Gβγ no parecen diferir radicalmente las una de las otras. En consecuencia, la clasificación estructural y funcional de las proteínas G está definida por el tipo de subunidad α que participa (Wettschureck et al., 2005).

Al poseer funciones muy similares (como la asociación a receptores y al dímero Gβγ, la unión a GTP e hidrólisis del mismo) las subunidades Gα contienen un 20% de aminoácidos conservados en su secuencia primaria. Fuera de estas regiones, las secuencias de las proteínas G divergen bastante, determinando así las propiedades diferenciales de cada una. En base a su función específica y a la similitud en su secuencia primaria, las proteínas Gα se dividieron en cuatro familias: Gαs, Gαi/o, Gαq/11 y Gα12/13 (Simon et al., 1991). Cada clase de proteínas G consiste en múltiples miembros producto de múltiples genes y/o variantes de splicing.

Existen dos rutas de señalización principales asociadas a la activación de proteínas G por parte de un GPCR: la del AMPc y la del PIP (Figura 14) (Gilman, 1987).

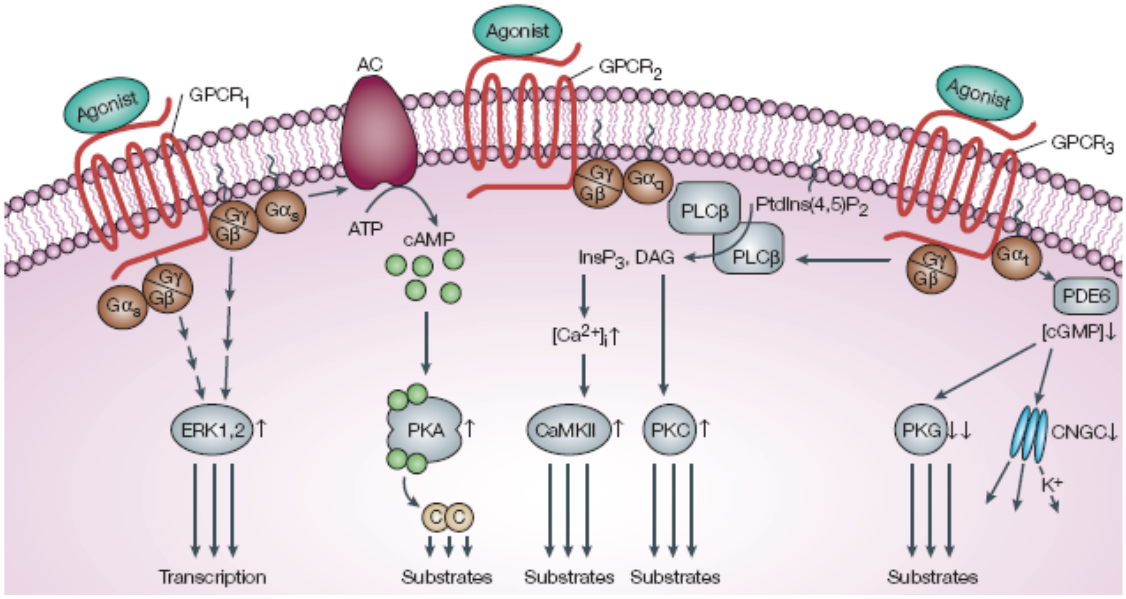


FIGURA 14. Principales rutas de señalización activadas por GPCR y Proteínas G (Malbon, 2005c).

La *clase Gα* de proteínas G se encuentra ampliamente expresada y se compone por las subunidades Gαs y Gαolf, que aumentan la concentración intracelular de AMPc por medio de la activación de ACs. Estas subunidades son sustratos de la toxina colérica (CTX) producida por *Vibrio cholera*, que las ribosila con ADP e inhibe su actividad GTPasa intrínseca. De esta manera, la toxina da lugar a formas constitutivamente activas de las moléculas que no pueden liberar el GTP unido (Gill et al., 1978). La subunidad Gαs está codificada en *GNAS*, un complejo genético que da lugar a diversos productos debido a la presencia de varios promotores y variantes de splicing (Wettschureck et al., 2005).

La *clase Gαi/o* también se expresa ampliamente y contiene las formas inhibitorias Gαi1, Gαi2 y Gαi3, las dos isoformas de Gαo (Gαo-1 y Gαo-2, de la palabra inglesa "others", ya que fueron identificadas posteriormente), las tres Gα sensoriales (Gαt-1 y Gαt-2 de retina y Gαgust del gusto) y Gαz (Wettschureck et al., 2005). Como su sigla indica, las subunidades Gαi1, Gαi2 y Gαi3 median la inhibición de varios subtipos de adenilato ciclasas (ACs) (Sunahara et al., 1996). Las funciones de todos los miembros de esta clase, a excepción de Gαz (que es insensible), se suelen estudiar mediante el uso de la toxina pertúsica (PTX), producida por *Bordetella pertussis*. Contrariamente a CTX, PTX ribosila un residuo cisteína de la fracción carboxi-terminal con ADP y cataliza una modificación covalente e irreversible que desacopla la proteína G de su receptor y la mantiene en su estado inactivo, unida a GDP (Watkins et al., 1984; Wettschureck et al., 2005).

Por otro lado, la activación de Gαi/o se considera el principal mecanismo de activación de la vía de señalización mediada por el complejo Gβγ ya que los niveles de expresión de Gαi/o son relativamente altos y la activación por el receptor resulta en una liberación de altas cantidades de complejos Gβγ (Clapham et al., 1997). En el caso de Gαo, que es particularmente abundante en el sistema nervioso (representando aproximadamente el 1% del total de proteínas de membrana), sus efectos parecen estar mediados principalmente por este complejo (Malbon, 2005).

La subunidad Gαz se expresa menos ampliamente y principalmente en tejidos como el sistema nervioso y comparte similitudes funcionales con el subtipo Gαi.

Las subunidades Gαgust y Gαt, en cambio, están implicadas en funciones sensoriales muy concretas en las zonas específicas donde se expresan (Wettschureck et al., 2005).

La *clase Gαq/11* es la principal reguladora de fosfolipasa C (PLC) de la clase β,que cataliza la disrupción de el fosfatidil 4,5-bifosfato (PIP2) en dos mensajeros secundarios: el inositol(1,4,5) trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (Wettschureck et al., 2005). Contiene cinco miembros: Gαq, Gα11, Gα14, Gα15/Gα16 (Gα15 en ratón y Gα16 su ortólogo en humano), todos ellos resistentes a las toxinas colérica y pertúsica. Los dos primeros son muy abundantes mientras que el resto se encuentran restringidos a tejidos muy concretos, como las células hematopoyéticas (Amatruda, III et al., 1991).

La *clase Gα12/13* está compuesta por sólo dos proteínas, Gα12 y Gα13, también resistentes a las toxinas (Ui et al., 1990). Se pueden activar por la mayoría de receptores que se acoplan a Gαq/11 y se encuentran expresadas de manera ubicua (Wettschureck et al., 2005). El análisis de la señalización a través de estas subunidades ha sido difícil debido a la falta de disponibilidad de inhibidores específicos. Mediante el uso de moléculas mutantes constitutivamente activas se ha visto que pueden inducir una

Table 1 | **Heterotrimeric G-protein subunit composition**

Isoforms	Effectors
Gα-subunit family	
$G\alpha_{t1}$	Inhibits adenylyl cyclases
$G\alpha_{t2}$	Inhibits adenylyl cyclases
$G\alpha_{t3}$	Inhibits adenylyl cyclases
$G\alpha_{oA,B}$	Inhibits adenylyl cyclases
$G\alpha_{z}$	Inhibits adenylyl cyclases
$G\alpha_{t1}$	Activates PDE (visual rod)
$G\alpha_{t2}$	Activates PDE (visual cone)
$G\alpha_{gust}$	Activates PDE (taste)
$G\alpha_{s}$	Stimulates adenylyl cyclases
$G\alpha_{olf}$	Stimulates adenylyl cyclases (olfactory)
$G\alpha_{sXL}$	Stimulates adenylyl cyclases
$G\alpha_{q}$	Stimulates PLCβ
$G\alpha_{11}$	Stimulates PLCβ
$G\alpha_{14-16}$	Stimulates PLCβ
$G\alpha_{12}$	Stimulates Rho guanine nucleotide-exchange factors
$G\alpha_{13}$	Stimulates Rho guanine nucleotide-exchange factors
Gβ and Gγ subunits	
$G\beta_{1-5}$	Inhibits adenylyl cyclases, stimulates Ca^{2+} and K^{+} channels, stimulates PI3K activity, recruits GRK2 and GRK3, stimulates PLCβ
$G\gamma_{1-12}$	Inhibits adenylyl cyclases, stimulates Ca^{2+} and K^{+} channels, stimulates PI3K activity, recruits GRK2 and GRK3, stimulates PLCβ

GRK, G-protein receptor kinase; PDE, phosphodiesterase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLCβ, phospholipase Cβ.

TABLA 1. Resumen de las diferentes subunidades de Proteínas G y los efectores que posee cada una (Malbon, 2005b).

variedad de rutas de señalización que inducen la activación de efectores como fosfolipasa A2, intercambiadores de sodio y potasio o c-Jun. Una importante función tiene lugar a través de la modulación de la contractibilidad por activación de la GTPasa citosólica de bajo peso molecular *Rho* (Buhl et al., 1995).

Señalización mediada por el complejo Gβγ

Desde un principio al complejo Gβγ se le consideró una pareja pasiva de la subunidad α. No obstante, se ha demostrado que en su estado libre este dímero puede regular a varios efectores (Figura 14).

El complejo Gβγ puede formarse por un repertorio de 5 subunidades β y 12 subunidades γ. Las subunidades de β1 a β4 forman un estrecho complejo con las subunidades γ que sólo puede separarse bajo condiciones desnaturalizantes. Por ello, se suele hablar de la función del complejo Gβγ como un conjunto. Todas las subunidades Gβ pueden interaccionar con la mayoría de las subunidades Gγ, pero las 60 posibilidades de combinación no ocurren en la naturaleza (Clapham et al., 1997). Algunos dímeros Gβγ pueden interaccionar con la misma isoforma

Gα, lo cual sugiere que la expresión diferencial o la localización subcelular son importantes para la regulación de la señalización (Graf et al., 1992).
Entre los eventos de señalización mediados por el dímero Gβγ se incluyen la regulación de canales iónicos, isoformas particulares de Adenilato ciclasa (AC), fosfolipasa C (PLC) y fosfoinositol 3-quinasas (PI3Ks) (Wettschureck et al., 2005).

Una célula individual puede contener hasta cuatro o cinco tipos diferentes de proteína G, a excepción de las que se encuentran en tejidos u órganos concretos (Neer, 1994). La mayoría de receptores pueden activar más de un tipo de proteína G pero suelen mostrar preferencia por uno en concreto. La activación de un GPCR, por tanto, resulta en la activación de varias cascadas de transducción a través de subunidades α y de complejos libres Gβγ. El patrón de proteína G activada por un receptor determina la respuesta biológica en una célula y, por tanto, receptores que tienen efectos celulares muy similares normalmente activan el mismo subtipo de proteína G. Por lo general, la interacción con el receptor no ocurre de una manera absolutamente específica pero tampoco completamente promiscua. Algunos receptores parecen interaccionar sólo con ciertos subtipos de proteínas G y, en algunos sistemas celulares, la composición de la señalización mediada por proteínas G puede ser muy específica. (Wettschureck et al., 2005).

En el caso de Smo, existen varios estudios que describen su capacidad de activar a subunidades Gαi. La primera aproximación se hizo mediante el uso de la toxina pertúsica (PTX) en pez zebra, que causó en el pez un fenotipo de pérdida de función de Hh caracterizado, entre muchos otros defectos, por ciclopia y falta de especificación ventral en el prosencéfalo (Hammerschmidt et al., 1998). Se postuló, por tanto, que Smo requiere de proteínas G inhibitorias (Gαi) para transducir la señal ya que ésta es la única clase de proteínas G ampliamente expresada que responde a la toxina. Dos estudios posteriores realizados *in vitro* y en sistemas celulares que no responden a Hh confirmaron que Smo es capaz de activar a este tipo de subunidades. El primero se realizó en melanóforos de rana, en los que la sobreexpresión de Smo indujo la agregación de melatonina, mecanismo conocido por requerir la activación de subunidades Gαi. La agregación del pigmento pudo reprimirse tanto con PTX como con la coexpresión de Smo y un dominante negativo de Gαi o el receptor Patched (DeCamp et al., 2000). En el segundo estudio, realizado en células Sf9 (una línea celular de mariposa), se demostró que Smo es capaz de cargar GTP radioactivo (P32γ-GTP) en subunidades Gαi y, por lo tanto, de activarlas (Riobo et al., 2006). Mediante la creación de una mosca mutante que carece de Gαi se demostró, recientemente, la necesidad de esta subunidad para la correcta activación de la vía de Hh en *Drosophila melanogaster* (Ogden et al., 2008).
Existe un único estudio que implica a la subunidad Gα12 en la cascada de transducción de señal de ruta de Shh mediante la activación de la vía de Rho quinasa (Kasai et al., 2004).

Regulación de los niveles intracelulares de AMPc

Producción de AMPc: Las Adenilato Ciclasas

El AMPc es producido a partir de ATP por dos familias ampliamente expresadas y

relacionadas evolutivamente: las adelinato ciclasas solubles (ACs) y las adenilato ciclasas de membrana plasmática (ACtm), dos familias con funciones fisiológicas distintas. Poseen una arquitectura conservada en cuanto a dominios y mecanismo catalíticos se refiere, pero difieren en la localización subcelular y responden a distintos reguladores. Las proteínas G heterotriméricas son las principales reguladoras de la actividad de las ACtm, mientras que las AC solubles (ACs) se modulan a través de moléculas intracelulares tales como el calcio o el bicarbonato y son insensibles a la regulación por las proteínas G. La familia de las ACtm está compuesta por nueve isoformas codificadas en genes diferentes, todas ellas capaces de formar el AMPc a partir de ATP en respuesta a una señal mediada, por lo general, por subunidades α de proteína G (que pueden ser activadoras o inhibitorias), aunque en algunos casos puede ser a través de Calcio/calmodulina, o de las subunidades βγ de la misma proteína G. La *forskolina* (FSK), o coleonol, es una pequeña molécula de la familia de los disterpenos aislada de la planta *Coleus forskohlii* que es capaz de activar a todas las ACtm, a excepción de ACIX (Kamenetsky et al., 2006).

Degradación de AMPc: Las Fosfodiesterasas

La terminación de la señal de AMPc está conferida a la superfamilia enzimática de las fosfodiesterasas (PDEs). Están codificadas en 21 genes clasificados en 11 familias y catalizan la hidrólisis del fosfato 3'en los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc. Existen unas 40 isoformas distintas capaces de catalizar la hidrólisis de AMPc a AMP, si se incluyen las que tienen doble especificidad y las que son específicas sólo de AMPc (Kleppisch, 2009).

Los niveles de AMPc intracelular están, pues, regulados por el balance de las actividades de ACs y de PDEs. Dependiendo del tipo celular, de la combinación de diferentes moléculas de ambas familias y de su activación, el recambio de AMPc será mayor o menor.

PROTEÍNA QUINASA A

Introducción

La fosforilación es un mecanismo que sirve para mediar la función de muchas proteínas dentro de la célula. Las enzimas encargadas de catalizar esta modificación reversible son las conocidas proteínas quinasas y las fosfatasas. Estas enzimas constituyen el nexo de comunicación entre la membrana plasmática y las estructuras internas de la célula. Pueden regular desde un proceso metabólico simple hasta la organización de la división celular y juegan, por tanto, un papel clave en la función y el mantenimiento celular. En las últimas décadas se ha expandido la identificación de nuevas quinasas y han emergido como dianas terapéuticas, ya que muchas de ellas se han asociado a enfermedades (Taylor et al., 2008).

La proteína Kinasa A (PKA) o "*proteína dependiente de AMP cíclico* (AMPc)", es uno de los miembros más estudiados de esta superfamilia. Fue una de las primeras en ser descubierta, clonada y secuenciada, y la elucidación de su estructura proporcionó el primer molde en tres dimensiones para esta familia. El estudio de la enzima en solución en los últimos años ha permitido considerarla también una proteína "scaffold",

ya que contiene múltiples sitios de interacción proteína-proteína en su superficie que son tan esenciales para su función como lo es la transferencia del fosfato (Taylor et al., 2008).

Función, Estructura y Activación de PKA

La PKA es una enzima importante en el metabolismo celular debido a su capacidad para regular, mediante la fosforilación, enzimas específicas implicadas en rutas metabólicas. Puede modular la expresión de ciertos genes así como la secreción y la permeabilidad de la membrana. Entre los sustratos de PKA se incluyen a canales iónicos, enzimas metabólicas del citoplasma y algunos factores de transcripción que regulan la expresión de ciertos genes en el núcleo. Como el caso de pCREB o de Gli3 (Taylor et al., 2008). Ya citado anteriormente, este último es uno de los factores de transcripción de la vía de Shh y su fosforilación por PKA induce su degradación por el proteasoma dando lugar a una forma truncada de la molécula con actividad represora de la vía (Gli3-R).

La PKA es una holoenzima tetramérica compuesta por dos subunidades reguladoras (R) que forman un dímero y dos subunidades catalíticas (C) que se unen cada una a una subunidad R. En vertebrados existen varias isoformas de la subunidad C (Cα, Cβ, Cγ y PRKX) pero las dos de mayor importancia son Cα y Cβ. Cada una de éstas posee diferentes variantes de splicing, importantes para adquirir una mayor especificidad. Se distinguen además cuatro subunidades R, que determinarán el tipo de holoenzima que se forme (tipo I o tipo II): RαI, RβI, RαII y RβII. Homo o hetero-dímeros de RI u homo-dímeros RII unen a dos subunidades C libres por su centro activo y las mantienen así en su estado inhibido. La combinación entre las diferentes subunidades R y C le confiere a la PKA una alta especificidad en su señalización (Taylor et al., 2008).

Tal y como su nombre indica, la PKA o proteína dependiente de AMPc se activa a partir de este segundo mensajero, el AMPc. La unión de dos moléculas de AMPc en cada una de las subunidades reguladoras de la holoenzima causa un cambio en la conformación de las mismas y una consiguiente liberación de las subunidades catalíticas, que podrán fosforilar a sus sustratos proteicos. De esta manera, las subunidades reguladoras traducen una señal extracelular (mediante un segundo mensajero) a una respuesta biológica (Kim et al., 2007; Taylor et al., 2008).

La función enzimática de la PKA, por tanto, está mediada por la subunidad catalítica. Ésta es una Ser/Thr quinasa de ancho espectro que tiene capacidad para catalizar la transferencia de fosfato a un gran rango de proteínas. Esta fosforilación da como resultado un cambio en la actividad del sustrato, que puede ser una activación o una represión. Como se encuentran en una gran variedad de células, la PKA y el AMPc están implicados en múltiples procesos celulares (Taylor et al., 2008).

Estructura, dominios y activación de la subunidad Catalítica (C)

La subunidad C es una proteína globular que posee dos lóbulos. El lóbulo pequeño es muy dinámico, le sirve de sitio de unión de ATP y es donde se da la transferencia del γ-fosfato a sus sustratos, concretamente en el residuo Ser/Thr de la región consenso R-R-X-S/T-Hid (donde X es variable y Hid es cualquier aminoácido hidrofóbico) (Kemp et al., 1977). El lóbulo grande es muy estable y sirve como

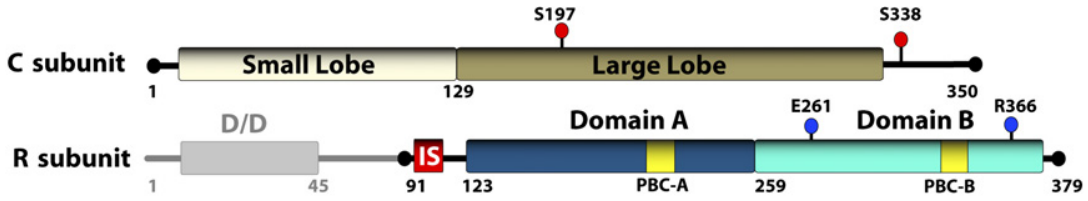


FIGURA 15. Dominios principales de las subunidades C y R de la PKA (Taylor et al., 2008a)

estructura de estabilización de la maquinaria catalítica y como lugar de anclaje de las parejas proteicas que actúan como sustratos o inhibidores. Contiene un motivo de activación propio de la familia de las quinasas, el bucle de activación VKGRTWT (aminoácidos 191-197), que es la mayor superficie de unión con la subunidad reguladora. La Thr197, además, es el aminoácido que hace de puente entre los dos lóbulos de la proteína (Figura 15) (Kim et al., 2007).

Para activarse, la subunidad C sufre dos autofosforilaciones secuenciales posteriores a su liberación, una en la Ser 197 (que *in vitro* se puede inducir por la quinasa PDK1) y otra en la Ser 338. Mutaciones en la primera afectan a la actividad y a la unión a la subunidad R pero no a la de sus sustratos (Adams et al., 1995), mientras que cambios en la segunda no tienen ningún efecto en la catálisis pero bajan la estabilidad de la proteína (Yonemoto et al., 1997).

Estructura, dominios y activación de la subunidad Reguladora (R)

La subunidad R es una proteína modular muy dinámica que sirve como uno de los mayores receptores de AMPc en las células eucariotas. En su fracción amino-terminal contiene un dominio hidrofófico necesario para la dimerización y/o el anclaje (D/D, Docking/Dimerization) que permite la formación del dímero y la interacción con proteínas scaffold como las AKAPS (Li et al., 1995). Después de este dominio hay una región de inhibición de PKA variable y flexible que se acopla al sitio activo de la subunidad catalítica. En el lado carboxi-terminal residen los dos sitios de unión a AMPc (el dominio A y el dominio B), que poseen el cassette de unión a fosfato (PBC). Este sitio de unión se encuentra conservado dentro de la familia de proteínas que unen nucleótidos cíclicos (Figura 16) (PKA/PKG, CAP, HCN y EPAC) (Kim et al., 2007) .

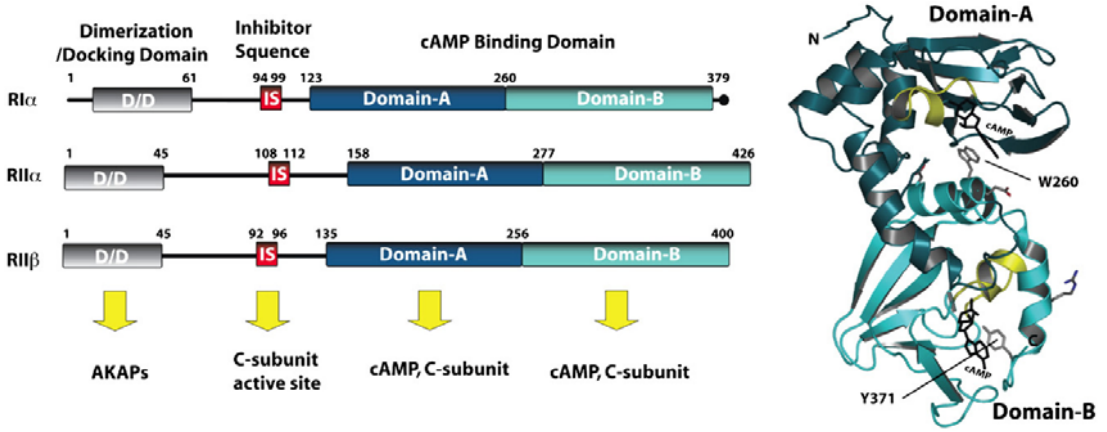


FIGURA 16. Principales dominios conservados en las subunidades reguladoras de PKA (Kim et al., 2007).

Expresión restrictiva de las holoenzimas tipo I y tipo II de PKA

Las subunidades C se expresan en la mayoría de células, así que la determinación de la holoenzima de PKA que se formará en una célula determinada depende del tipo de subunidad reguladora que allí se encuentre. En los mamíferos estas últimas tienen diferentes patrones de expresión. Aunque muy ubicua, la subunidad RIα se expresa principalmente en el cerebro, testis y linfocitos B y T. De manera similar, la subunidad RIIα tiene una presencia amplia en varios tejidos mientras que RIIβ se expresa principalmente en tejidos endocrino, cerebral, adiposo y reproductivo. RIβ en cambio, se expresa principalmente en el cerebro (Bossis et al., 2004; Pidoux et al., 200l).

Señalización de PKA en compartimentos subcelulares: Las AKAPs

La localización variable de las isoformas de PKA dentro de la célula añade un grado mayor de especificidad en la señalización mediada por esta enzima. Las holoenzimas tipo I suelen ser clásicamente citoplasmáticas mientras que el 75% de las holoenzimas tipo II suelen asociarse a orgánulos y a estructuras específicas (Pidoux et al., 2010). Las responsables de esta localización son las *AKAPS* (A Kinase Anchoring Proteins), una familia de proteínas con función de "scaffold". En general, las proteínas scaffold contienen múltiples dominios de unión proteína-proteína y sirven como plataformas para la integración y la diseminación de una señal de manera simultánea. Secuestran una enzima de señalización en un ambiente subcelular específico y aseguran que cuando ésta se active se encuentre en estrecha proximidad de las dianas más relevantes que allí se encuentren. De esta manera aportan a una vía de señalización intracelular una gran resolución espacio-temporal constituyendo un punto clave para que una ruta común dé lugar a diferentes funciones (Beene et al., 2007).

La primera AKAP en identificarse, en el año 1982, fue MAP2 (Theurkauf et al., 1982). Si se incluyen a todas las variantes de splicing, hasta el momento se han identificado a más de 50 miembros de AKAPs. Esta gran familia está constituida por proteínas estructuralmente diversas pero que comparten tres características comunes a nivel funcional. En primer lugar, contienen un dominio de anclaje de PKA, concretamente un dominio de unión a las subunidades reguladoras de la misma. En segundo lugar, actúan como proteínas scaffold multivalentes que, además de unir PKA, son capaces de formar complejos multiproteicos y de integrar la señal de AMPc con otras rutas o eventos de señalización. Y, por último, tienen motivos de localización determinados (como modificaciones lipídicas o dominios de interacción proteína-proteína) que les permiten dirigir a estos complejos de señalización a lugares específicos dentro de la célula (Beene et al., 2007).

Dominios de interacción entre AKAPS y subunidades R

La mayoría de las AKAPs identificadas hasta el momento unen específicamente a la subunidad RII ya que es la isoforma de PKA comúnmente conocida por confinarse en compartimentos y en estructuras subcelulares.

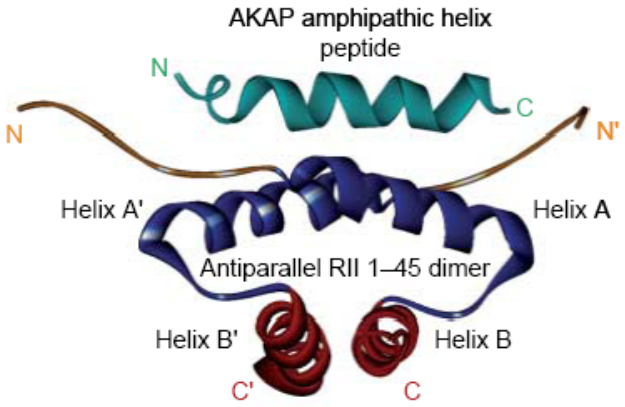


FIGURA 17. Diagrama de la interacción entre un dímero de RII (formado por la unión de las fracciones amino-terminales de dos subunidades de RII, en color azul oscuro) y la hélice amfipática de las AKAPs (color turquesa) (Pidoux et al., 2010).

Por su gran solubilidad se asumió que la holoenzima tipo I se encontraba principalmente en citoplasma. No obstante, recientemente se han caracterizado algunas AKAPs específicas para RI. Además, se han identificado algunas AKAPs de doble especificidad (D-AKAPs) que unen a ambos subtipos (como D-AKAP1 y D-AKAP2) (Beene et al., 2007; Pidoux et al., 2010).

En cuanto a la afinidad de unión, las subunidades RII se unen a las AKAPs en un rango nanomolar mientras que las subunidades RI lo hacen a niveles superiores, que pueden llegar hasta los micromoles (Pidoux et al., 2010).

Aunque las estructuras RII/AKAP son bastante similares entre ellas, cada AKAP une a RII de una manera ligeramente diferente. Mediante alineaciones de secuencias de diferentes AKAPs se descubrió que tienen un motivo de unos 14-18 aminoácidos responsable de unión a las subunidades reguladoras de PKA y que forman una estructura secundaria en forma de hélice-α amfipática (Figura 17). Estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) demostraron que esta hélice se une a una ranura hidrófoba dentro del sitio de anclaje y dimerización (D/D) la subunidad RII. Si esta estructura helicoidal se perturba mediante sustituciones con prolina en uno o más de sus residuos, las AKAPs no pueden unir a PKA (Beene et al., 2007; Pidoux et al., 2010).

Todas las isoformas de PKA tienen una alta homología en el dominio D/D y en los sitios de unión a AMPc. Por el contrario, las regiones de unión a C son muy variables tanto en longitud como en secuencia. En cuanto a su afinidad de unión al ligando, existen diferencias entre las distintas subunidades reguladoras. Las holoenzimas de PKA tipo I son más sensibles a concentraciones bajas de AMPc, con una constante de activación (Kact) de 50-100nM de AMPc, mientras que la holoenzima tipo II presenta una Kact de 200-400nM (Amieux et al., 2002; Pidoux et al., 2010).

El diseño y la producción de péptidos sintéticos como el Ht31 (obtenido a partir de AKAP-Lbc) y de péptidos de nueva generación han permitido interferir la unión entre AKAPs y RII. Otros péptidos como RIAD impiden la unión entre AKAPs y RI (Figura 18 B).

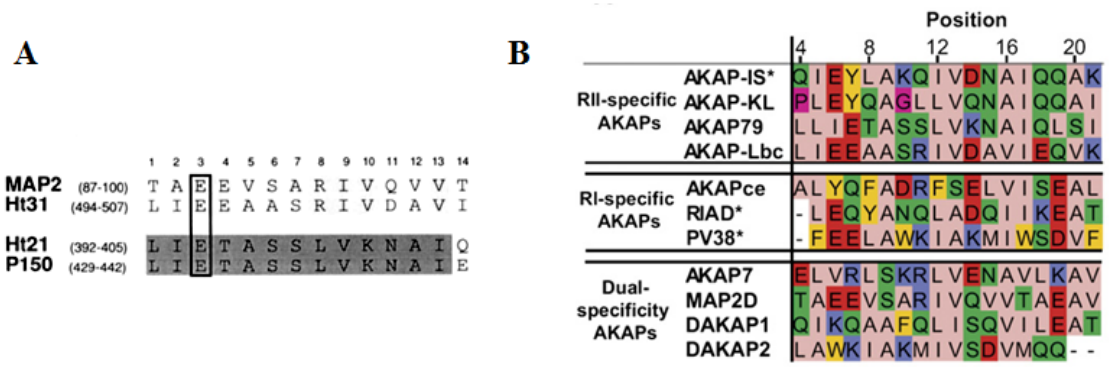


FIGURA 18. Motivos de las AKAPs que unen a subunidades reguladoras de PKA. A. Primer alineamiento de secuencias de diferentes AKAPs: MAP2, P150 y péptidos de unión específica a AKAPs obtenidos de una librería (Ht31 y Ht21) (Carr et al., 1991). B. Comparación entre secuencias de diferentes AKAPs (AKAPs de afinidad única para subunidades RI o RII de PKA y AKAPs de doble afinidad, o D-AKAPS) con péptidos sintéticos específicos de disrupción de la unión entre AKAP y RI o RII (*) (Gold et al., 2006).

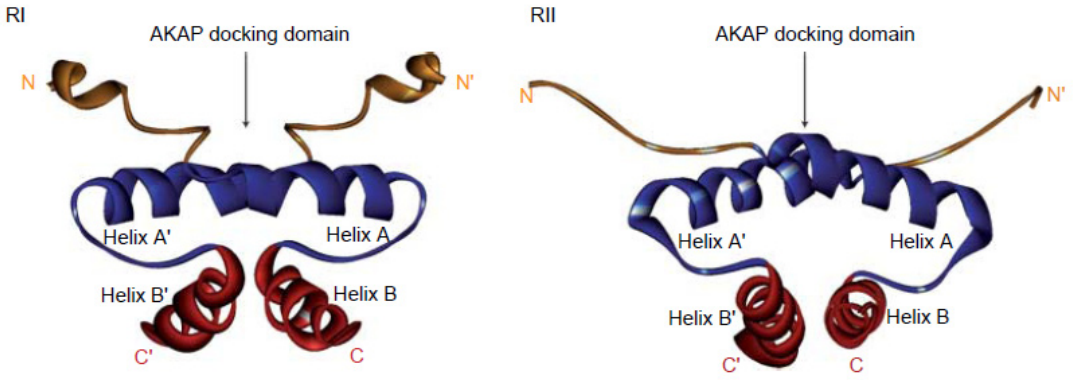


FIGURA 19. Comparación de los dominios D/D de los dímeros de las subunidades RI y RII de PKA y su superficie de interacción con AKAPs (Pidoux et al., 2010).

Cuando dimerizan por el dominio D/D, las subunidades RII proporcionan la superficie de unión a las AKAPs (Figura 17). Su región amino-terminal se puede dividir en dos regiones. La primera, constituída por los residuos del 1 al 23, forma la superficie de anclaje a las AKAPs. La segunda, compuesta por residuos del 24 al 44, cubre las uniones y los contactos entre las dos partes del dímero (Gold et al., 2006; Newlon et al., 2001; Pidoux et al., 2010). Mediante mutagénesis dirigida se descubrió que las isoleucinas 3 y 5 son esenciales para la unión de RIIα a AKAPs y que una deleción de la región del aminoácido 1 al 5 inhibía la unión a AKAPs sin interferir en la dimerización de las moléculas (Hausken et al., 1994). Las subunidades RI dimerizan de una forma similar aunque el dominio de dimerización incluye otros aminoácidos (de los residuos 12 al 61) (Figura 19) (Banky et al., 2003).

AKAPs y el control local de la producción de AMPc

Diversos estudios de imagen *in vivo* (mediante el uso de subunidades reguladoras y catalíticas fusionadas a moléculas fluorescentes que realizan FRET) han demostrado que los niveles de AMPc no están distribuidos de manera uniforme dentro de la célula, sino que su difusión se encuentra restringida en "microdominios" sujetos a un control muy dinámico (Zaccolo et al., 2002). Como he mencionado anteriormente, el flujo temporal de AMPc se regula por dos sets de encimas: las ACs y las PDEs. La regulación local de las variaciones de AMPc en microdominios dependerá, por lo tanto, de la localización de estas enzimas dentro de la célula (Pidoux et al., 2010).

Hoy en día se conocen interacciones entre AKAPs y ciertas PDEs que hacen que estas enzimas se localizacen también en compartimentos celulares específicos (como el centrosoma o membrana plasmática) contribuyendo así en la degradación local del AMPc y en el establecimiento de gradientes locales del mismo (Figura 20) (Beene et al., 2007; Pidoux et al., 2010). Aunque menos estudiadas, también se han detectado algunas interacciones entre diversas AKAPs y ACs, que en algunos casos contribuyen a la inhibición de estas últimas (Dessauer, 2009).

A través de las AKAPs, por lo tanto, PKA adquiere un nivel de control espacial mediante la regulación de la proximidad a sus sustratos. Facilita también un control temporal, ya se coloca de manera óptima en lugares donde se producen variaciones de AMPc discretas y reguladas, a su vez, de manera temporal. Además de esto, existe un mecanismo de feedback negativo por parte de PKA, que es capaz de activar PDEs y hacer que los niveles de AMPc bajen rápidamente (Pidoux et al., 2010). Puede regular también a algunas ACs como la ACV y la ACVI, que son fosforilables por PKA (Kamenetsky et al., 2006).

Además de las PDEs y de las ACs, las AKAPs pueden reunir miembros de otras rutas de señalización enzimáticas para formar complejos multiproteicos. Muy frecuentemente incluyen proteínas quinasas (como PKC, ERK y Epac) y fosfatasas (como PP1, PP2A y PPI) anclando así reguladores positivos y negativos de una misma señal (Beene et al., 2007).

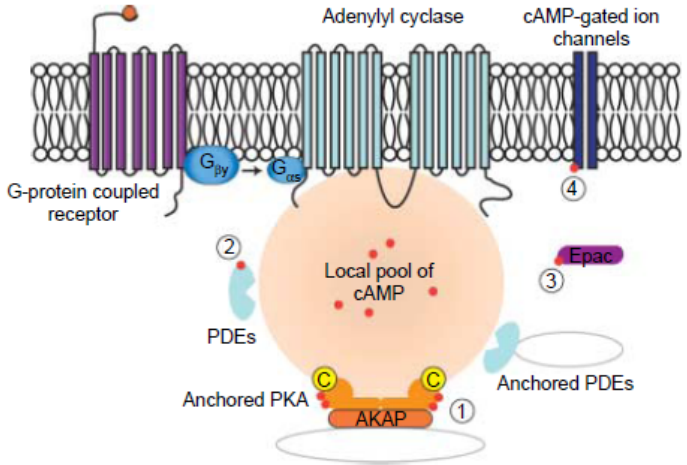


FIGURA 20. Ruta de señalización de cAMP en la que se observa a PKA en un compartimento subcelular anclada a una AKAP. Las PDEs, muy próximas a ésta, también se encuentran en en estructuras específical limitando la extensión y la duración de los gradientes de AMPc. (Pidoux et al., 2010) .

Localización intracelular específica de las AKAPs

Las AKAPs disponen de dominios de unión proteína-proteína o proteína-lípido específicos que les confieren la capacidad de localizarse selectivamente en un determinado compartimento celular. De esta manera, las AKAPs crean microdominios intracelulares que le permiten a la célula superar los problemas de interacción entre las proteínas que son poco abundantes y hacer que las señales generadas (como cambios en la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos, Ca2+ e inositol fosfato) sean locales y que alcancen niveles funcionales sólo en puntos de estrecha proximidad con la proteína de anclaje (Malbon et al., 2004). Se han identificado AKAPs asociadas a una gran variedad de compartimentos celulares, entre los que destacan los centrosomas, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, las mitocondrias, los microtúbulos, la membrana celular, la matriz nuclear y el citoesqueleto (Wong et al., 2004).

Mutantes de PKA y su relevancia en la vía de Hh

Estudios en diferentes especies han permitido relacionar a PKA que con la vía de Hh. Mutaciones de PKA que causan una reducción de su actividad dan lugar a fenotipos de ganancia de función de Hh, mientras que aumentos de la misma causan fenotipos opuestos.

El papel de PKA en el desarrollo se reveló a partir de mutaciones en el gen *DCO* de *Drosophila melanogaster* y que codifica para la subunidad catalítica de la misma. La pérdida de este gen causó defectos en la oogénesis y en la determinación del *patterning* (o patrón de expresión de proteínas) en el embrión que pudieron ser rescatadas por una sobreexpresión de una subunidad catalítica de PKA (Jiang et al., 1995; Li et al., 1995). Posteriormente en esta misma especie se descubrió que algunas de las mutaciones que se creían localizadas en del gen *Cos1* y que causaban fenotipos de ganancia de función de Hh eran en realidad mutaciones que causaban pérdidas de función del gen de C-PKA o ganancias de función del gen de RII-PKA (Collier et al., 2004).

De manera similar, la deficiencia de PKA en vertebrados o su inapropiada activación provoca defectos en patterning del tubo neural así como en de las somitas y de las extremidades. La sobreexpresión de una molécula reguladora de PKA de *Drosophila melanogaster* que contiene una mutación que le impide activarse por AMPc (y por lo tanto, no le permite liberar a la subunidad catalítica) actúa como dominante negativa de PKA en pez zebra y tiene un fenotipo similar a la expresión ectópica de *Sonic* e *Indian Hedgehog* en esta especie (Concordet et al., 1996). Ambos fenotipos pueden ser rescatados mediante la expresión de una subunidad catalítica de PKA de ratón (Hammerschmidt et al., 1996). Como ocurre en el pez, los ratones transgénicos que contienen una subunidad RIα dominante negativa también poseen una activación ectópica de la vía de Shh en el CNS dorsal que imita la expresión ectópica de Shh (Clegg et al., 1987; Epstein et al., 1996). Las sucesivas supresiones de los alelos de las subunidades Cα y Cβ de ratón dan lugar a defectos en el patterning. Los ratones que retienen un solo alelo de Cα o Cβ (Cα-/+ Cβ-/- o Cα -/- Cβ-/+) sufren una dramática expansión del tubo neural en las regiones torácica y lumbar (con un 100% de penetrancia) y un fallo en el cierre del tubo neural en un 25% de los casos.

Tiene lugar una expansión de los marcadores ventrales y una reducción o ausencia de los dorsales por un incremento en la señal de Shh. La pérdida completa de la actividad PKA (Cα-/- o Cβ-/-) resulta en letalidad embrionaria temprana debido al amplio rango de funciones esenciales que posee PKA en procesos como la replicación del ADN, el ciclo celular y la activación del genoma del zigoto (Huang et al., 2002). Por el contrario, la manipulación farmacológica de PKA mediante el uso de Forskolina (FSK) o análogos de AMPc bloquea por completo la habilidad de Sonic Hedgehog de inducir las neuronas dopaminérgicas o los marcadores de la vía desde la placa del suelo (Hynes et al., 1995).

EL CILIO PRIMARIO

Hasta hace muy poco, la vía de señalización de Shh en la mayoría de especies se consideraba conservada casi en su totalidad con la de *Drosophila melanogaster*, especie en la que se descubrieron muchos de los eventos que tienen lugar durante la transducción de la señal. No obstante, recientemente se añadió un factor de complejidad en la ruta de vertebrados: el *cilio primario*. De manera que hoy en día no considera a la membrana plasmática de la célula como una unidad capaz de responder a Shh por igual en cualquier zona por donde se la estimule, si no que es en la membrana ciliar donde tiene lugar el inicio de la señalización de la vía de Shh ya que tanto el receptor como muchos otros componentes de la misma se acumulan en el cilio primario.

Cilios y Flagelos. Introducción general.

Los cilios y los flagelos de los organismos eucariotas son finas proyecciones intracelulares de las células que cumplen importantes funciones de movimiento o sensorial.

Los cilios (del latín *cilium*, ceja) son característicos exclusivamente de los organismos eucariotas (con la excepción de los que tienen pared celular). En vertebrados, prácticamente todos los tipos celulares tienen cilios o proceden de células que los tuvieron (Satir et al., 2007)

El término flagelo, en cambio, es un poco ambiguo ya que se usa para referirse tanto a los órganos móviles de los organismos eucariotas como al de los procariotas, estructuras que no son homólogas y que difieren mucho en su organización y en su composición. Además, los flagelos de los procariotas son estructuras extracelulares rígidas y no móviles por sí mismas mientras que los flagelos de los eucariotas son intracelulares e intrínsecamente móviles. En 1980 y ante el reclamo de los bacteriólogos por el término flagelo, Lynn Margulis propuso incluir a los cilios y los flagelos de los organismos eucariotas en el término undulipodio (del latín *undula*, onda pequeña; del griego *podos*, o pie). Los *undulipodios* difieren entre sí por su tamaño (de 2 a 15 µm en los cilios y de hasta varios milímetros en los flagelos), el número por célula (los flagelos son únicos mientras que los cilios suelen encontrarse en múltiples copias, a excepción de los cilios nodales o primarios) y por el patrón de movimiento (los cilios baten como un remo, son inmóviles o crean un vórtice mientras que los flagelos ondulan) (Lynn et al., 1992). Además de estas diferencias estructurales, los cilios y los flagelos de los eucariotas difieren entre sí por su función: los flagelos son capaces de

propulsar a la célula por un líquido mientras que los cilios se sitúan en células estacionarias y, gracias al impulso que realizan y a la sincronización de su batido, son capaces de mover un fluido y a los elementos contenidos en él. Ambos se componen por tubulinas pero los flagelos poseen, además, otros cientos de proteínas muy bien organizadas.

Estructura, Clasificación y Función de los Cilios.

Estructura básica de los cilios

Los cilios tienen una esteriotipada estructura microtubular, denominada *axonema*, que se proyecta hacia fuera de la superficie celular desde uno de los centriolos modificados (el centriolo madre o *cuerpo basal*) que lo ancla a la célula (Figura 21A). Éste se encuentra unido, a su vez, a la membrana plasmática gracias a las unas fibras microtubulares denominadas *fibras de transición* o escudos alares. El axonema ciliar se encuentra revestido por la *membrana ciliar*: una bicapa lipídica que es continua con la membrana plasmática de la célula (como si fuese una evaginación de la misma) pero que difiere de esta última en su contenido proteico. Ésta posee una gran cantidad de receptores y de canales iónicos, lo que la hace una estructura altamente especializada. Las estructuras responsables de esta diferencia proteica son el *bolsillo ciliar* y el *collar ciliar*. El primero es una profunda hendidura de doble membrana en forma de vaina que envuelve la base del cilio. El collar ciliar es un complejo formado por las fibras de transición y una gran cantidad de vesículas de membrana dispuestas en forma de collar de perlas en espiral y que se sitúan donde estas fibras contactan con la membrana, en la zona de transición. Esta zona se denomina así porque es el lugar donde se da la transición entre los tripletes de microtúbulos del cuerpo basal con los dobletes de microtúbulos del axonema ciliar (Figura 21 B y C) (Pedersen et al., 2008).

Por analogía con el poro nuclear y por su relación filogenética, a este collar ciliar se le denomina también *complejo del poro ciliar* ya que, junto con la estructura interna del centriolo madre modificado, restringe el tamaño de moléculas que entran en el compartimento ciliar (Figura 21 B y C). El complejo del poro ciliar funciona como una puerta de entrada altamente regulada en la que se acumulan, antes de entrar en el compartimento ciliar, los precursores ciliares y las proteínas encargadas del transporte intraciliar (Praetorius et al., 2005; Rosenbaum et al., 2002; Satir et al., 2007)

Clasificación y Función de los cilios

Los cilios de los organismos eucariotas se clasifican en dos grandes grupos: *inmóviles* o primarios y *móviles* o secundarios. Estos tipos de cilios son fácilmente distinguibles por el patrón de axonema que poseen, que se abrevia según el número de microtúbulos externos o dobletes externos (compuestos por subfibras del tipo A y B, unidas por nexinas) y a los pares centrales de microtúbulos o dobletes internos. El axonema típico de los cilios móviles se designa por la conocida fórmula 9+2, que consiste en un anillo de 9 pares de dobletes externos y dos pares de dobletes internos (Figura 23). Estos cilios contienen también estructuras accesorias involucradas en la movilidad: brazos internos y externos de dineína, extensiones radiales y un par de proyecciones centrales (Figura 23). Suelen encontrarse en múltiples copias por célula

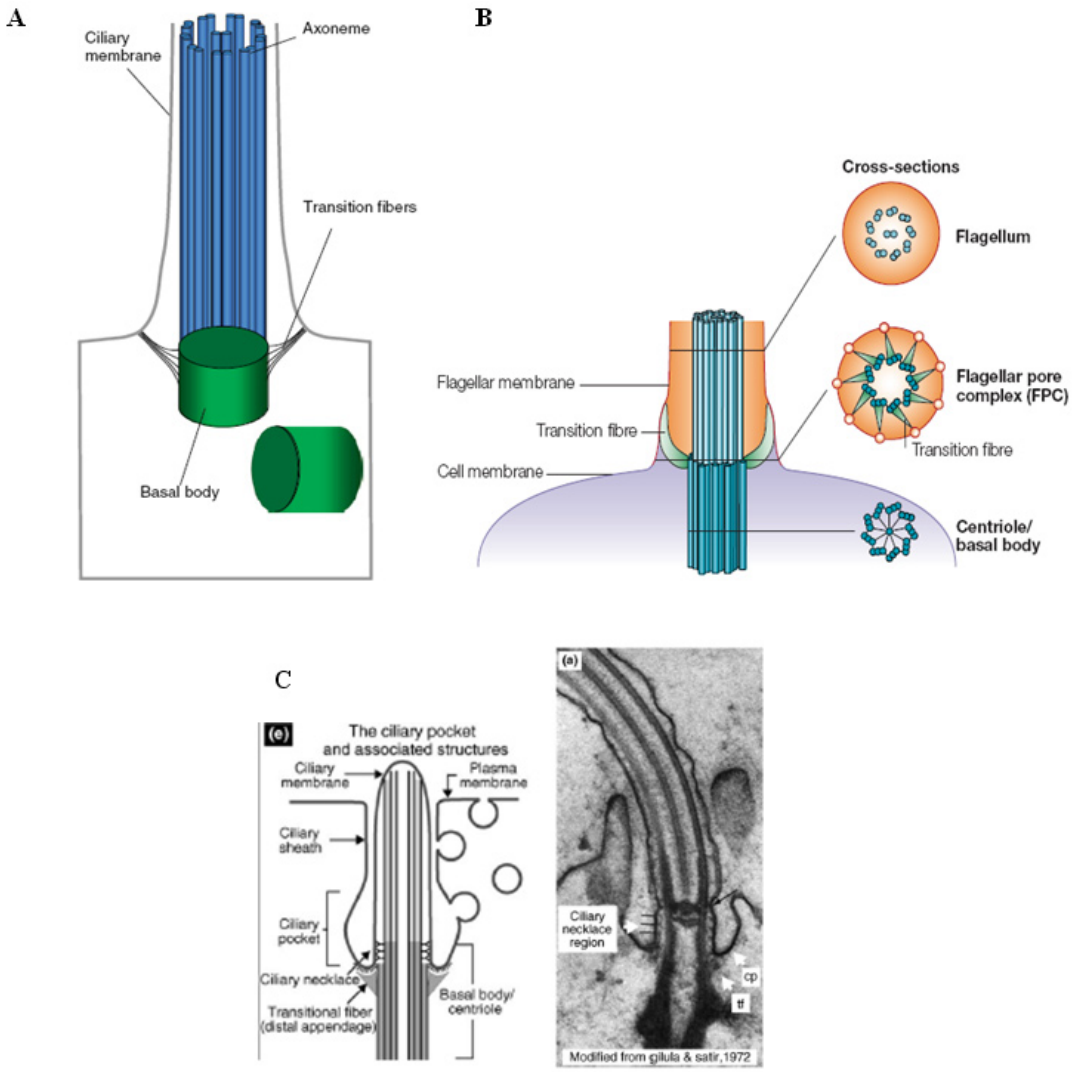


FIGURA 21. A. Esquema representativo de las partes de los cilios y flagelos (Pedersen et al., 2008a). B. Cortes transversales de las diferentes partes de un cilio. FPC, complejo del poro flagelar (ciliar) (Rosenbaum et al., 2002). C. Estructura más detallada de la membrana en la zona del bolsillo ciliar (Rohatgi et al., 2010).

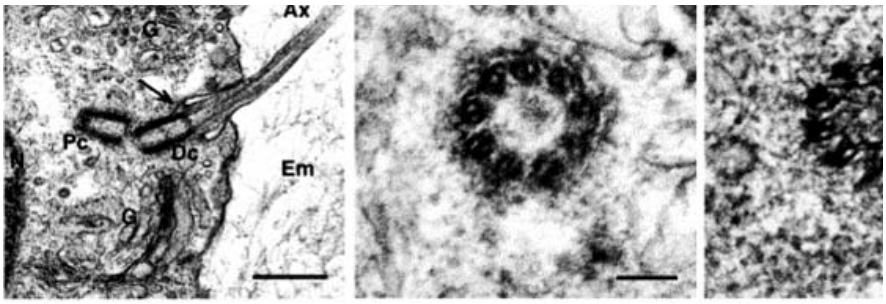


FIGURA 22. Micrografía electrónica (M.E) de un cilio y de sus dos centriolos. A. Proximidad entre los dos centriolos. Pc, Centriolo Proximal; Dc, centriolo distal. El axonema del cilio (Ax) emerge del Dc. B y C. Secciones transversales del Pc y del Dc o cuerpo basal (respectivamente) en las que se observa una gran diferencia en su estructura interna (Praetorius et al., 2005).

(como ocurre en el caso de las células de las superficies epiteliales del sistema respiratorio y de los oviductos o las células ependimales de los ventrículos del cerebro adulto) y su función concreta es la de transportar fluidos y sustancias a lo largo de la superficie epitelial mediante la sincronización de sus batidos.
Dentro de los cilios móviles existe una excepción: el cilio de las células de blastocisto del nodo embrionario. Este cilio posee una estructura 9+0 ya que carece del par de dobletes centrales responsables del movimiento de batida pero conserva los brazos de dineína externos. Su función es la de rotar para crear un flujo direccional de un lado a otro del nodo embrionario, necesario para el establecimiento de la asimetría bilateral en los embriones (Hirokawa et al., 2006).

Al igual que estos últimos, los cilios inmóviles o primarios están compuestos por un axonema 9+0. No disponen de los dobletes centrales, los brazos externos e internos de dineína ni del resto de accesorios responsables de la movilidad (Figura 23).

Algunos cilios altamente especializados (como los cilios de los de los órganos sensoriales olfatorios de los vertebrados o los fotorreceptores de la vista: los conos y los bastones), poseen una extensión del cilio primario con un axonema atípico en la parte distal formado por extensiones de las subfibras tipo A.
Los cilios inmóviles canónicos también tienen una excepción: los cilios de las células del oído interno, provistas de un axonema 9+2 pero que se consideran inmóvil.

A diferencia de los cilios móviles, el cilio primario se encuentra presente en una copia única en la mayoría de los tipos celulares de los vertebrados. A pesar de que su descubrimiento tuvo lugar hace unos 100 años por los citólogos, su función concreta se desconocía y fue considerado durante mucho tiempo un órgano vestigial. En una primera hipótesis se le atribuyó la función de inhibir la división celular mediante el secuestro del centriolo. Este pensamiento no es del todo incorrecto ya que la mayor parte de células

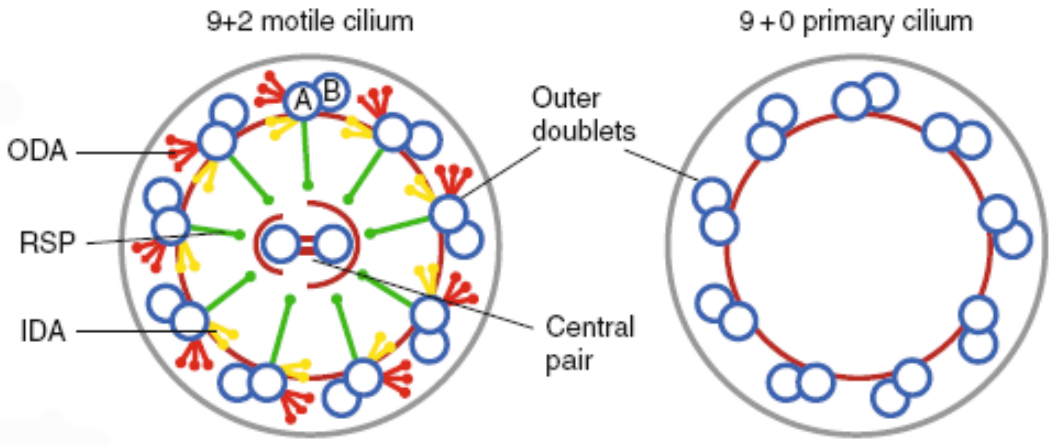


FIGURA 23. Diferencias entre el axonema de cilios móviles (9+2) y cilios primarios no móviles (9+0). ODA e IDA, brazos externos e internos de dineína, respectivamente; RSP; extensiones radiales (Pedersen et al., 2008a).

que tienen cilio son células que están en estado quiescente (Satir et al., 2010). En la última década se relacionó con importantes funciones como lo son la regulación y coordinación de procesos celulares en el desarrollo, entre los que se incluyen la migración celular, la diferenciación o re-entrada en ciclo celular, la especificación del plano de división celular y la apoptosis (Pedersen et al., 2008a; Praetorius et al., 2005).

El ciclo celular, el centriolo y el cilio primario

El axonema ciliar se desarrolla y se ancla al centriolo madre (o centriolo distal), que dará lugar al cuerpo basal. El proceso de ciliogénesis está acoplado, por lo tanto, a la maduración y a la duplicación de los centriolos. Al ser una estructura diplosomal, el otro centriolo (el centriolo proximal) se encuentra unido al distal y está muy próximo al aparato de Golgi (Praetorius et al., 2005). Además de servir como cuerpos basales del cilio, los centriolos tienen la importante función formación de los husos mitóticos durante la fase de división celular. Los cilios se consideran estructuras post-mitóticas que sólo están presentes en células quiescentes y, hasta el momento, no se han observado células que contengan ambas estructuras. En las células que poseen cilio primario y que tienen capacidad para proliferar, la ciliogénesis está altamente coordinada con la progresión del ciclo celular. En la fase G los centriolos organizan la matriz pericentriolar (PCM) para formar el centrosoma, que dará lugar al denominado centro organizador de los microtúbulos (MTOC). En la fase de síntesis del ciclo celular (S) se forman los centriolos hijos por duplicación del centrosoma que, en la siguiente fase de mitosis (M), serán capaces de funcionar como centriolos parentales. En G2 se acumulan más PCM para organizar a los microtúbulos durante la mitosis (Nigg et al., 2009)..

En G2/M los centriolos madre se distinguen de los hijos por la presencia de los denominados *apéndices distales* y *subdistales*, estructuras accesorias necesarias para la migración y para el anclaje del centriolo madre a la membrana (Nigg et al., 2009; Pedersen et al., 2008a). Una vez esto sucede, los apéndices dan lugar a las fibras de transición uniendo el cuerpo basal a la membrana y estabilizando la estructura del cilio. En caso de no formarse los apéndices, la ciliogénesis se inhibe. La polimerización del axonema tiene lugar en Go/G1, tras el anclaje del centriolo madre a la membrana (Figura 25) (Pedersen et al., 2008b; Pedersen et al., 2008a). Se cree que la función concreta de los centriolos es la formación de los cilios y de los flagelos ya que los organismos aciliados eucariotas no poseen centriolos (Marshall, 2009).

Aunque la desaparición del cilio primario y la reentrada en mitosis son dos procesos que están altamente coordinados, la pérdida del cilio no es un requisito para la entrada en el ciclo celular ya que si se impide su desaparición no se inhibe la entrada en mitosis. Por otro lado, la disrupción del cilio primario tampoco induce fenotipos de proliferación descontrolada.

El mecanismo molecular exacto implicado en la formación y en la desaparición del cilio durante las fases del ciclo celular se desconoce. En *Chlamydomonas* se sabe que para la elongación del cilio se requiere la desinhibición de dos proteínas del centrosoma que actúan como supresoras de la ciliogénesis: *Cep19* y *CP110*. La depleción de ambas resulta en la aparición de marcadores ciliares bien establecidos en células que todavía no han salido del ciclo. Por el contrario, la

regulación de la transición G2/M a través de Cdc2-Ciclina B activa a quinasas de la familia de Nek y AurA responsables de que el cilio se despolimerice (Figura 24) (Gerdes et al., 2009).

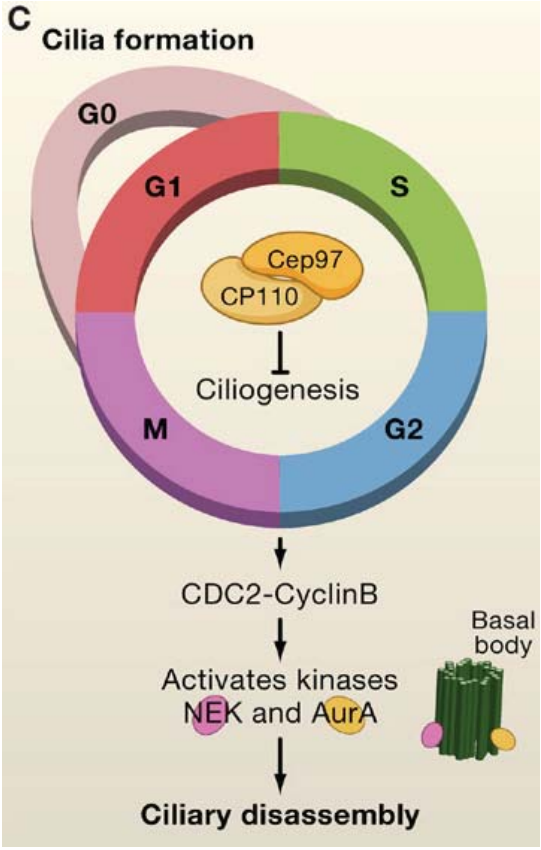


FIGURA 24. (Gerdes et al., 2009).

La ciliogénesis

Durante la década de los 60' Sorokin describió dos tipos de ciliogénesis en base al análisis de imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM). En las células epiteliales, el centriolo madre se ensambla directamente a la membrana apical y desde allí el axonema 9+0 crece hacia el medio extracelular. La formación de los cilios móviles (9+2) en células epiteliales multiciliadas se da de una manera muy similar pero posteriormente a la multiplicación de los cuerpos basales por un mecanismo acentriolar cuyas bases moleculares exactas se desconocen (Sorokin, 1968a; Sorokin, 1968b).

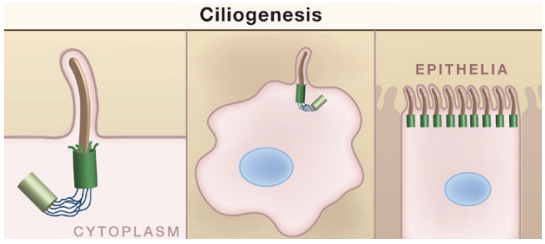


FIGURA 26. Célula con un único cilio primario y célula epitelial multiciliada (Nigg et al., 2009).

Por otro lado, los estudios de Sorokin en células musculares demostraron que la producción del cilio se inicia dentro de la célula y propuso tres estadios tempranos de formación del cilio primario: en una primera fase, una vesícula derivada del aparato de Golgi (vesícula centriolar) se une al centriolo madre, desde el cual emergerá el axonema (Figura 27A a, h). A medida que el centriolo se mueve, la vesícula comienza a invaginarse y el centriolo forma las estructuras accesorias para convertirse en el centriolo distal (Figura 27A b); en una segunda etapa tiene lugar una fusión de nuevas vesículas (vesículas centriolares secundarias) que formarán una vaina y envolverán el axonema que comienza a elongarse (Figura 27A c, h y 27B); y, por último, cuando la membrana que rodea el axonema alcanza la superficie celular, se fusiona con ésta dando lugar a la estructura en forma de copa o collar ciliar y que consiste en múltiples hebras de partículas intra-membrana conectadas con el centro del centriolo madre (Figura 27A d y 27B) (Sorokin, 1968a).

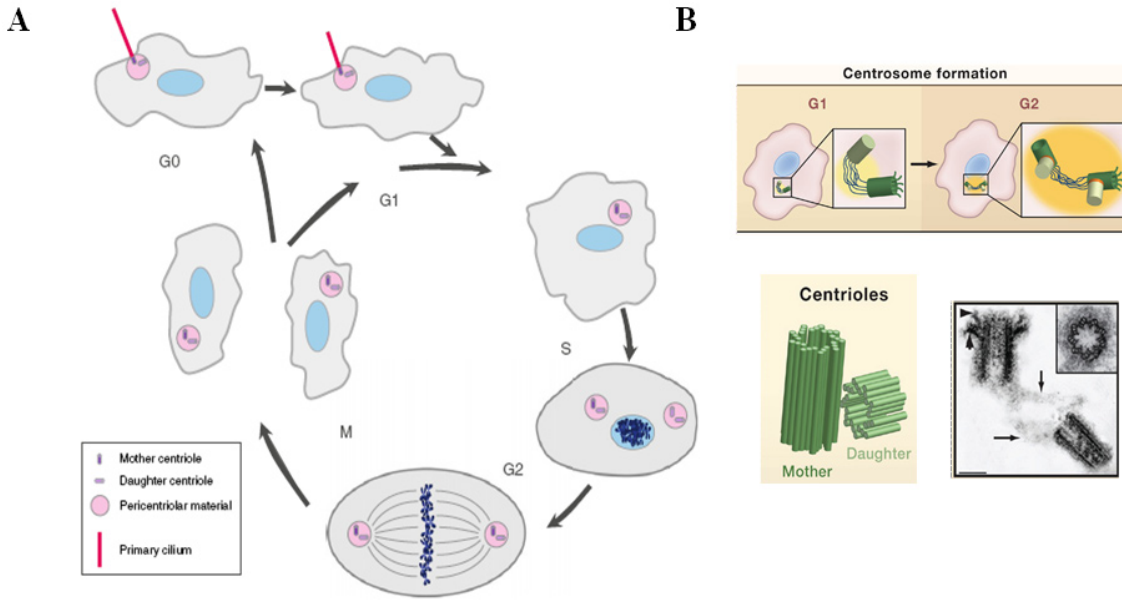


FIGURA 25. A. El cilio primario y el ciclo celular. El cilio se forma en la fase G0/G1, tras el anclaje del centriolo madre en la membrana plasmática (Pedersen et al., 2008a). B. Arriba, Formación del centrosoma y acumulación del material pericentriolar en G2. Debajo, M.E de apéndices distales y subdistales del centriolo madre (Nigg et al., 2009).

El transporte intraflagelar (IFT)

Los cilios y los flagelos se alargan desde la base del cilio por extensión de su punta distal, donde posteriormente tiene lugar un continuo recambio del material del axonena (por polimerización y despolimerización del mismo). En *Chlamydomonas renhardtii* y en *Caenorhabditis elegans* se determinó que el responsable del ensamblaje y del mantenimiento de los flagelos era el sistema de *transporte intraflagelar* (IFT) (Rosenbaum et al., 2002; Witman, 1975). Este sistema mueve tanto material del axonema como a las proteínas de membrana y a otras moléculas "cargo" desde su lugar de síntesis en la célula hacia la punta del cilio. En esta dirección de movimiento de partículas está implicado el denominado *complejo motor de transporte anterógrado* mientras que el responsable del retorno de los productos a ser reciclados desde la punta hacia a la base del cilio es el *complejo motor de transporte retrógrado*. Otros dos subcomplejos de IFT se acoplan y cooperan con el sistema motor anterógrado y retrógrado: los complejos B y A, respectivamente. En total, los complejos A y B se componen de más de 17 polipéptidos ricos en dominios de interacción proteína-proteína transitoria, por lo que se les atribuye la función de unir a las proteínas cargo (Pedersen et al., 2008b).

Muchos de los componentes de la maquinaria del complejo motor quedan aún por identificar. Recientemente se descubrieron nuevas moléculas asociadas al IFT como las proteínas BBS (Síndrome de Bardet Biedl) o DYF-1 (activadora de la quinesina) (Inglis et al., 2006).

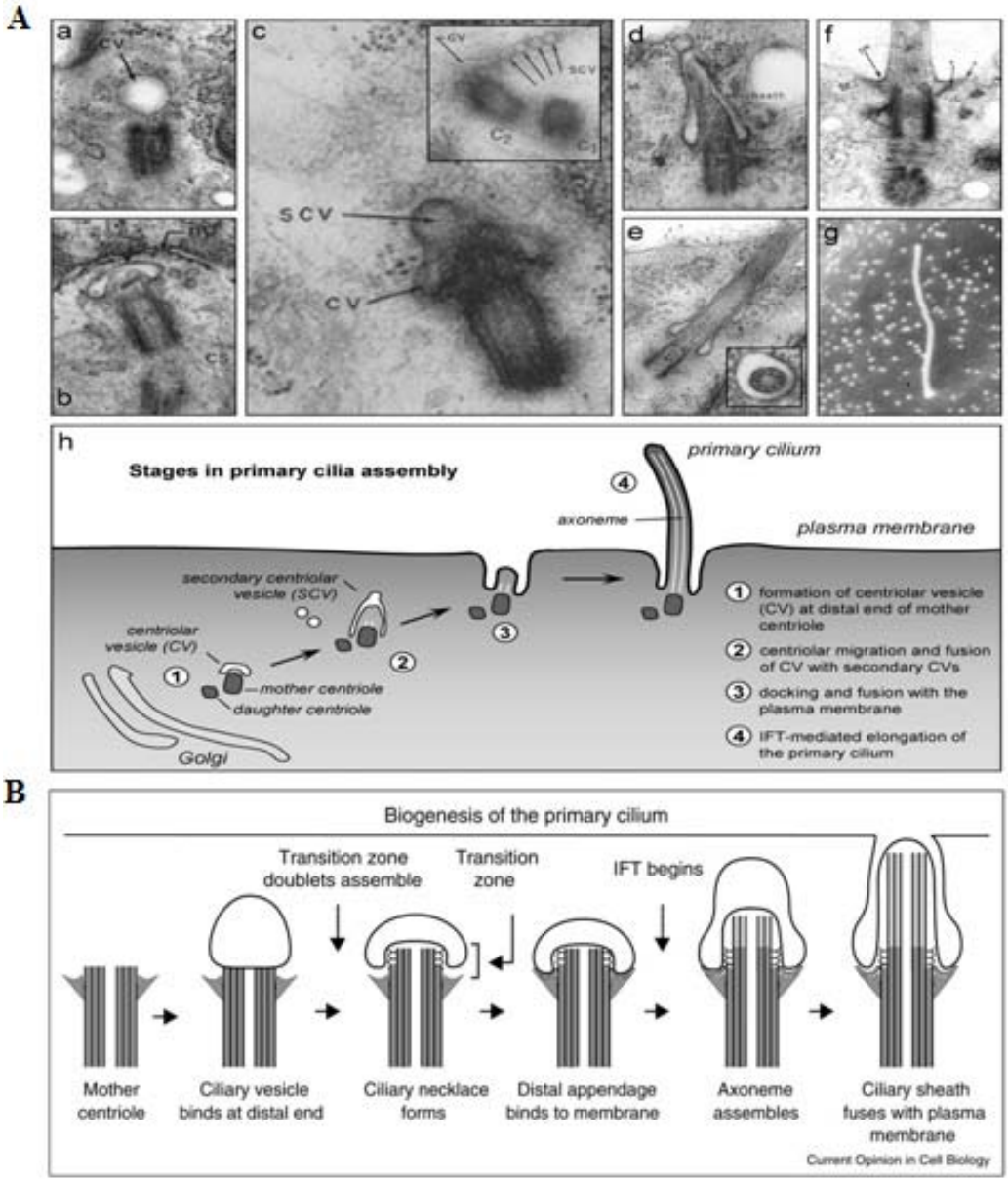


FIGURA 27. A. Estadios de formación del cilio primario. CV, vesícula centriolar. SCV, vesícula centriolar secundaria. (Pedersen et al., 2008b). B. Esquema resumen de las fases de formación del cilio primario (Rohatgi et al., 2010). En un cuarto estadio adicional, el axonema emergente se alarga gracias al transporte intraflagerlar y que dará lugar al cilio primario maduro (Figura 27A, h). Las observaciones de Sorokin sugirieron que, a diferencia de las células epiteliales, en otros tipos celulares la formación del cilio puede originarse cuando el centriolo madre se coloca cerca del aparato de Golgi y del núcleo, antes de migrar y de anclarse en la membrana (Pedersen et al., 2008b).

Transporte anterógrado: quinesina-2 y complejo B

En *Chlamydomonas renardthi*, se descubrió que el gen *FLA10* codificaba para la proteína *quinesina motora 2* y que era el responsable del transporte anterógrado ya que mutantes del mismo daban lugar a una pérdida o acortamiento del flagelo (Kozminski et al., 1995; Rosenbaum et al., 2002).

En la mayoría de especies el complejo motor anterógrado canónico es hetero-dimérico y se compone principalmente por dos subunidades motoras de la familia de quinesina-2 (conocidas en mamíferos como *Kif3A* y *Kif3B* de 90 y 85 kDa, respectivamente) y una subunidad no motora que se asocia a quinesina (denominada *KAP*, de 100 kDa). En mamíferos existe una tercera subunidad denominada *Kif3C* que se expresa preferentemente en tejido neural y que se asocia con Kif3A/KAP (Figura 29). Otras quinesinas adicionales como la quinesina homo-dimérica y otros miembros de la familia cooperan con este complejo principal en la correcta formación y funcionamiento del cilio. Existe, por lo tanto, una gran diversidad estructural y funcional en el IFT anterógrado. Hace poco se demostró en *C.Elegans* que OMS-3 (el homólogo de Kif17 de mamíferos) coopera con la quinesina-2 en el transporte anterógrado de únicamente los segmentos mediales y distales del cilio (Pedersen et al., 2008b).

En el erizo de mar, la inyección de anticuerpos específicos contra subunidades motoras de quinesina 2 da lugar a blástulas con cilios que carecen el par central de microtúbulos del axonema. En el ratón, en cambio, impide el correcto ensamblaje del cilio nodal (Rosenbaum et al., 2002). Mutaciones específicas de Kif3A en fotorreceptores de ratón mediante el sistema Cre-loxP dan lugar a defectos en el IFT y a grandes acumulaciones de la proteína opsina y de arrestina en membrana y dentro del cilio especializado, respectivamente. La inactivación del gen *Kif3A* en el riñón de ratón no permite la correcta formación del cilio y hace que se desarrollen múltiples quistes en el órgano (Pedersen et al., 2008b).

El complejo motor B que coopera con la quinesina 2 está formado por partículas de IFT que contienen unos 10 polipéptidos. Transporta precursores del axonema desde el citoplasma al compartimento ciliar y por dentro de éste. En general, una pérdida completa de cualquiera de los polipéptidos del complejo B da lugar a una inhibición en la formación del cilio primario. IFT88/Polaris es uno de los más estudiados (Figura 29) (Pedersen et al., 2008a).

Transporte retrógrado: dineína1b citoplasmática y complejo A

La *dineína 1b citoplasmática* (una isoforma de cadena pesada de la dineína 2) es la responsable del transporte retrógrado. Esta proteína forma complejos multi-proteicos que contienen una o más proteínas de cadena pesada de la familia de las ATPasas AAA+ así como varias proteínas accesorias necesarias para la regulación de la actividad motora y para la unión del cargo. Hasta se ahora han identificado y caracterizado 4 subunidades diferentes de dineína 1b citoplasmática: una específica de cadena pesada (Dync2h1) que en mamíferos se encuentra en cilios de varios tejidos y tipos celulares; un intermediario de cadena ligera (Dync2li1); un putativo de cadena intermedia (IC/WC) y uno de cadena ligera (LC) (Pedersen et al., 2008b).

La participación de la dineína en el IFT retrógrado se observó por primera vez en mutantes en el gen *LC8* de Chlamydomonas que dan lugar a flagelos cortos en los que se

acumulan grandes cantidades de partículas de polipéptidos de IFT. Su implicación definitiva se confirmó en mutantes para los genes *DHC1b* y *D1bLIC* (de Dync2h1 y Dync2li1, respectivamente) y que también dieron lugar a flagelos cortos con acumulaciones aún mayores de partículas de IFT (Pedersen et al., 2008b; Rosenbaum et al., 2002). En ratón, la lesión de cualquiera de estos genes da lugar a la aparición de cilios cortos, con forma de muñón y rellenos de partículas de IFT en el mesénquima del neuroectodermo y en los miembros (Pedersen et al., 2008b).

Al igual que el transporte anterógrado, el transporte retrógrado requiere de una serie de 6 polipéptidos del complejo A. En en este caso no siempre son necesarios para la formación del axonema ciliar ya que los fenotipos observados en sus mutantes varían según el organismo y el tipo celular. Algunos dan lugar a una pérdida total del cilio o flagelo y otros resultan en cilios acortados donde se acumulan proteínas del complejo B en su punta distal (Pedersen et al., 2008b).

Los dos complejos del sistema del IFT funcionan de una manera muy dinámica. Una vez descargados los precursores del axonema en la punta distal, la quinesina 2 se inhibe y la dineína citoplasmática se activa y une al complejo A. El complejo B se reasocia con el A y con los productos ciliares a ser reciclados hacia el cuerpo celular. Una vez la dineína llega a la base del cilio ocurre lo contrario (Pedersen et al., 2008a). Como las partículas de IFT se mueven de modo unidireccional pero sin detenerse ni revertir su dirección, ambas proteínas del complejo motor deben ser recicladas hacia el compartimento desde el cual provienen. Existen evidencias de que algunos precursores de moléculas del IFT son proteínas cargo ciliares y que se transportan en partículas de IFT (Qin et al., 2004).

La principal fuente de conocimiento de la maquinaria proteica y de la biología básica del IFT proviene del estudio de flagelos inmovilizados de *Chlamydomonas renhardtii*. Kozminski fue el primero en observar la bidireccionalidad con microscopia de

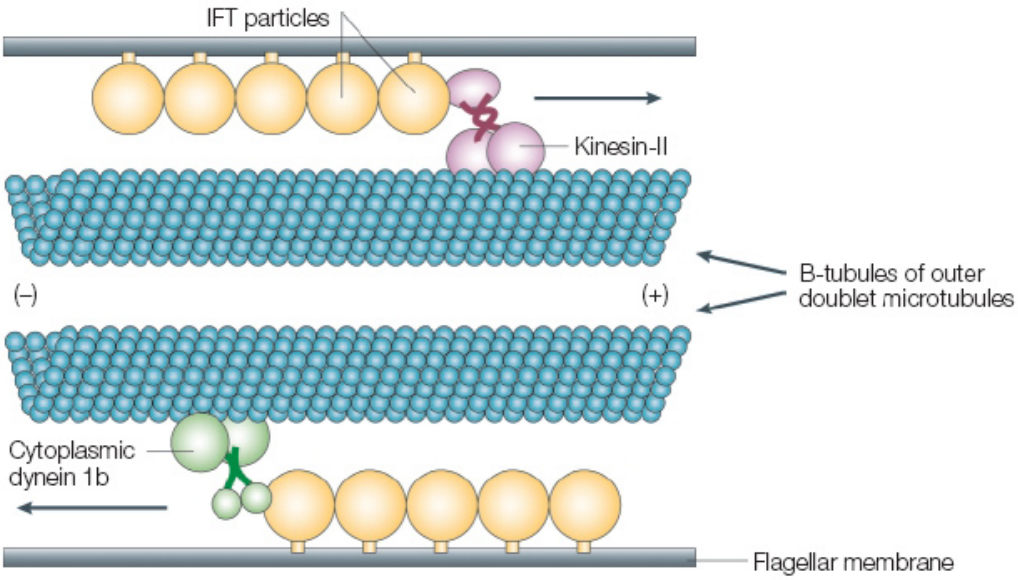


FIGURA 28. Modelo de transporte IFT. La quinesina 2 del ITF anterógrado mueve moléculas cargo hacia la punta del cilio y la dineína1b citoplasmática realiza el IFT retrógrado y devuelve partículas de IFT a la base del cilio (Rosenbaum et al., 2002).

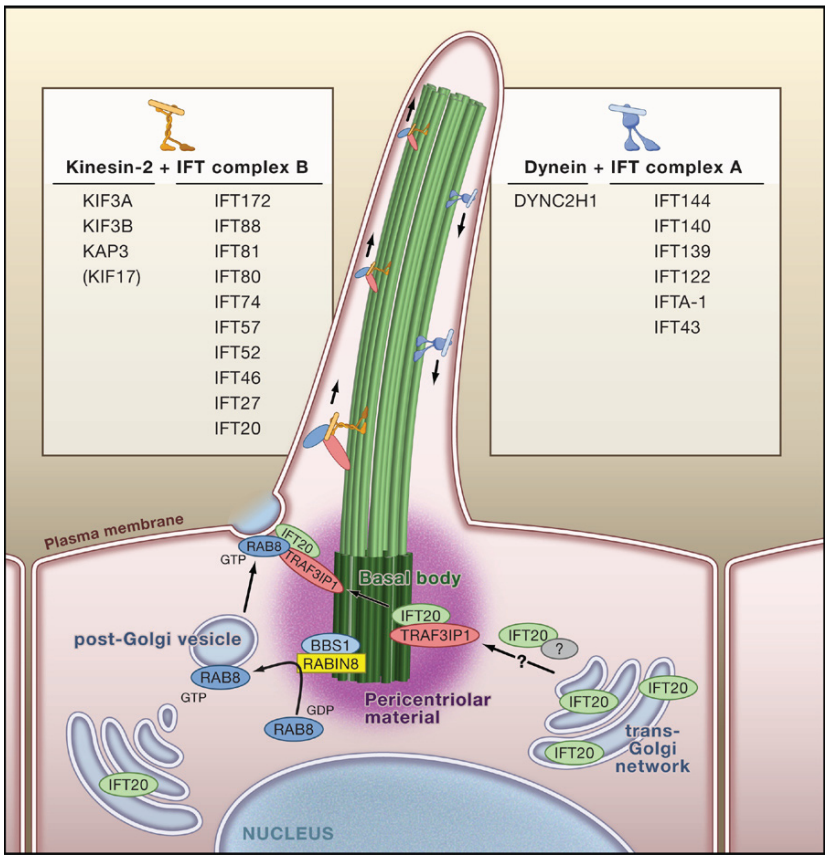


FIGURA 29. Complejos motores anterógrado (quinesina 2) y retrógrado (dineína 1b) y los polipéptidos del complejo B y A a los que se asocian, respectivamente (Gerdes et al., 2009).

contraste DIC (Differential Interference Contrast) y describió un continuo movimiento de partículas granulares por debajo de la membrana. Determinó también que la velocidad de movimiento del IFT anterógrado era de unos 2-2.5 µm.s-1 mientras que la del transporte retrógrado era un poco superior, de unos 3.5-4 µm.s-1 (Kozminski et al., 1993). Posteriormente, mediante el uso de microscopía electrónica TEM (Transmission Electron Microscopy), Kozminski descubrió que estas partículas se situaban entre la membrana ciliar y las subfibras tipo B de los dobletes de MT del axonema (Figura 30) (Kozminski, 1995).

Recientemente, el movimiento del IFT se ha observado mediante el uso de partículas y de subunidades motoras de IFT fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP) en neuronas sensoriales de *C. Elegans* y en cilios primarios de células de riñón (Pedersen et al., 2008b; Pedersen et al., 2008a).

Regulación del IFT

Los mecanismos de regulación del IFT más estudiados son del complejo motor anterógrado. Algunos análisis de mutaciones han revelado la posibilidad de que algunas quinasas estén

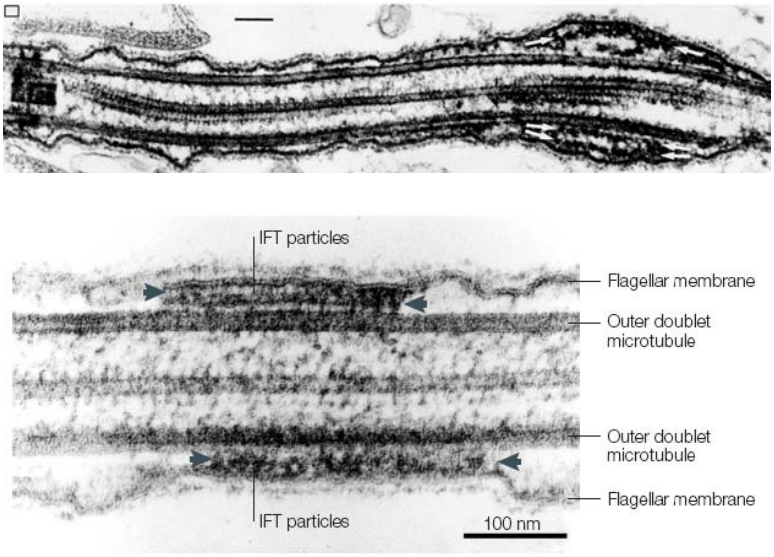


FIGURA 30. M.E de Partículas de IFT situadas entre la membrana y el axonema de flagelos de Chlamydomonas renhardtii (Praetorius et al., 2005; Rosenbaum et al., 2002)

regulando potencialmente la actividad de la quinesina 2 mediante la fosforilación. Entre éstas se incluyen a: MAP quinasas, quinasas relacionadas con NIMA, GSK3β y proteínas polares asociadas. La subunidad KAP de la quinesina 2 se regula mediante cambios que median o su localización en la base del flagelo o su movimiento progresivo a lo largo del mismo. La poliglutamilación de la tubulinas también influye en la progresión y en la velocidad de movimiento del complejo de la quinesina 2 en el cilio (Pedersen et al., 2008a). Las proteínas BBS también juegan un papel importante en el mantenimiento de las dos kinesinas motoras juntas y en el ensamblaje del cilio en algunos tipos celulares (Pedersen et al., 2008b).

La modulación del transporte retrógrado es bastante más desconocida. Se sabe que LC8 tiene un papel importante en la entrada del complejo motor de dineína ya que su mutante no permite la entrada de ésta en el complejo flagelar. El Ift172 parece estar implicado en la transición de los complejos motores de ITFs en la punta distal (Pedersen et al., 2008a; Rosenbaum et al., 2002).

Además de los mecanismos que afectan a la actividad motora, existen otros mecanismos de regulación a nivel de la asociación de proteínas cargo a las partículas IFT antes de entrar en el compartimento ciliar.

Transporte selectivo de moléculas al compartimento ciliar

Los cilios carecen de la maquinaria de producción *de novo* de proteínas y, por ello, tanto las proteínas del axonema como las proteínas solubles de la matriz ciliar son

sintetizadas en el citoplasma en ribosomas libres, modificadas post-traduccionalmente e importadas al cilio para ser transportadas por el IFT (Pazour et al., 2008). En Chlamydomonas se observó que los polipéptidos de las partículas IFT, junto con las subunidades motoras y los precursores flagelares, se encontraban altamente concentrados en el collar ciliar, donde las fibras de transición contactan con la membrana. Esto sugirió que el IFT se inicia en esta región, en la que tendrían lugar tanto la asociación de las moléculas cargo con las partículas de IFT como el reconocimiento de las secuencias específicas para la localización ciliar (Rosenbaum et al., 2002). El collar ciliar, como he mencionado anteriormente, comparte con el complejo del poro nuclear la función de selección y por ello se le denomina complejo del poro ciliar. Funciona como una barrera selectiva de proteínas e impide la difusión de moléculas desde el citoplasma al compartimento ciliar. De esta manera previene la entrada de vesículas de membrana y de ribosomas y le confiere a la matriz ciliar una composición distinta a la del citoplasma (Pazour et al., 2008).

De manera similar a lo que ocurre con la matriz ciliar respecto al citoplasma celular, las membranas ciliares tienen una composición diferente a la de la membrana celular. Poseen altas concentraciones de esteroles en relación a los niveles de fosfolípidos y propiedades similares a la de los denominados "lípid-rafts" (microdominios lipídicos de membrana ricos también en esteroles y glicoespfingolípidos) ya que también son resistentes a detergentes específicos (Pazour et al., 2008; Tyler et al., 2009). En la zona del collar ciliar, la membrana ciliar tiene una composición lipídica diferente a la de la porción extracelular, con una condensación aún mayor de complejos de esteroles. Algunos estudios sugieren que éstos forman una barrera de difusión entre la membrana plasmática y la membrana ciliar, importante para la localización de proteínas en la membrana ciliar (Rohatgi et al., 2010). Recientemente se ha descrito que, a la altura del collar ciliar, hay un anillo de septinas que regula la entrada de proteínas en el complejo ciliar y que, concretamente, regula la entrada de Smo en el mismo (Hu et al., 2010). Además del collar ciliar, el cilio posee otra barrera de difusión: el bolsillo ciliar, cuya naturaleza curva impone constricciones geométricas en la difusión de proteínas y de lípidos de membrana hacia la porción extracelular del cilio (Pazour et al., 2008; Rohatgi et al., 2010).

Las células tienen la capacidad de dirigir y de acumular específicamente proteínas de membrana en el cilio. Muchas de éstas poseen modificaciones lipídicas específicas en su fracción amino-terminal que promueven su asociación con los microdominios lipídicos ciliares. Además de esta modificación, algunas proteínas poseen motivos peptídicos específicos para dirigirse a su destino (Pazour et al., 2008).

A diferencia de las proteínas del axonema, las proteínas de membrana se sintetizan en el RER y son procesadas en el Golgi para ser posteriormente transportadas al cilio. La vía canónica de transporte de proteínas ciliares sería la correspondiente al modelo constitutivo: Vesícula Golgi → Base del cilio → Cargo IFT. Recientemente se han descubierto otras dos rutas alternativas de enriquecimiento de proteínas desde el Golgi a dominios especializados de membrana en respuesta a una señal extracelular: la vía de reciclaje a través de vesículas de endocitosis y la vía de difusión lateral. Esta última fue descubierta en el transporte de las aglutininas en flagelos de *Chlamydomonas* y es la que utiliza Smo para ir al cilio(Pazour et al., 2008; Rohatgi et

al., 2010) (Figura 31). Sea cual sea el modelo de transporte, las proteínas deben atravesar la barrera de difusión en la base del cilio antes de acceder a la membrana ciliar y su movimiento hacia el bolsillo ciliar debe estar regulado por diferentes vías citoplasmáticas. Una vez que las proteínas de membrana entran en el compartimento ciliar, el IFT juega un papel regulador en la asistencia de la selección de proteínas ciliares en vesículas específicas, ya que existen evidencias de interacciones bioquímicas entre complejos de IFT y proteínas de membrana (Emmer et al., 2010; Pazour et al., 2008). Es importante destacar la dificultad del estudio de la implicación del IFT en el transporte de proteínas ya que su disrupción normalmente perjudica la integridad del cilio.

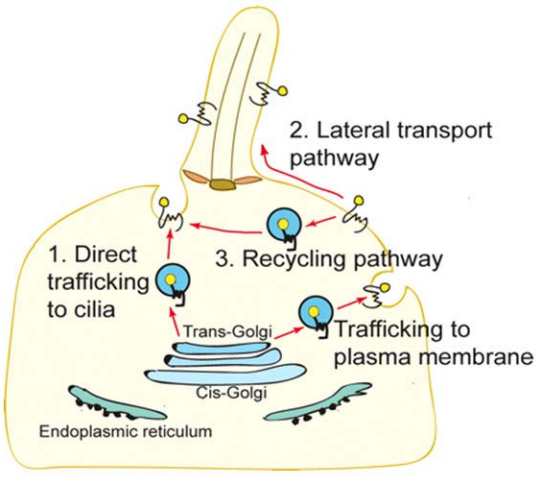


FIGURA 31. Esquema en el que se muestra la vía de transporte lateral descrita en Smo, cuyo movimiento fue seguido in vivo con un marcaje fluorescente de moléculas. (Milenkovic et al., 2009)

Defectos en el cilio primario: las ciliopatías

Recientemente se ha aceptado que los cilios, con su extendida área de contacto con el medio extracelular, tienen otras propiedades además de las ya conocidas de promover el movimiento celular y de crear un flujo de sustancias en el entorno, sino que funcionan como zonas de alto contenido en moléculas implicadas en vías de señalización y controlan una gran variedad de procesos celulares. De esta manera, los cilios funcionan como antenas o microdominios quimio-sensibles que detectan cambios en el medio que los rodea y lo transducen al interior de la célula. En las células del tubo neural, por ejemplo, los cilios de las células que se encuentran en el lumen y que responen a factores extracelulares como Shh, orientan sus cilios hacia el interior del tubo e incrementan así la superficie de contacto con el medio extracelular (Singla et al., 2006).

Durante la última década, una serie de descubrimientos llevó a explorar el área relacionada con defectos en el cilio, ya sea en su correcta producción, su contenido proteico o su funcionamiento.

El caso más estudiado es el del cilio nodal, que produce un flujo en el nodo del embrión responsable de la determinación del eje del cuerpo en el nodo embrionario (Hirokawa et al., 2006). La disrupción de este flujo da lugar a una distribución aleatoria del eje del cuerpo y del corazón, condición denominada *situs inversus*. Esto ocurre también en humanos con defectos en la función ciliar y puede obtenerse en el ratón mediante mutaciones en las proteínas del transporte intraflagelar (IFT), como en el caso de ratones que carecen de las quinesinas Kif3A y Kif3B o de la proteína de transporte Ift88/polaris que no poseen cilio o éste no es funcional. Las mutaciones que resultan en defectos en la dineína, como es el caso del gen inversina (inv), también dan lugar a un cilio nodal inmóvil (Praetorius et al., 2005; Rosenbaum et al., 2002).

Una de las primeras evidencias sobre la importancia del cilio primario en algunas vías de señalización tuvo lugar gracias al estudio del ratón mutante hipomórfico *Tg737$^{orpf\ RpW}$*, que es parcialmente deficiente en la proteína de transporte anterógrada homóloga a Ift88 de *Chlamydomonas* (Tg737, Orpk o polaris). Esta deficiencia da lugar a la enfermedad de Riñón Poliquístico Autosómica Recesiva (ARPKD) en la que los ratones desarrollan, entre muchos desórdenes pleiomórficos, múltiples quistes en riñón, polidactilia, un defecto claro en el desarrollo de los miembros y mueren unos días después del nacimiento. Se propuso que la causa de la formación de quistes era debida a una ausencia de señalización a través del cilio primario (Lehman et al., 2008).

Es de gran interés destacar que muchos de los síndromes humanos causados por falta de cilios o por cilios defectuosos se caracterizan, entre otras muchas deficiencias, por la presencia de riñones quísticos, una degeneración en la retina y defectos en el esqueleto. Por su solapamiento genético y su coincidencia en síntomas se indujo al agrupamiento de estas discretas entidades clínicas dentro de una única entidad: las *ciliopatías* (Tabla2). Dentro de éstas destacan: PKD (Polycystic Kydney Disease o enfermedad de riñón poliquístico), NHP (hepatopancreatitis necrosante), AS (Síndrome de Alstrom), BBS (Síndorme de Bardet-Biedl), OFD (Síndrome orofaciodigital tipo I) y los Síndromes como el de Jeune, de Senior-Loken, de Joubert y de Meckel-Gruber (Badano et al., 2006; Nigg et al., 2009).
La polidactilia y el retraso mental son dos de los síntomas que algunas ciliopatías comparten y que se han relacionado con la vía de Shh, implicada tanto en el desarrollo de las extremidades como en la neurogénesis hipocampal (Badano et al., 2006).

A diferencia de lo que ocurre en los ratones *Tg737$^{orpf\ RpW}$* (en los que hay pérdida parcial de *Ift88*), la ausencia completa de *Ift88/polaris* causa letalidad en la gestación. El análisis del fenotipo de los embriones demuestra que, además de situs inversus (asociado a una pérdida del cilio nodal embrionario), presentan defectos en otras estructuras que no se pudieron asociar únicamente a un defecto en el cilio nodal (Lehman et al., 2008; Murcia et al., 2000). De manera similar, mutaciones en los genes *Kif3A* y *Kif3B* (que codifican para las subunidades motoras de quinesina 2

Disease	BBS	OFD1	Senior-Loken	Meckel	Joubert
Retinitis pigmentosa	✓		✓	✓	✓
Renal cystic disease	✓	✓	✓	✓	✓
Polydactyly	✓	✓		✓	✓
Situs inversus/Isomerism	✓		✓	✓	✓
Mental retardation/ developmental delay	✓	✓		✓	✓
Hypoplasia of corpus callosum	✓	✓		✓	✓
Dandy-Walker malformation	✓		✓	✓	✓
Posterior encephalocele	✓*			✓	✓
Hepatic disease	✓	✓*	✓	✓	✓
Total number of phenotypes in each disorder	8	5	5	9	9

TABLA 2. Rasgos comunes que comparten cinco síndromes generados por disfunción ciliar (*en ratón) (Nigg et al., 2009).

del transporte anterógrado y que causan una ausencia de cilios en el embrión) dan lugar a otros muchos defectos además de situs inversus (Marszalek et al., 1999; Nonaka et al., 1998; Takeda et al., 1999).
Mediante otros estudios en ratón se ha determinado que cualquier daño genético que dé lugar a defectos en el IFT y que, por lo tanto, afecte a la integridad o a la presencia de cilio, resulta en una serie de consecuencias que pueden abarcar desde ceguera, situs inversus, problemas en el cierre del tubo neural, infertilidad, enfermedades respiratorias, defectos en el esqueleto, obesidad, polidactilia, diabetes, hidrocefalia, hasta el desarrollo de un cáncer (Badano et al., 2006; Christensen et al., 2007).

El cilio primario y la vía de señalización de Sonic Hedgehog

La primera relación entre la vía de Shh y el cilio primario surgió a partir del estudio de dos mutaciones inducidas por metilnitrosourea en ratón: *wimple* (*wim*) y *flexo* (*fxo*). Esta mutaciones produjeron fenotipos característicos de pérdida de la función de Shh como defectos en el cierre del tubo neural, un tamaño anormal del cerebro y polidactilia preaxial. Prevenían, además, la especificación de los tipos neuronales ventrales en el tubo neural en desarrollo, como ocurre en los ratones mutantes en los que la vía de Shh está inhibida (Caspary et al., 2002; Ma et al., 2002). El mapeo de estas mutaciones en el genoma determinó que no correspondían a ninguno de los componentes de la vía de Shh conservados evolutivamente, sino que afectaban a dos de los componentes del complejo B del IFT: el Ift172 y el Ift88 (Huangfu et al., 2003). La combinación de cualquiera de estos dos mutantes con un mutante para *Ptch* (que induce la ventralización del tubo neural en la porción dorsal), no fueron capaces de rescatar el fenotipo causado por la pérdida de *Ift88* o *Ift172*, lo cual indicó que la integridad del cilio es necesaria para que la vía se active (Goodrich et al., 1997; Huangfu et al., 2003).
A raíz de este descubrimiento, estudios con mutantes de otros componentes del IFT (además de los a mencionados Ift88 e Ift172) como la quinesina motora Kif3A, la proteína Ift57/hippi del complejo B y las cadenas pesada y ligera de dineína retrógrada (Dync2h1 y Dync2li1), han corroborado la necesidad del cilio para la correcta transducción de la vía de Shh (Houde et al., 2006; Huangfu et al., 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005; Rana et al., 2004).

Por otro lado, la disponibilidad de mutantes condicionales para proteínas ciliares ha permitido diferenciar la implicación del cilio en órganos y tejidos en los que Shh ejerce un importante papel durante el desarrollo, como lo son la formación del esqueleto y algunas zonas del encéfalo como el hipocampo y el cerebelo. Shh regula el crecimiento, el número de dígitos y la polaridad antero-posterior y se ha demostrado que mutaciones en el IFT dan lugar a una polidactilia severa causada por una afectación en el ratio de Gli3 en su forma completa respecto a la forma represora (Gli3:Gli3R) (Haycraft et al., 2005; Haycraft et al., 2007; Liu et al., 2005; Tran et al., 2008).
En lo que respecta a la formación del hipocampo, la ablación condicional del gen *Kif3A* en progenitores neuronales de hipocampo (*hGFAP:Cre*) da lugar a defectos morfológicos producidos por una disminución en la proliferación de las neuronas del giro dentado debido a una baja actividad de la vía de Shh y que es similar al que producen los

mutantes condicionales que carecen de Smo en estas mismas células (*hGFAP:Cre;Smo*). Un intento de activar la vía de Shh mediante el cruce de estos ratones con ratones mutantes que contienen *SmoM2* (una molécula de Smo que posee actividad constitutiva obtenida de carcinomas de células basales) no fue capaz de rescatar el fenotipo del ratón condicional para *Kif3A* (Han et al., 2008).

Algo muy similar ocurrió en los ratones mutantes condicionales de las proteínas Ift88 y Kif3A para el cerebelo en desarrollo. La proliferación de los progenitores de células granulares de cerebelo era deficiente y, en consecuencia, los ratones mostraron una reducción considerable del tamaño del órgano (Chizhikov et al., 2007; Spassky et al., 2008).

La implicación del cilio primario en la vía de señalización de Shh fue un descubrimiento sorprendente ya que, en *Drosophila melanogaster*, mutaciones en genes homólogos del IFT, de las quinesinas (presentes en esta especie sólo en las células ciliadas como las neuronas sensoriales y los espermatozoides) o de los centriolos, en cambio, no perturban la señalización mediada por Hh. (Basto et al., 2006; Han et al., 2003; Haycraft et al., 2005; Sarpal et al., 2003). Esto llevó a replantear los mecanismos de modulación y al análisis de la localización de las proteínas implicadas en la vía de Shh de vertebrados, muchos de los cuales se habían descrito en la mosca.

La primer molécula de la ruta de Shh observada en el cilio fue Smo. Concretamente, se determinó su acumulación en el cilio primario del nodo embrionario del ratón y se le atribuyó ser el responsable de la asimetría bilateral y de la deficiencia en la inducción de la placa del suelo. En fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), que responden a Shh, se corroboró que Smo se acumula en cilio una vez la vía se activa mediante Shh (Corbit et al., 2005). Este descubrimiento llevó a que otros grupos

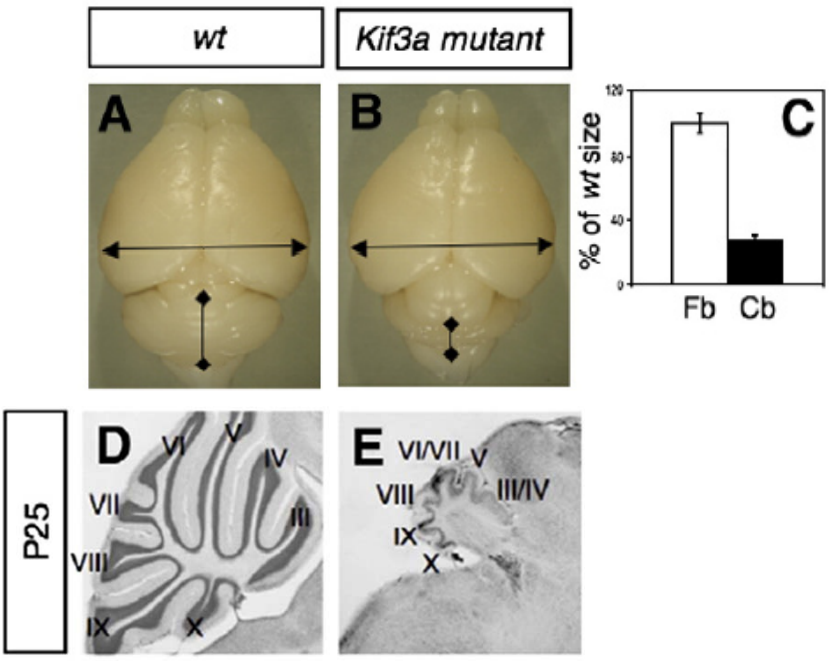


FIGURA 32. A y B. Comparación del tamaño del cerebelo de un ratón salvaje con el de un ratón mutante condicional para el gen Kif3A en progenitores neuronales de células granulares de cerebelo. C. Porcentaje del tamaño del cerebro anterior (Fb) y del cerebelo (Cb) que conserva el ratón mutante respecto al salvaje. D y E. Secciones sagitales de ratones post-natales de 25 días en los que se aprecia la reducción del cerebelo (Spassky et al., 2008).

observaran la localización de Ptch en estas mismas células y que determinaran que éste también se sitúa en el cilio.
Se describió, por lo tanto, un nuevo mecanismo para la ruta de señalización de Shh de vertebrados en la que, en ausencia de Shh, Ptch1 se localiza en el cilio e impide la acumulación de Smo en mismo. Bajo el estímulo de Shh, Ptch1 sale rápidamente del cilio (posiblemente por internalización) permitiendo la entrada de Smo en el compartimento ciliar y, por lo tanto, la activación de la vía (Figuras 33 y 34) (Rohatgi et al., 2007).

El transporte de Smo al cilio y las moléculas implicadas es uno de los mecanismos más estudiados en la vía de Shh. Entre éstas destacan las β-Arrestinas y la quinasas GRK2, que fosforila a Smo y promueve su unión a β-Arrestina2 con Kif3A (Chen et al., 2004; Kovacs et al., 2008). Mediante el seguimiento *in vivo* de moléculas fluorescentes de Smo se demostró que su movimiento a la membrana ciliar se daba por difusión lateral desde la membrana plasmática y no como se había descrito anteriormente, a través de la vía clásica por medio de vesículas derivadas del Golgi (Figura 31) (Milenkovic et al., 2009).

En lo que respecta a otras moléculas de la vía, varios estudios demuestran que tanto el IFT anterógrado como el IFT retrógrado son necesarios para el procesamiento proteolítico y la funcionalidad de los factores de transcripción Gli2 y Gli3 (Haycraft et al., 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005; Tran et al., 2008). Se observó que la forma completa, pero no la forma truncada, de estas dos moléculas sobreexpresadas, así como la forma endógena de Gli3 y de Sufu también están enriquecidos en la punta del cilio. En presencia de FSK, Gli3 es fosforilado y deja de acumularse en el cilio primario (Haycraft et al., 2005; Wen et al., 2010). Estos resultados indican que la PKA y el proteasoma controla la entrada de los Glis antes de entren en el compartimento ciliar. Gli1, el tercer miembro de esta familia de factores de transcripción, sólo se expresa cuando la vía de Hh se encuentra activa y también puede acumularse en la punta (Chen et al., 2009; Haycraft et al., 2005; Kiprilov et al., 2008).

La razón por la cual las formas completas de los factores de transcripción Glis y SuFu se acumulan en la punta del cilio todavía se ignora, pero los mecanismos se están empezando a conocer. Muy recientemente en MEFs se ha demostrado que, tras la inducción de la vía con Shh, los complejos endógenos formados por SuFu y Gli se acumulan rápidamente en la punta del cilio y es allí donde tiene lugar su disociación. Esto permitiría que, en su retorno a la célula, Gli pueda entrar en el núcleo y activar la transcripción. La activación de PKA con FSK tiene nuevamente un efecto negativo sobre la vía y bloquea el tráfico del complejo al cilio (Tukachinsky et al., 2010).
Por otro lado, un estudio reciente demuestra que la fosforilación de SuFu por las quinasas GSK3β y PKA inducida por Shh estabiliza la localización ciliar de la molécula y promueve la degradación de SuFu en su retorno a la célula. Una alteración de estos sitios de fosforilación en Sufu no sólo perturba su localización, si no que también afecta a la de los factores de transcripción Gli2 y Gli3. Estos resultados indican que, de alguna manera, PKA está modulando positivamente la localización de SuFu y de Gli3 en el cilio (Chen et al., 2011).

En conjunto, todos los estudios mencionados indican que la presencia de la maquinaria de la vía de Shh en el cilio y la integridad del IFT son un requisito para que la transducción de la señal de la vía de Shh se de correctamente.

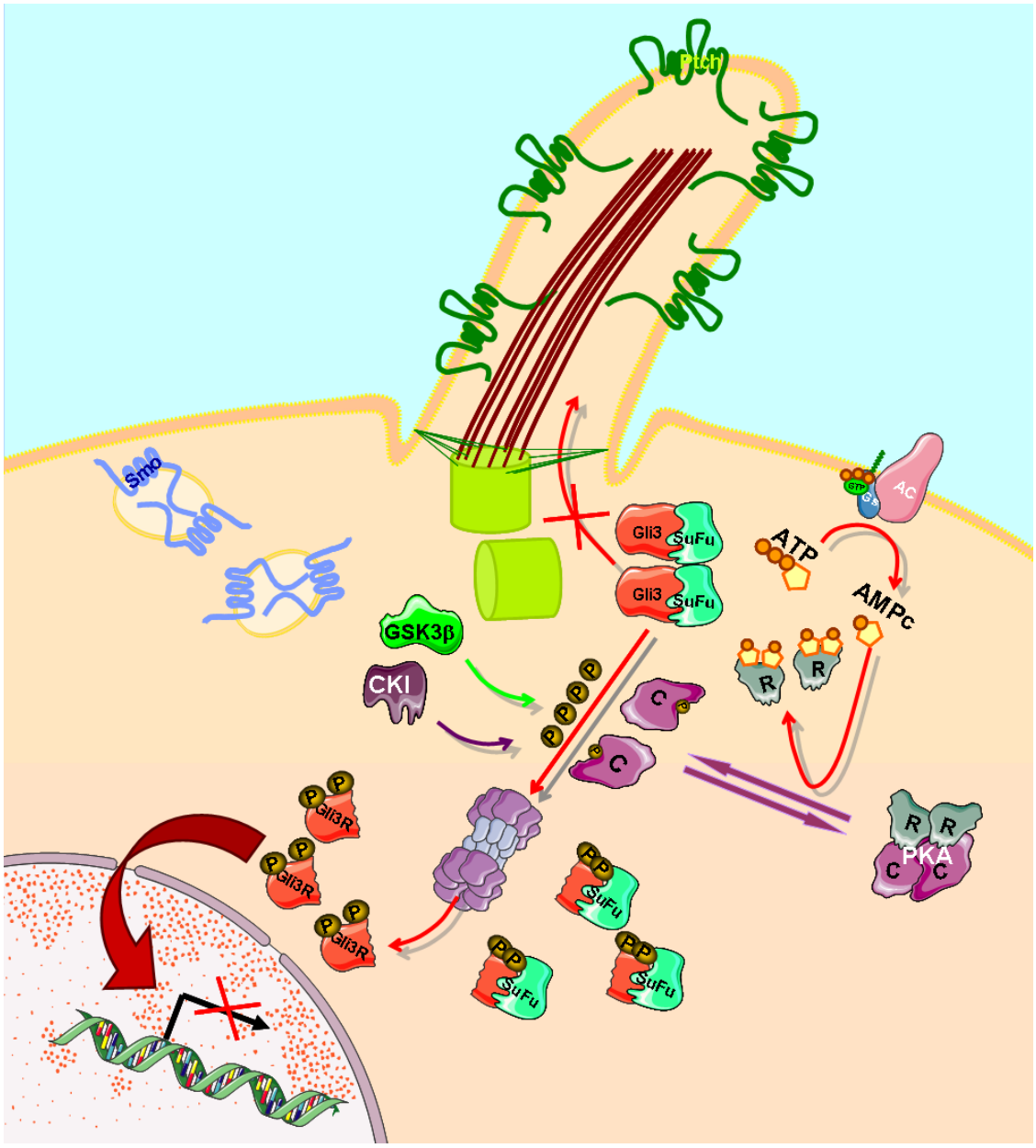


FIGURA 33. Vía de señalización de Shh de vertebrado en ausencia de Shh. El receptor Ptch se localiza en el cilio primario impidiendo la entrada de Smo en el mismo y la transducción de la señal. PKA se encuentra activa y puede fosforilar a Gli3, que será procesado por el proteasoma sin entrar en el compartimento ciliar. Su forma represora (Gli3R) entrará en el núcleo y reprimirá la expresión genética.

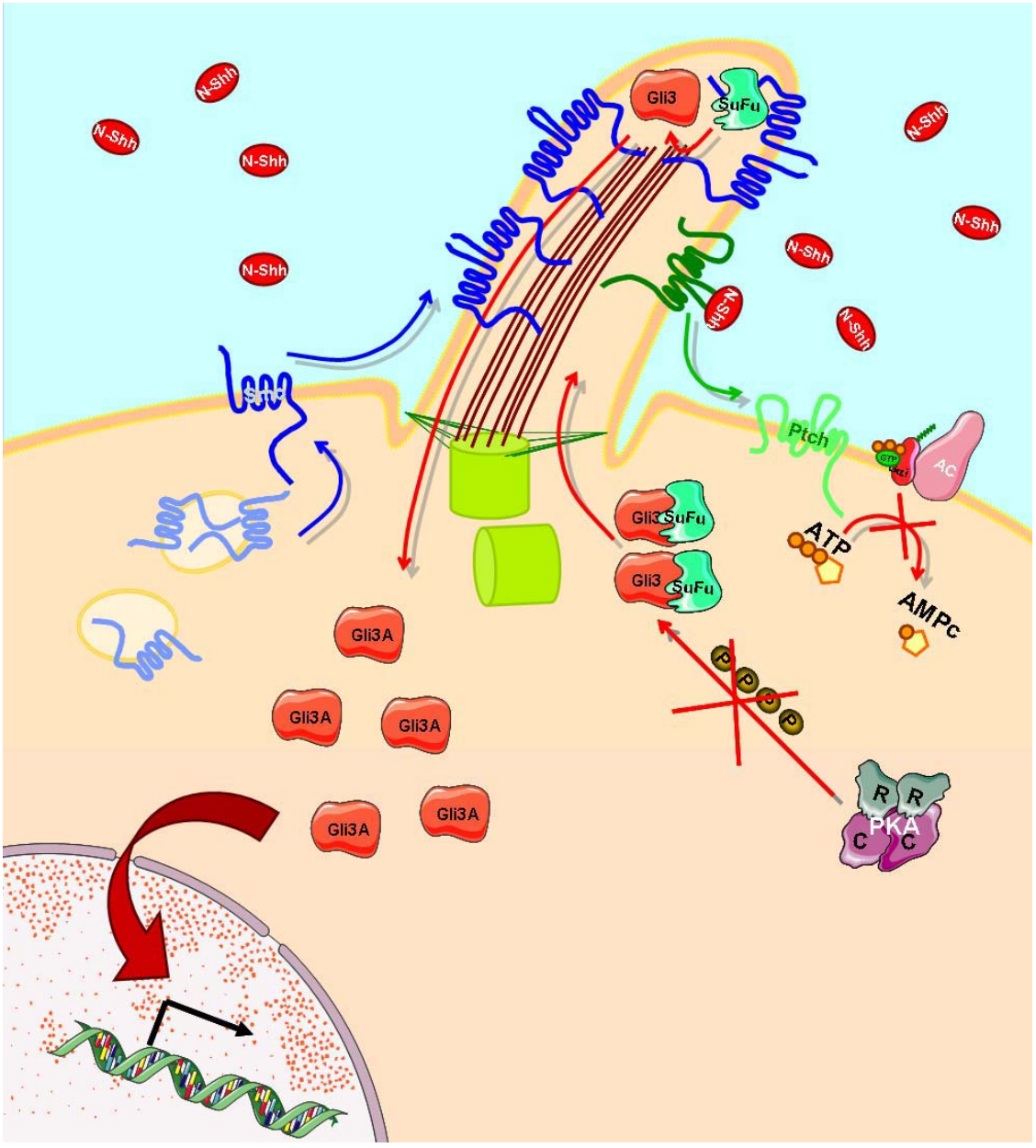
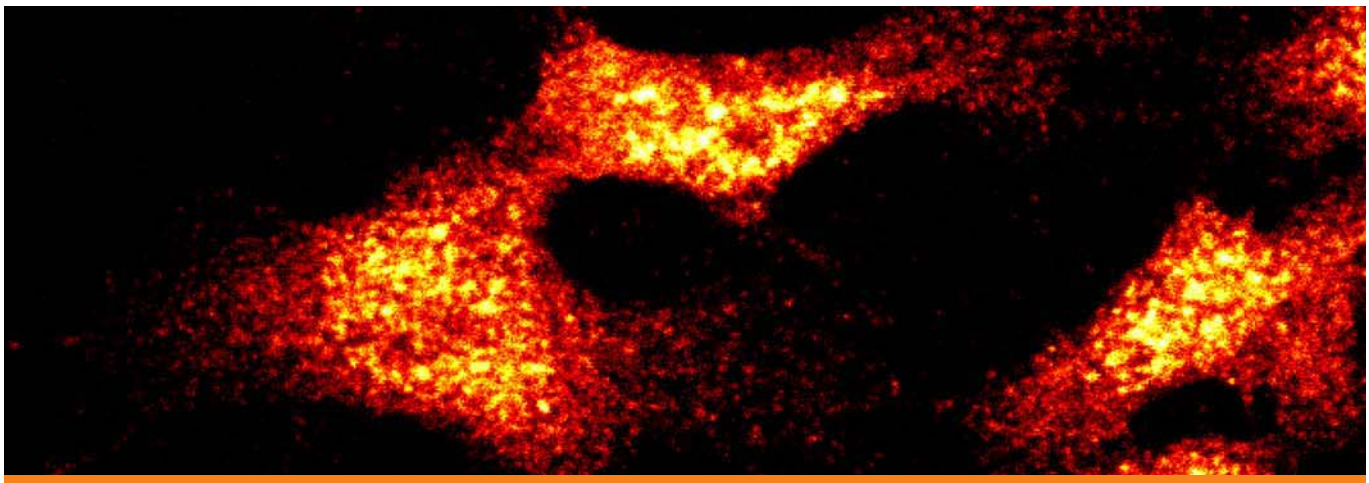
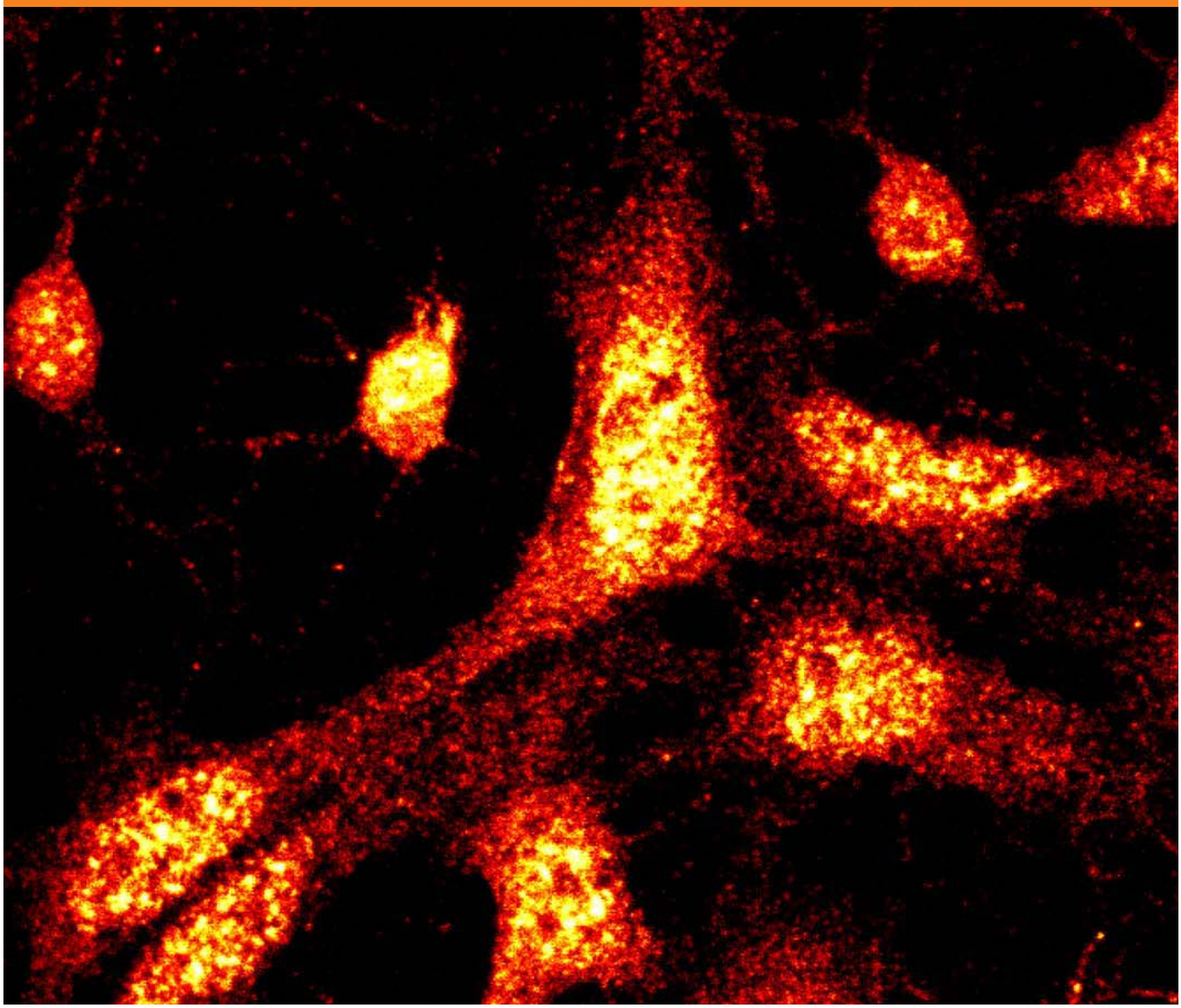


FIGURA 34. En presencia de Shh, Ptch se internaliza rápidamente y Smo se transporta al cilio primario. PKA se encuentra inhida y no puede forforilar a Gli3. El complejo formado por Gli3 y Sufu entra en el cilio y, en su punta distal, las moléculas se separan. Una vez retorna al citoplasma, la forma completa de Gli3 activa se dirige al núcleo para inducir la expresión de los genes diana de la vía.



OBJETIVOS



Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis es el de estudiar la implicación de la PKA y de las subunidades Gα inhibitorias de las proteínas G en la regulación de la proliferación de los PNGCs mediada por Shh.

Objetivos concretos

- Analizar el efecto que tiene la inhibición de PKA sobre la proliferación de PNGCs en ausencia de Shh.

- Determinar la localización subcelular de la PKA en relación con el cilio primario, ademas del mecanismo molecular que determina dicha localización.

- Estudiar el efecto de la presencia de Shh sobre la activación y la localización de la PKA.

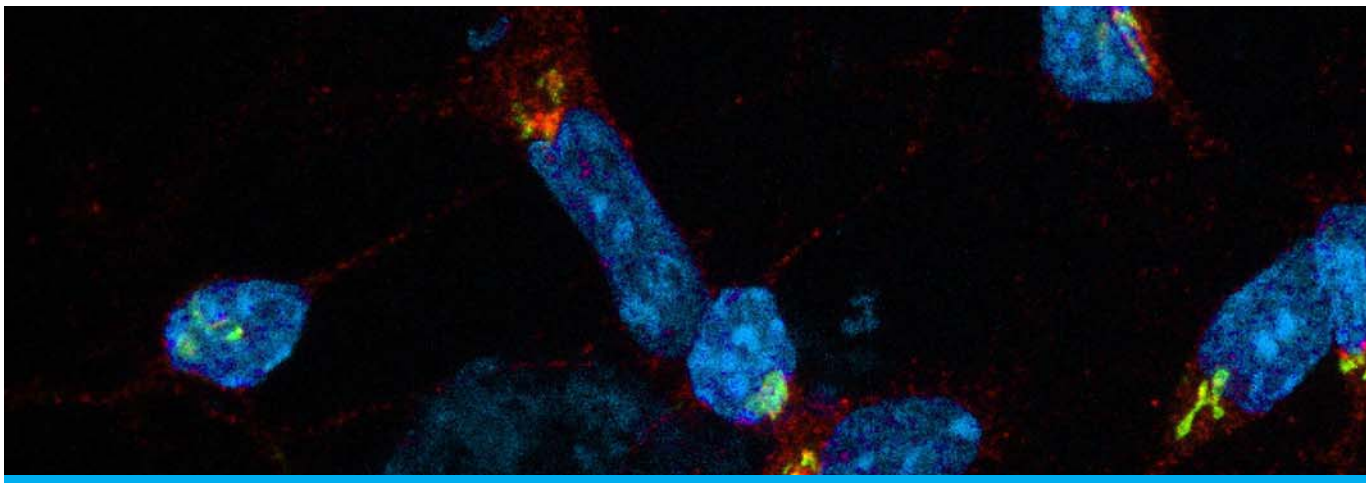
- Analizar la implicación de las AKAPs en la localización subcelular de la PKA y en la proliferación de PNGCs mediada por Shh.

- Determinar si formas activas de las proteínas de la clase Gαi/o son capaces de inducir la proliferación de las PNGCs a dosis no proliferativas de Shh.

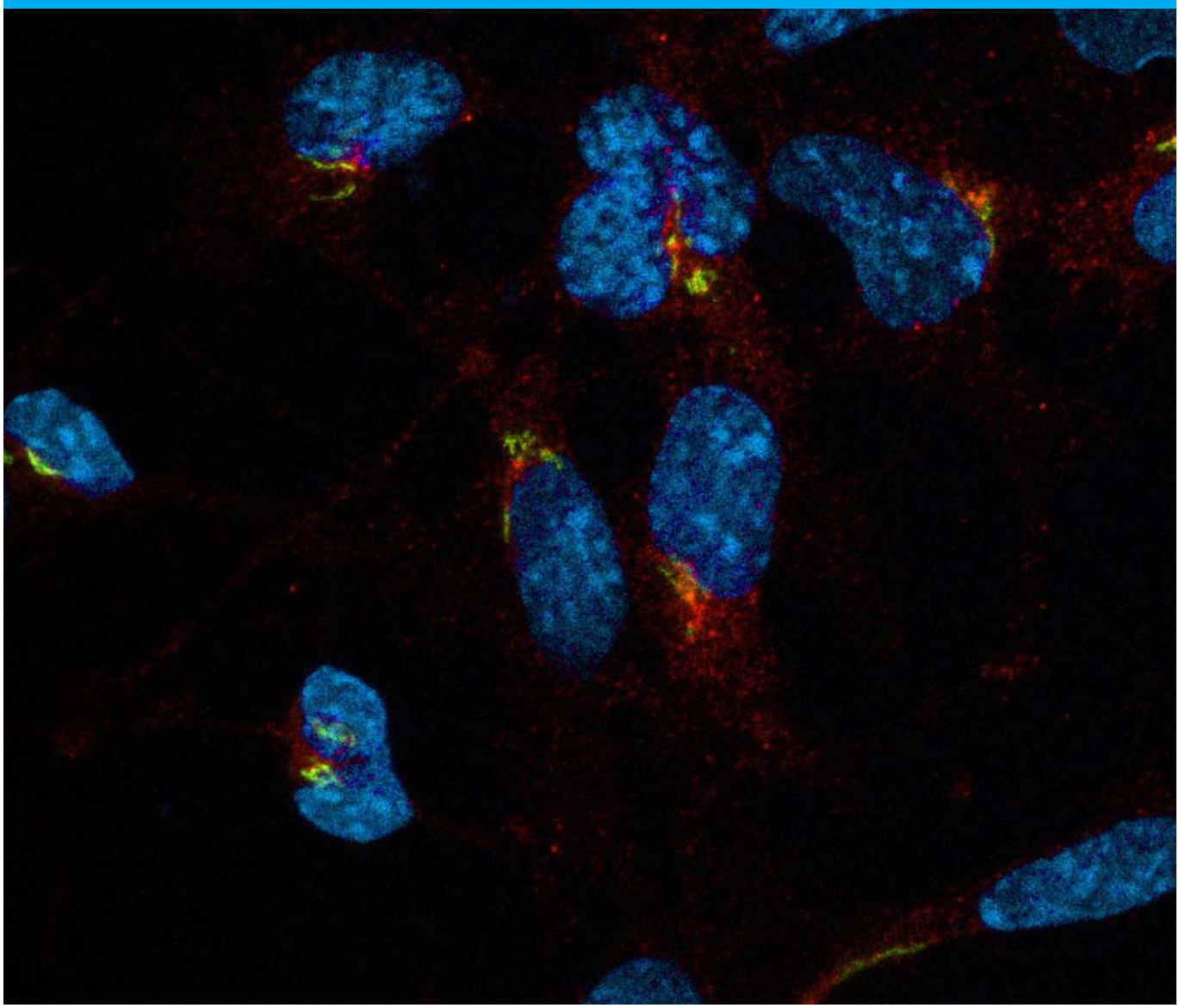
- Identificar qué miembros de la clase de proteínas Gαi/o se expresan en la zona proliferativa de la capa granular externa (CGEe) de cerebelos de rata post-natales de 7 días (P7).

- Analizar como afecta el silenciamiento de los diferentes miembros de la familia Gαi/o a la proliferación de PNGCs inducida por Shh.

- Determinar el patrón de localización subcelular de las distintas subunidades de Gαis, y si la ausencia de Shh o la activación de la vía tienen algún efecto sobre dicha localización.



MATERIAL Y MÉTODOS



Cultivo primario de células granulares de cerebelo

Los cultivos primarios de progenitores neuronales de células granulares de cerebelo (PNGCs) se realizaron mediante una modificación del protocolo descrito por Meyer-Franke (Meyer-Franke et al., 1995). Los reactivos y tiempos de incubación se adaptaron para el procesamiento simultáneo de 10 cerebelos. Los cerebelos de rata post-natal de 7 días (P7) se extrajeron asépticamente, se lavaron en Earl's Balenced Salt Solution (EBSS) (Invitrogen), se cortaron en trozos de aproximadamente1-2 mm y se transfirieron un tubo de 50 ml. Una vez los trozos habían sedimentado en el fondo del tubo, se retiró el exceso de EBSS y se añadió 1 ml (100U) de papaína previamente activada durante 1h a 37ºC en tampón de activación (EBSS conteniendo 5 mML-Cys, 2 mM EDTA y 0.067 mM β-mercaptoethanol) y EBSS hasta un volúmen final de 5 ml conteniendo 100 U/ml de DNAsa (Worthington, Lake Wood, NJ), 1 mM CaCl2 y 1 mM MgCl2. En éste punto, se desplazó el aire con 95% O2 / 5% CO2 y se incubó el tubo 90' a 37º en una plataforma rotatoria a 250 rpm. Una vez transcurrido éste tiempo, las células se vortearon a baja velocidad durante 1', se esperó un instante a que sedimentaran los fragmentos no digeridos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 15 ml, en el que las células se centrifugaron 5' a 1000rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 3 ml de EBSS fresco y se decantó suavemente sobre otro tubo conteniendo 3 ml de suero bovino fetal (FBS) al 50% para inactivar la papaína al pasar las células a través del mismo mediante otra centrifugación de 5' a 1000rpm. Tras la eliminación del sobrenadante, las células fueron resuspendidas en el medio Neurobasal (Invitrogen) y se estimaron el rendimiento y la viabilidad celular. Típicamente, con este método de disgregación celular se obtienen unas 10-25.106 células por cerebelo y la viabilidad es superior al 90%. El cultivo se ajustó a una densidad de siembra de aproximadamente 100.000-150.000 células/cm2 mediante la dilución de las células en medio Neurobasal suplementado con B-27 (Invitrogen), KCl 20mM y Glutamina (Invitrogen) y N-Shh a una concentración final máxima de 3 µg/ml. Las células se sembraron sobre placas recubiertas doblemente con poli-L-lisina y laminina (SIGMA).

Transfecciones transitorias

Las transfecciones transitorias se realizaron con FuGene (Roche Diagnostics) o electroporación, según la eficiencia de transfección requerida para cada experimento. A las 24hs después de la siembra a 3µg/ml de Shh, las células fueron transfectadas con FuGene durante 4hs siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras este periodo las células se lavaron con EBSS y posteriormente se les añadió medio fresco con los tratamientos pertinentes. La eficiencia de transfección con este método es de alrededor del 5-10% con lo cual se utilizó en experimentos en los que se precisaba un contaje de células de forma precisa. La electroporación se realizó con las células en suspensión, tras el proceso de dispersión del tejido y a una densidad de de 30x106 células/ml, resuspendidas en neurobasal completo y en frío. El aparato utilizado en este caso es el Microporator MP-100 (Digital Bio, Seoul, Korea) y se siguieron las instrucciones del fabricante. En este caso, se aplicó un único pulso de 1700V durante 20ms. Para compensar la muerte durante la electroporación, las células electroporadas se sembraron a una densidad de 200.000-

250.000 células/cm2 en placas con medio con Shh durante 24h, previamente al tratamiento con las dosis de Shh requeridas para cada experimento. La eficiencia de transfección que se alcanza con este proceso es de hasta un 80% con una toxicidad mínima, lo cual lo hace ideal para ensayos de bioquímica.

Preparación de plásmidos

Los cDNAs de las moléculas de PKA RI y RII de ratón fueron amablemente enviadas por Stan McKnight. Los mutantes RIIΔ2-6 y RIIΔ2-50 fueron generados a partir de estos DNAs. El mutante de Smoothened M2 se obtuvo de Frederic J. de Sauvage y el Smoothened salvaje fue creado en nuestro laboratorio por mutagénesis dirigida mediante la técnica de PCR. Los cDNAs de Gαi1 y Gαi3 de rata y sus mutantes correspondientes fueron producidos de la misma manera. Los cDNAs humanos de Gα0 y Gα12 y sus respectivas formas mutantes fueron obtenidos del laboratorio de Hae Young Suh, mientras que el cDNA humano de Gα2 y su forma mutante fue enviado por Silvio Gutkind.

A todos los cDNAs se les añadió una etiqueta (Flag o HA) en el proceso de amplificación por PCR y se clonaron posteriormente en el vector bicistrónico pCIG, que contiene una eGFP nuclear como reportera.
Los constructos utilizados en los experimentos de FRET (pCDNA3 RII-CFP y pCDNA3 C-YFP) y sus respectivos controles fueron amablemente enviados por Manuela Zaccollo.

Las secuencias codificantes de Gαi1, Gαi2, Gαi3 y Gαo de rata utilizadas para producir las sondas de RNA utilizadas en la hibridación in situ fueron amablemente proveídas por Randall Reed y subclonadas posteriormente en el vector pBluescript IIKS.
Para los experimentos de RNA de interferencia se diseñaron primers de DNA y se clonaron en el vector pGHIN (o pGSHIN), una versión del vector pSUPER que expresa también una eGFP. Las secuencias diana de las diferentes moléculas a ser silenciadas fueron seleccionadas

RNAi NAME	TARGETED SEQUENCE	GENE
Gαi1 UTR1	5'aaggacctttcgagaaggc 3'	Gnai1
Gαi1 UTR2	5'aagatggtcctggagtgtg 3'	Gnai1
Gαi1 UTR3	5'aatgtcaacccccttaccc 3'	Gnai1
Gαi1 UTR4	5'aacccccttaccctgattc 3'	Gnai1
Gαi1 CS	5'aaggcggccgtggagcgca 3'	Gnai1
Gαi2 UTR1	5 aagcctgggcccaggctc 3'	Gnai2
Gαi2 UTR2	5 aaccgccgctgcctgctga 3'	Gnai2
Gαi2 UTR3	5'aatctaggaaccgccgctg 3'	Gnai2
Gαi2 UTR4	5'aagccaacctgctcattct 3'	Gnai2
Gαi2 CS	5'aagatcacacagagcccccc 3'	Gnai2
Gαi3 UTR1	5'aagtcgaggtgctgcattc 3'	Gnai3
Gαi3 UTR2	5'aactgctcttgggtacagac 3'	Gnai3
Gαi3 UTR3	5'aagcagtgacttgctgctac 3'	Gnai3
GαO UTR1	5'aagcccctgtctaacctac 3'	GnaO
GαO UTR2	5'aacctacgaccccagagtg 3'	GnaO

Tabla 3. Lista de primers para el silenciamiento de los miembros de Gá/o. CS, coding sequence. UTR, 3'UTR.

siguiendo las siguientes reglas: las secuencias debían tener un tamaño de 19pb (sin incluír los 100 primeros o últimos nucleótidos del mRNA) y estar flanqueadas en 5' con "AA" y, si era posible, en 3' con "TT"; el porcentaje de GCs debía superar el 50%; y, finalmente, no debían contener cuatro o más de cuatro nucleótidos "A" o "T" seguidos. Una vez seleccionadas las secuencias, se hizo un "blast" de las mismas en una base de datos de cDNA de rata para asegurar su especificidad. Diseñamos cuatro secuencias diferentes para la 3'UTR de Gαi1 y Gαi2 y una para la región codificante de cada una. A pesar de que la Gαi3 posee una 3'UTR muy larga, sólo tres secuencias fueron detectadas para esta zona debido al alto contenido en "As" y "Ts", y una para la secuencia codificante. En el caso de Gαo, que posee una 3'UTR pequeña encontramos, en cambio, dos secuencias en la 3'UTR pero ninguna en la región codificante (Tabla 3)

Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos monoclonales anti-Bromodeoxiuridina (BrdU) se utilizó para los ensayos de proliferación (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa); el bTubulina III se usó para la tinción de células diferenciadas (Promega): para las inmunocitoquímicas se utilizaron los anticuerpos anti-FLAG, anti-Tubulina acetilada; anti-γ-Tubulina (todos de Sigma-Aldrich), el anti-cis-Golgi (GM130) y anti-trans-Golgi (TGN38) de BD Biosciences.

Los anticuerpos policlonales anti-fosfo-Thr197-C-PKA (C-PKA Thr197-P), anti-fosfo-S/T-sustratos de PKA (PKA-PS) y anti-fosfo-CREB (P-CREB) se compraron a Cell Signalling Technologies; el anti-HA es de Zymed Laboratories (Invitrogen) mientras que el anti-adenilato ciclasa III (C-20) es de Santa Cruz Biotechnology.
Los anticuerpos policlonales anti-FLAG y anti-GFP fueron producidos en nuestro laboratorio

Los anticuerpos anti-mouse o anti-rabbit secundarios que tienen unidos una Alexa fluorescente 488, 594 o 555 son de Invitrogen, mientras que los que poseen una Cy5 son de Jackson InmunoResearch Laboratories. Para la tinción nuclear se utilizó DAPI, de Molecular Probes.

Los anticuerpos secundarios anti-Rabbit y anti-mouse acoplados a peroxidasa (HRP) utilizados para Western Blot son de Jackson InmunoResearch.

La 8-Bromodeoxiuridina (BrdU) se obtuvo de Sigma. Tanto la forscolina (FSK) como el N6,O2'-dibutyryl cAMP (DBA) se compraron a Calbiochem. El péptido St-Ht31 y su control proceden de Promega mientras que el N-Shh fue producido en nuestro laboratorio (Alvarez-Rodriguez et al., 2007).

Ensayos de proliferación y de medición de los niveles de cAMP

Los ensayos de proliferación fueron realizados mediante dos métodos distintos: la incorporación de Timidina H^3 y la incoporación de BrdU. En el caso de la incorporación de timidina H^3 las células estuvieron durante 48hs con su respectivo tratamiento, tras las cuales se les añadió un pulso de 2hs de timidina [H^3] a 1μCi en cada pozo de una placa de 24 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Las células se lisaron añadiendo 200μl de 0,04% de SDS a cada pozo, que se mezcló posteriormente con 800μl de líquido de centelleo. La cuantificación de radioactividad

(proliferación) se midió en el contador de centelleo Wallac Winspectral 1414 (Wallac-Perkin Elmer, Quebec, Canada). Para el ensayo de incorporación de BrdU se añadieron al medio de cultivo 24ng/ml de 8-Bromodeoxiuridina (BrdU) durante las 4-8 horas previas a la fijación. Tras la inmunocitoquímica, en este caso se cuantificó visualmente el porcentaje de células BrdU positivas respecto a la población de células que expresaban GFP, es decir, que estaban transfectadas. Dependiendo del tipo de transfección y de su eficiencia (FuGene o electroporación), en cada condición se contaron una media de 300-750 células por pozo (respectivamente) de, como mínimo, dos pozos de tres cultivos diferentes.

Los niveles de AMPc totales se midieron con el sistema Biotrack cyclic AMP (H^3) (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inmunofluorescencia y análisis cuantitativo de las imágenes

Para la inmunocitoquímica, las células fueron fijadas en 4% de paraformaldeído durante 15 minutos, permeabilizadas con metanol durante 5 minutos y lavadas con el tampón PBS-BSA (PBS 1X, 0.1% de TX-100, 0.05% de Azida, 0.5% de BSA). Para el ensayo de incorporación de BrdU se realizó un paso adicional de tratamiento con DNAsaI en el tampón DNAsa (10mM de Tris-HCl a pH 7.4, 2.5mM de MgCl2 y 0.1mM de CaCl2) durante 10 minutos, tras la permeabilización de la membrana con metanol.
Las muestras fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron con PBS/BSA tres veces durante 15 minutos cada una. Las células se incubaron con los anticuerpos secundarios y/o con el marcador nuclear DAPI durante dos horas, tras las cuales se lavaron nuevamente tres veces con PBS/BSA durante 15 minutos. Las imágenes para cuantificar el porcentaje de proliferación se tomaron con una cámara DMI400B en el microscopio invertido DFC 420 (Leica). Para las muestras de microscopio confocal, las células se sembraron y crecieron en cubres de cristal que se trataron de la misma manera. Una vez terminada la inmunocitoquímica se lavaron con H2O miliQ y se montaron sobre portas con mowiol (Calbiochem). Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio confocal Sp5 (Laser-spectral scanning confocal Sp5, Leica). Las proyecciones máximas de las muestras con C-PKA (T197-P) y PKA-PS fueron cuantificadas con el software ImageJ (NIH; http://rsb.info.nih.gov/ij/). Todas las imágenes se convirtieron en 32 bits, se les substrajo el fondo y los umbrales se seleccionaron con el fondo como NaN ("not a Number", sin número). Para obtener la media de intensidad, se cuantificaron un total de aproximadamente 100 células por tratamiento. El software ImageJ también se utilizó para los experimentos de FRET. En éstos, la intesidad de FRET de RII-PKA-CFP a C-PKA-YFP se midió en la zona periciliar de unas 100 células fijadas. Las condiciones eran células cotransfectadas con RII-PKA-CFP y C-PKA-YFP, crecidas con Shh y tratadas con o sin DBA por 1h. La intensidad inespecífica de células transfectadas por separado con RII-PKA-CFP y C-PKA-YFP se midió y, posteriormente a su substracción en las condiciones a estudiar, se calculó el porcentaje de FRET en cada caso.

Western Blot

Los cultivos primarios fueron lisados después del tratamiento en un buffer específico contra

fosfo-proteínas (150mM de NaCl, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 50mM de NaF, 0.1mM de Na3VO4, 1mM de EDTA, 1mM de EGTA, 0.05% de Triton X-100 y 50mM de Tris-HCl, pH 7.5) con un cocktail inhibidor de fosfatasas (Roche). Las muestras se centrifugaron y al sobrenadante se le añadió buffer de carga con SDS 1X (10% de glicerol, 2% SDS, 100mM de dithiotreitol y 60mM Tris-HCl a pH 6.8). El DNA se rompió mediante la sonicación y las muestras se resolvieron en un gel de SDS-PAGE al 12%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con leche descremada al 8% en TTBS (150mM de NaCl; 0.05% de Tween 20 y 20mM de Tris-HCl a pH 7.4) y se incubaron con los anticuerpos pertinentes durante toda la noche. Las membranas se lavaron tres veces durante 15 minutos y se incubaron con un anticuerpo secundario unido a peroxidada durante 1h. Se realizaron otros tres lavados con TTBS y el revelado se realizó con el sistema ECL y las imágenes se capturaron con el módulo de obtención de imágenes Versadoc, ambos de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Para el tratamiento de las imágenes se utilizó el software Quantity One (Bio-Rad).

Cuantificación del mRNA por RT-PCR semicuantitativa

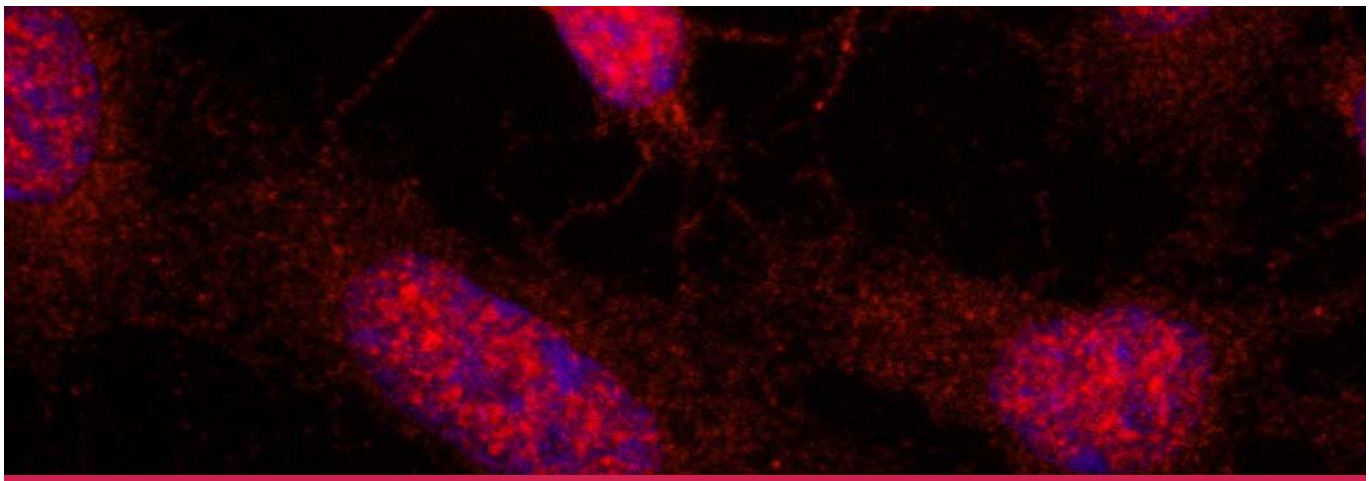
El ARN total se purificó siguiendo el método de Chomcynski and Sacchi (Chomczynski et al., 1987). La integridad del ARN y la concentración se analizó mediante el fotómetro NanoDrop (NanoDrop ND-1000 Spectophotometer, ThermoScientific). Cantidades equivalentes de ARN se retro-transcribieron con la transcritasa reversa Omniscript (Qiagen). Para la cuantificación se amplificaron las regiones codificantes completas de las Gαi/o, para evitar las interferencias de ADN genómico, ya que éstos contienen más de una región de intrones en su secuencia. Para asegurar que no tenía lugar la saturación, se estableció un número de ciclos de amplificación óptimo para cada par de primers y cDNA. Como gen control se utilizó GADPH en cada una de las reacciones.

Hibridación In Situ

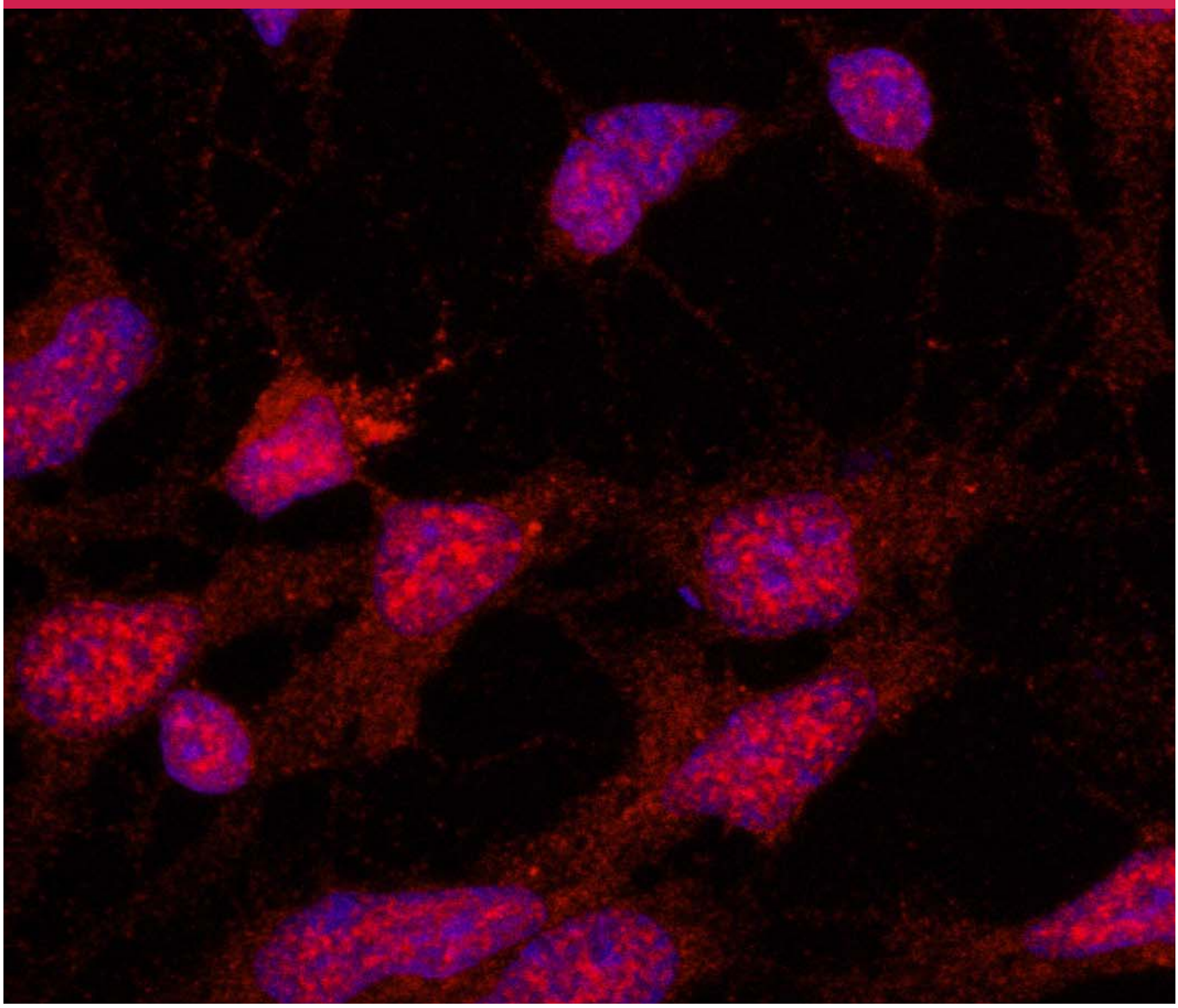
Después de la resección de los cerebelos P7 de rata y se fijaron toda la noche con paraformaldehido al 4%, tras la cual fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con PBT (DEPC-PBS1x, 0.1% Triton), se incluyeron en bloques de agarosa (5% agarosa, 10% sacarosa) y se cortaron con vibrátomo (Leica VT1000 S, Leica) en secciones de 50 µm. Los cortes se deshidrataron con concentraciones crecientes de methanol/PBT (25, 50, 75 y 100%). Las hibridaciones in situ se realizaron a 70ºC siguiendo los procedimientos estándar y se revelaron con fosfatasa alcalina acoplada con fragmentos Fab de digoxigenina (Roche Applied Science).
Las sondas de Gαi/o de rata se produjeron con la enzima T7 a partir del cDNA clonado en el vector pBluescript-II-KS.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS (IBM Corporation, Route 100 Somers, NY 10589). Los datos cuantitativos se expresan como la media ± la desviación estándar. Las diferencias se analizaron mediante una ANOVA seguida de un Test de Tukey. En todos los casos se estableció un grado de significancia <0.05 (límite de confianza mayor al 95%).



RESULTADOS



RESUMEN DEL ARTÍCULO 1

Los precursores neuronales de células granulares (PNGCs) proliferan en respuesta a la actividad mitogénica de Sonic Hedgehog (Shh), que puede ser regulada negativamente por la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico (PKA). En su estado basal, la subunidad catalítica de PKA (C-PKA) se encuentra inhibida por su asociación con la subunidad reguladora (R-PKA). En este trabajo demostramos que, en presencia de Shh, la C-PKA inactiva se acumula en la base del cilio de PNGCs mientras que la retirada de Shh da lugar a la activación de PKA en esta localización particular. Además, demostramos que el anclaje de la holoenzima de PKA a la base del cilio está mediado por la subunidad reguladora tipo II de PKA (RII-PKA), que se une a las proteínas de anclaje de PKA (AKAPs). La disrupción de la interacción entre PKA y AKAPs inhibe la actividad de Shh y, de esta manera, bloquea la proliferación de los cultivos de PNGCs. Estos resultados, por tanto, demuestran que el pool de PKA localizado en la base del cilio juega un papel esencial en la integración de la transducción de la señal de Shh.

Sonic-hedgehog-mediated proliferation requires the localization of PKA to the cilium base

Mercedes Barzi, Jordi Berenguer, Anghara Menendez, Ruben Alvarez-Rodriguez and Sebastian Pons*

Department of Cell Death and Proliferation, Institute for Biomedical Research of Barcelona, IIBB-CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain

*Author for correspondence (spfnqi@iibb.csic.es)

Accepted 18 October 2009
Journal of Cell Science 123, 62-69 Published by The Company of Biologists 2010
doi:10.1242/jcs.060020

Summary

Cerebellar granular neuronal precursors (CGNPs) proliferate in response to the mitogenic activity of Sonic hedgehog (Shh), and this proliferation is negatively regulated by activation of cAMP-dependent protein kinase (PKA). In the basal state, the PKA catalytic subunits (C-PKA) are inactive because of their association with the regulatory subunits (R-PKA). As the level of cAMP increases, it binds to R-PKA, displacing and thereby activating the C-PKA. Here we report that, in the presence of Shh, inactive C-PKA accumulates at the cilium base of proliferative CGNPs whereas removal of Shh triggers the activation of PKA at this particular location. Furthermore, we demonstrate that the anchoring of the PKA holoenzyme to the cilium base is mediated by the specific binding of the type II PKA regulatory subunit (RII-PKA) to the A-kinase anchoring proteins (AKAPs). Disruption of the interaction between RII-PKA and AKAPs inhibits Shh activity and, therefore, blocks proliferation of CGNP cultures. Collectively, these results demonstrate that the pool of PKA localized to the cilium base of CGNP plays an essential role in the integration of Shh signal transduction.

Key words: AKAPs, CGNPs, PKA, Primary cilium, Sonic hedgehog

Introduction

Cerebellar granular neuronal precursors (CGNPs) are generated within the external germinal layer (EGL) during development of the cerebellar cortex. During cerebellum development, CGNPs exit the cell cycle and migrate through the Purkinje cells to establish the three layers of the cerebellar cortex (Altman and Bayer, 2008; Hatten and Heintz, 1995; Ramon y Cajal, 1911). Clonal expansion of CGNPs is achieved by the mitogenic activity of Sonic hedgehog (Shh) signalling emanating from the Purkinje cells to the EGL (Dahmane and Altaba, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999). Shh transduces its signals through the Patched (Ptc) and Smoothened (Smo) receptor complex, delivering activated forms of Gli (Ci) transcription factors to the nucleus (Ingham and McMahon, 2001). This pathway can be negatively regulated through phosphorylation of Gli2 and Gli3 (Gli2/3) by PKA, GSK3β and CK (Tempe et al., 2006). These phosphorylation events target Gli2/3 to the proteasome, where removal of its transactivation domain generates a potent transcriptional repressor of the pathway (Wang et al., 2000; Wang and Li, 2006). However, in the presence of Shh, intact Gli2/3 functions as a transcriptional activator (Lum and Beachy, 2004; McMahon et al., 2003). The inhibition of PKA as a requirement for Shh signalling is supported by the observation that a cAMP-insensitive mutant of the PKA regulatory subunit (mRI-PKA) (Clegg et al., 1987) mimics several effects of Shh, including spinal cord patterning (Epstein et al., 1996). Nevertheless, stimulation with Shh has not been reported to reduce cAMP levels or PKA activity. Although PKA activity is mainly regulated by cAMP levels, its subcellular distribution is determined by its association with the different members of the A-kinase anchoring proteins (AKAPs) (McConnachie et al., 2006). In the basal state, PKA catalytic subunit (C-PKA; also known as PKA-C) is inactive because of the presence of bound regulatory subunit (R-PKA). Increased levels of cAMP bind to and displace R-PKA, thereby permitting active PKA to phosphorylate different substrates (Iyer et al., 2005). The intracellular cAMP levels are mainly regulated by the stimulatory and inhibitory GTP-binding proteins (Gα proteins) which control the activity of adenylate cyclase. Interestingly, Smo has been reported to directly activate Gαi in reconstituted cell systems such as frog melanophores (DeCamp et al., 2000) and SF9 insect cells (Riobo et al., 2006); Gαi is also required for Hedgehog signalling in *Drosophila* (Ogden et al., 2008).

Primary cilia (9+0) are ubiquitous structures that play a critical role in vertebrate development and cellular functions. Intraflagellar transport proteins (IFT) are essential for the biogenesis and maintenance of the cilia structure. Several IFT proteins have been suggested to transduce vertebrate Hedgehog signalling at a step downstream of Patched 1 (Huangfu et al., 2003). Consistent with this, Hedgehog signal induces Smo accumulation at the cilium (Corbit et al., 2005) through a mechanism controlled by Ptc located at the periciliar area (Rohatgi et al., 2007). Other components of the Hedgehog signalling pathway such as Gli2/3 and SuFu have also been reported to localize to the cilium (Haycraft et al., 2005). Based on these collective results, the cilium is thought to be the main Hedgehog-signal-integrating structure in the cell.

We found that PKA accumulates at the base of the primary cilium in CGNPs that are proliferating in the presence of Shh, whereas withdrawal of Shh triggers the local activation and dispersion of PKA in these cells. Our results reveal that termination of the Shh signal increases the levels of phosphorylated PKA targets in different cellular compartments including the nucleus. We also demonstrate that the binding of type-II PKA regulatory subunits (RII-PKA; also known as PRKAR2A) to AKAP molecules mediates the localization of the PKA holoenzyme at the cilium base; following PKA activation, only the C-PKA is dispersed whereas the RII-PKA remains anchored at the cilium base. Finally, our studies show that disruption of the binding of RII-PKA to AKAPs inhibits Shh-induced proliferation of CGNPs.

Journal of Cell Science

Results

C-PKA subunit accumulates at the base of the cilium in CGNPs

In the absence of Shh, CGNP cultures do not proliferate and rapidly initiate an irreversible differentiation into granular neurons. By contrast, the addition of Shh at the time of plating maintains proliferation of these cells for several weeks. It is worth noting that even at a maximal Shh concentration some cells cease to proliferate and differentiate into the typical long neurite bearing granular neurons. Several components of the Shh signalling pathway, including Smo, have been reported to accumulate at the primary cilium (Corbit et al., 2005). Here we used an antibody raised against the C-terminus of C-PKA to study its subcellular distribution in CGNPs. We observed that in proliferating undifferentiated CGNPs cultured in the presence of saturating concentrations of Shh, C-PKA accumulated within a very restricted subcellular area. Double staining of CGNPs with anti-C-PKA and anti-acetylated α-tubulin (which labelled the microtubules of the shaft and the base of the primary cilium as well as the axons of differentiated neurons, but not the centrioles) revealed that C-PKA accumulated at the base of the cilium but not in the shaft. (Fig. 1A). We also observed that CGNPs have a relatively short cilium as compared with published descriptions of primary cilia from fibroblasts or other cell lines. In most CGNPs, the cilium adopts an orthogonal position relative to the cell and appears as a spot in the maximal projection of confocal images; however, it can be identified as a cilium in the separated confocal planes or in the Z-plane stacks (Fig. 1B and supplementary material Fig. S1).

To further define the subcellular localization of C-PKA, we double-stained CGNPs with anti-C-PKA and anti-γ-tubulin, a structural component of the mitotic spindle and centrioles. During mitosis (M phase), the centrioles form the centrosomes that organize the mitotic spindle (Pedersen and Rosenbaum, 2008). However, during interphase, one of the centrioles migrates to the plasma membrane and develops into the cilium basal body, from which the microtubules of the cilium originate (Pedersen and Rosenbaum, 2008). The intense γ-tubulin staining of the mitotic spindle remnant precluded the identification of the centrioles in a portion of the cells (Fig. 1C). However, in the cells where the anti-γ-tubulin antibody exclusively labelled the centrioles, C-PKA was detected in the area surrounding the centrioles (Fig. 1C and supplementary material Fig. S2). To provide additional support for these observations, we obtained Z-plane stacks of three selected confocal planes, which show the C-PKA below and between the two centrioles (Fig. 1D).

Shh signalling regulates C-PKA accumulation at the cilium base

We next studied the possibility that Shh signalling regulates the subcellular distribution of C-PKA. Prior studies have demonstrated that Shh deprivation or activation of PKA by cAMP analogues initiates the rapid and irreversible differentiation of neurons (Alvarez-Rodriguez et al., 2007). Consistent with these observations, when CGNPs were starved of Shh for periods greater than 4 hours, most of the cells became insensitive to the proliferative effects of Shh and initiated terminal differentiation. Thus, to evaluate the relationship between Shh and the subcellular localization of PKA, CGNPs were first cultured in the presence of Shh, and immunostaining for C-PKA was performed after removal of Shh or upon activation of PKA with the cAMP analogue DBA. Intense anti-C-PKA immunostaining was consistently located at the cilium base in proliferating cells (Fig. 2A,B). However, after 1 or 2 hours of Shh deprivation, we observed a progressive dispersion of the C-PKA signal (Fig. 2A). A similar but more pronounced redistribution of the C-PKA pool was noted when PKA was directly activated with DBA (Fig. 2A,B). These results suggest that the loss of C-PKA immunostaining at the cilium base observed after withdrawal of Shh could be due to the displacement of this subunit and subsequent activation of PKA. Double-labelling with antibodies against acetylated α-tubulin confirmed the presence of a primary cilium in these cells and the absence of C-PKA at their

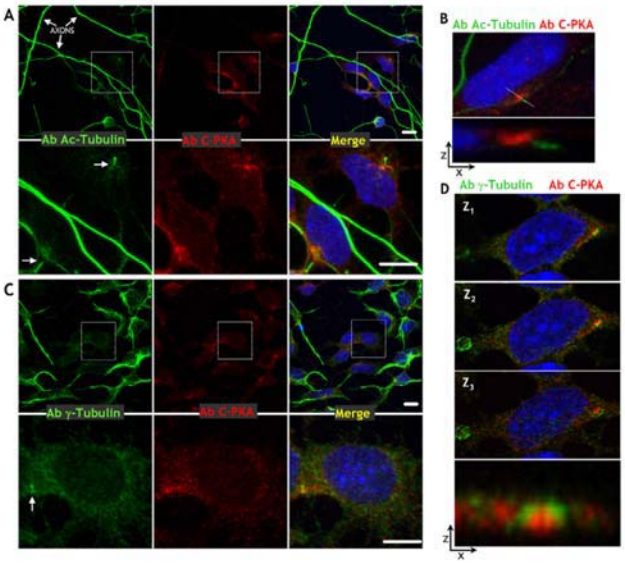


Fig. 1. C-PKA accumulates at the cilium base. (**A**) CGNPs grown in the presence of Shh where double-stained with antibodies against C-PKA and acetylated tubulin. Upper panels are low-magnification images; enlargements of the area delimitated by the square are shown in lower panels. The location of the primary cilia is indicated by white arrows. Note that the antibody against acetylated tubulin stains the primary cilium in the CGNPs but also the axons of the differentiating neurons. Scale bars: 10 μm. (**B**) The Z-stacks reveal the exact location of C-PKA with respect to the cilium shaft. (**C**) The location of the C-PKA was further studied by staining the centrioles with an antibody against γ-tubulin. Note that the anti-γ-tubulin labels the centrioles and also the mitotic spindle of cells that have just divided. The position of the centrioles is indicated by a white arrow in the higher magnification image. Scale bars: 10 μm. (**D**) The reconstruction of three confocal planes (Z1 is the top) demonstrate the accumulation of C-PKA between the two centrioles.

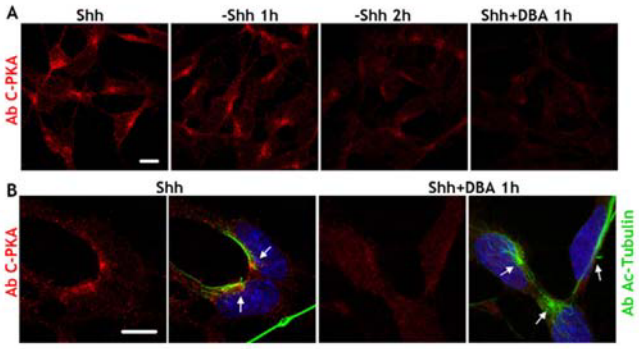


Fig. 2. C-PKA disperses away of the cilium base after withdrawal of Shh. (**A**) Cultures of CGNPs were either deprived of Shh for 1 or 2 hours, or treated with DBA for 1 hour. The cells were fixed and stained with anti-C-PKA. Reduced accumulation of PKA could be clearly appreciated after 2 hours of Shh deprivation and with DBA treatment. (**B**) Higher magnification images from a parallel experiment in which cells were double-stained with anti-C-PKA and anti-acetylated-tubulin reveal the complete depletion of C-PKA at the cilium base after PKA activation. The location of cilia is indicated by white arrows. Scale bars: 10 μm.

base following DBA treatment (Fig. 2B). These data suggested that the accumulation of C-PKA at the cilium base is dependent on the activity of the Shh pathway.

Withdrawal of Shh activates C-PKA at the cilium base

The inactive PKA holoenzyme is formed by a tetramer containing two regulatory (R-PKA) and two catalytic (C-PKA) subunits. The binding of cAMP to the R-PKA displaces the C-PKA. Auto-phosphorylation of C-PKA at Thr197 is an initial and required event that has been used to monitor C-PKA activation (Iyer et al., 2005). Thus, we used an antibody against C-PKA(T197-*P*) to study the effects of Shh signalling on C-PKA. The intensity of anti-C-PKA(T197-*P*) fluorescence measured in a standardized area around the cilium base of CGNPs increased significantly (161±12%) 2 hours after withdrawal of Shh (Fig. 3A,B). Unexpectedly, the direct activation of PKA with DBA reduced this fluorescence intensity to 53±18% (Fig. 3A,B). Although the effects of activation on the release and dispersion of C-PKA has been reported (Iyer et al., 2005), our results might also be explained by activity-dependent degradation of C-PKA. To distinguish between these possibilities, we studied the levels of C-PKA(T197-*P*) using western blotting (Fig. 3C). In agreement with the immunofluorescence data, the levels of C-PKA(T197-*P*) were clearly increased 2 hours after Shh removal. Interestingly, DBA treatment induced a robust increase in C-PKA(T197-*P*), suggesting that the decrease in immunofluorescence signal following DBA treatment (Fig. 3A,B) was due to redistribution of active C-PKA rather than to protein degradation. Thus, these results indicate that deprivation of Shh activity in CGNPs activates PKA at the cilium base.

Activated PKA phosphorylates cytoplasmic and nuclear substrates after cessation of Shh signalling

The subcellular distribution of PKA substrates (PKA-PS) remains controversial. Several reports have suggested that C-PKA translocates to the nucleus after activation and many nuclear proteins are established targets of PKA activity (Sands and Palmer, 2008). Although the inhibition of PKA activity by Shh has been widely accepted, direct experimental evidence demonstrating either the repression of PKA activity by Shh or the increase of PKA activity upon termination of Shh signalling is still lacking. Using an antibody that recognizes the phosphorylated PKA consensus motif (Rxx[S/T]-*P*), we studied the timing and subcellular distribution of the proteins phosphorylated by PKA, either after Shh depletion or after direct PKA activation with DBA (Fig. 3D,E). In the presence of Shh, the levels of PKA-PS within CGNPs were low and detected mainly in the nucleus. However, an hour after withdrawal of Shh, the intensity of anti-PKA-PS inmunofluorescence increased significantly (150±9%) throughout the whole cell. A similar but more intense pattern was observed in CGNPs treated with DBA (240±28%; Fig. 3D,E). These results were further confirmed by western blotting of whole cell lysates (Fig. 3F). Both withdrawal of Shh and addition of DBA clearly increased the levels of PKA-PS. Although DBA was more effective at inducing the phosphorylation of PKA substrates, the phosphorylated proteins appeared to be the same in both cases. These results constitute the first direct evidence that PKA is activated upon withdrawal of Shh signals. The fact that PKA-PS was increased throughout the cell whereas C-PKA activation was mainly detected at the cilium base could be due either to dispersion of C-PKA after local activation or to dispersion of PKA substrate after phosphorylation.

RII-PKA determines the localization of C-PKA to the cilium base

Two types of R-PKA subunits (I, II) and three types of C-PKA subunits (α, β, γ) have been described. In comparison with the catalytic subunits where sequence differences among the different isoforms are minimal, the two regulatory subunits have different affinities for artificial cAMP analogues (Newhall et al., 2006) and more importantly, they bind different members of the AKAP scaffold proteins family (McConnachie et al., 2006). Hence, we considered the possibility that the localization of C-PKA to the cilium base might be determined by its association with the particular R-PKA subtypes. To test this, we compared the subcellular distribution of FLAG-tagged RI-PKA and RII-PKA in cultures of CGNPs proliferating in the presence of Shh. We observed that whereas RI-PKA expression was uniformly distributed in the cell (Fig. 4A), RII-PKA concentrated at the cilium base (Fig. 4A) in a pattern identical to that of the endogenous C-PKA (Fig. 1). These results suggested that the accumulation of C-PKA at the cilium base was mediated by its association with the RII-PKA subunit rather than the RI-PKA subunit.

C-PKA but not RII-PKA is released from the cilium base after PKA activation

To further study the dynamics of PKA activation and subcellular distribution, we next investigated whether the dispersion of C-PKA from the cilium base, observed after PKA activation, was the result only of the release of the catalytic subunit or whether a translocation of the regulatory subunit also occurred. We performed two independent sets of experiments. First, we transfected vectors to express cyan RII-PKA and yellow C-PKA fusion molecules in

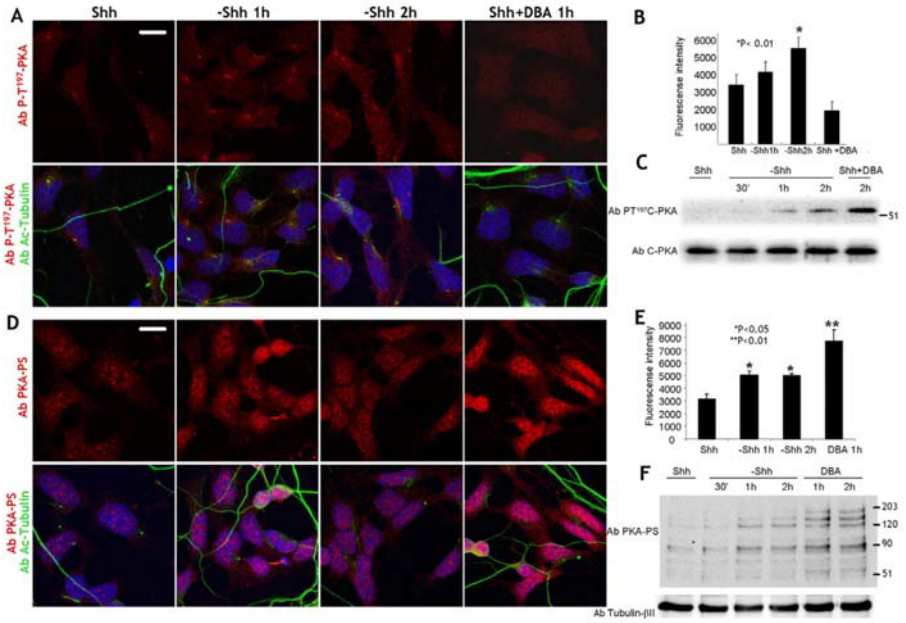


Fig. 3. Removal of Shh induces a local C-PKA activation at the cilium base and a cytoplasmic and nuclear substrate phosphorylation. (**A**) CGNP cultures were either deprived of Shh or treated with DBA and were then stained with an anti-C-PKA(T197-*P*) antibody (AbP-T^{197}-PKA) to study C-PKA activation. The cilium position was identified by anti-acetylated tubulin staining. (**B**) The quantification of the fluorescence intensity of a standardized area corresponding to the cilium base is plotted as the mean ± s.d. The fluorescence of 100 cells was measured for each treatment. (**C**) Using similar cultures and treatments as in A, the levels of C-PKA(T197-*P*) were determined by western blotting. (**D**) Staining of phosphorylated PKA substrates (PKA-PS) in CGNP cultures. (**E**) Quantification of the fluorescence intensity corresponding to the entire cell. (**F**) Western blot analysis with the anti-PKA-PS antibody. Scale bars: 10 µm.

proliferating CGNPs and measured the percentage of FRET from RII-PKA–CFP to C-PKA–YFP in the area corresponding to the cilium base. Interestingly, we observed that the percentage of transmission was significantly reduced (10.82±0.63% to 2.55±1.66%) after PKA activation as compared with unstimulated control cells (Fig. 4B). Additionally, C-PKA–YFP tended to accumulate in large vesicles, which was not observed with other C-PKA constructs such as C-PKA–FLAG; we interpreted these C-PKA–YFP bubbles (indicated by arrowheads in Fig. 4B) as artifacts most probably resulting from the YFP fusion. As a second approach to defining the mechanism responsible for the localization of PKA, we studied the distribution of RII-PKA–FLAG and endogenous C-PKA in proliferating CGNPs treated with DBA. In accord with the previous experiment, we observed that endogenous C-PKA colocalized with RII-PKA–FLAG in control cells. However, upon PKA activation, this colocalization was completely abolished, although the expression pattern of RII-PKA–FLAG was not altered by DBA treatment (Fig. 4C). Collectively, these data indicated that after PKA activation, the catalytic but not the regulatory PKA subunit changes it subcellular distribution.

PKA accumulation at the cilium base is mediated by the binding of RII-PKA to AKAP scaffold proteins

It has been reported that the subcellular distribution of RII-PKA depends on its association with AKAPs (McConnachie et al., 2006). Therefore, we next performed a series of experiments to investigate whether the localization of PKA to the cilium base is mediated by the binding of RII-PKA to AKAPs in proliferating CGNPs. We studied the subcellular distribution of a mutated form of RII-PKA lacking the AKAP binding domain ($RII^{\Delta 2\text{-}6}$-PKA–FLAG). Interestingly, the accumulation of this mutant at the cilium base was greatly reduced but not totally abolished (Fig. 5A). Because this mutant still retains the RII-PKA dimerization domain, we questioned whether the detection of a small fraction of this mutant at the cilium base was due to the dimerization of $RII^{\Delta 2\text{-}6}$-PKA–FLAG molecules with endogenous RII-PKA, or alternatively, whether PKA might be anchored to the cilium base via an AKAP-independent mechanism. To clarify this issue, we next transfected $RII^{\Delta 2\text{-}50}$-PKA–CFP, a mutant protein that lacks both the AKAP binding and the dimerization domains. Interestingly, none of this mutant protein was detected at the cilium base (Fig. 5B), strongly suggesting that the AKAP binding domain is necessary for the distribution of RII-PKA at the cilium base.

RII-PKA binding to AKAPs is required for Shh-induced proliferation of CGNPs

The results described above demonstrate that, in the presence of Shh, a significant pool of the PKA holoenzyme formed by RII-PKA and C-PKA is anchored by AKAP molecules to the cilium base. We next investigated the functional relevance of PKA

Journal of Cell Science

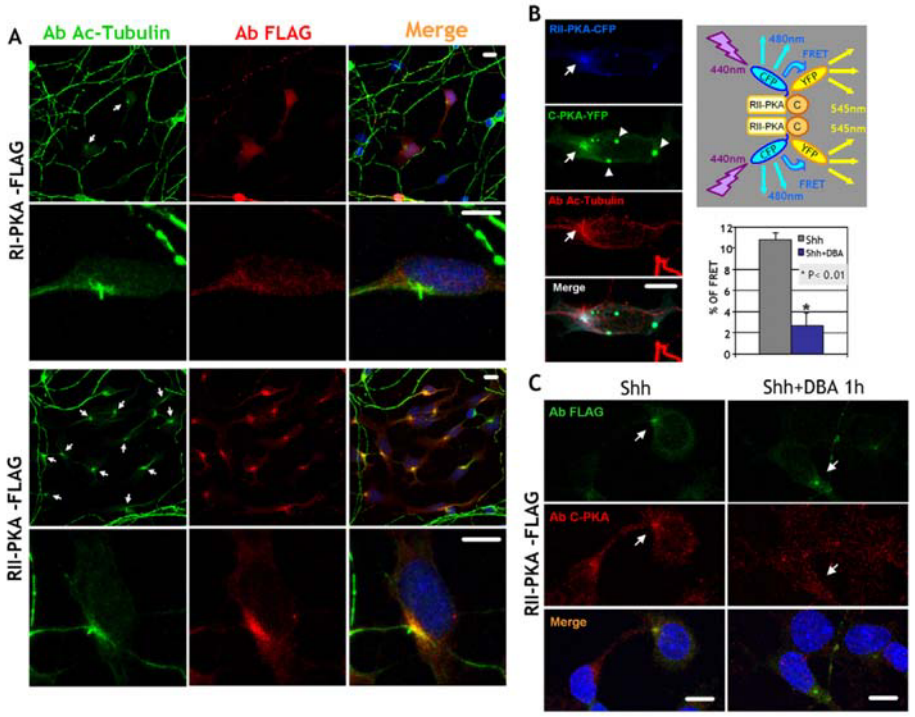


Fig. 4. Localization of C-PKA at the cilium base is determined by RII-PKA. (**A**) RI-PKA-FLAG (upper panels) or RII-PKA-FLAG (lower panels) constructs were transfected into CGNP cultures grown in the presence of Shh. The localization of the PKA regulatory subunits was revealed by an anti-FLAG antibody and the cilium was stained with anti-acetylated tubulin. It can be appreciated that only RII-PKA accumulated at the cilium base (cilia positions are indicated with white arrows). (**B**) RII-PKA–CFP and C-PKA–YFP were co-transfected into CGNPs grown in the presence of Shh. The white arrow marks the cilium position and the white arrowheads indicate artifacts generated by the RII-PKA–CFP vesicles (see Results for details). The FRET from RII-PKA–CFP to C-PKA–YFP was calculated at the cilium base of cells treated with DBA or left untreated. (**C**) RII-PKA–FLAG was transfected into CGNPs cultured with Shh and treated with DBA or left untreated.. The cells were fixed and double-stained with anti-FLAG and anti-C–PKA antibodies, demonstrating that only the catalytic subunit of PKA is dispersed away of the cilium base after PKA activation (white arrows indicate the position of the accumulated RII-PKA–FLAG, presumably at the cilium base). Scale bars: 10 μm.

accumulation for the Shh pathway in CGNPs. Thus, we assessed the effects of St-HT31, a cell-permeable peptide that specifically disrupts RII-PKA binding to AKAPs, on Shh-mediated proliferation of CGNPs. The addition of this peptide significantly reduced Shh-induced proliferation of CGNPs in a dose-dependent manner whereas the scrambled control peptide had no effect (Fig. 5C). Moreover, the proliferation of CGNPs was also significantly reduced in cells transfected with the $RII^{\Delta 2\text{-}5}$-PKA–FLAG mutant (Fig. 5D) which lacks the domain for binding AKAPs. These experiments indicate that the association of RII-PKA with AKAPs is required not only for the accumulation of PKA at the cilium base but also for Shh-induced proliferation of CGNPs.

The inhibition of RII-PKA binding to AKAPs induces CGNPs differentiation

The overexpression of C-PKA in CGNPs inhibits proliferation and promotes differentiation (data not shown), most probably because the saturation of the endogenous inhibitory mechanism mediated by RII-PKA subunits. Thus, we evaluated whether the disruption of the interaction between RII-PKA and AKAPs also induced differentiation in addition to the anti-proliferative effects shown in Fig. 5C. Proliferating CGNP cultures were treated for 1, 2 or 3 days with St-HT31 or the scrambled control peptide and the percentage of proliferating precursors and differentiated granular neurons was determined by BrdU incorporation and anti-tubulin-βIII staining (Fig. 5E-G). The observed reductions in proliferation were always accompanied by proportional increases in the number of cells expressing neuronal differentiation markers. These results confirm that the inappropriate localization of PKA mimics the effects of PKA activation induced by either C-PKA overexpression or by Shh removal. It is worth noting that, although St-HT31 arrested proliferation and initiated a premature differentiation, it also reduced the length of the neurites, suggesting a requirement for the interaction between RII-PKA and AKAPs in neurite elongation. These results indicate that the subcellular distribution of PKA at the cilium base is essential for the proper activation of the Shh pathway in CGNPs, and that this localization depends on the association of the RII-PKA subunit with AKAPs.

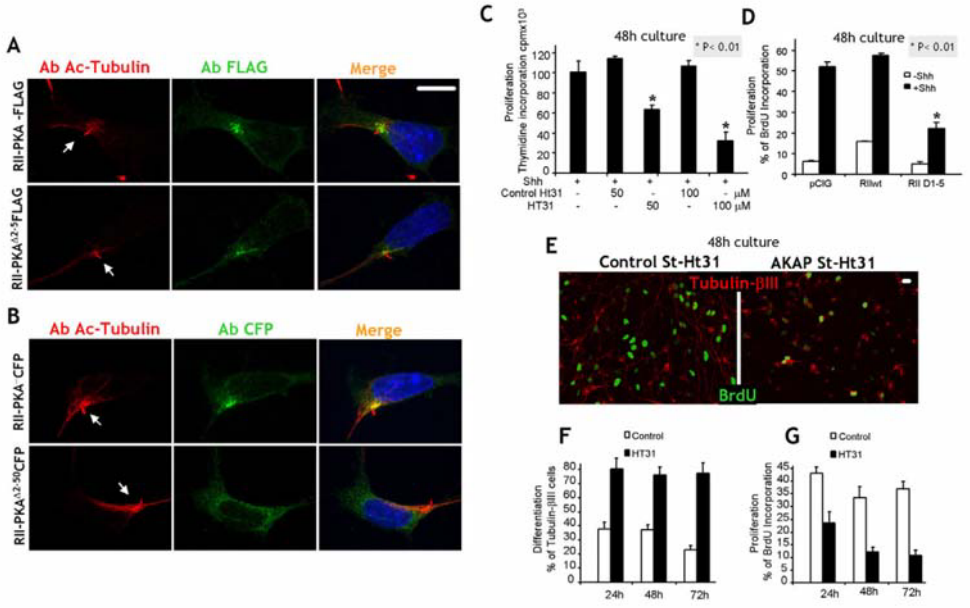


Fig. 5. The anchoring of RII-PKA to the cilium base by AKAP scaffold proteins is required for Shh-induced proliferation. (**A**) Constructs for expressing RII-PKA–FLAG or RII$^{\Delta 2\text{-}5}$-PKA–FLAG were transfected into CGNPs cultured with Shh. Anti-FLAG antibodies were used to locate the recombinant proteins whereas anti-acetylated tubulin staining identified the cilium. (**B**) RII-PKA–CFP or RII$^{\Delta 2\text{-}50}$-PKA–CFP constructs were transfected as in A. The position of the cilium is indicated by white arrows. (**C**) Shh-induced proliferation in CGNP was studied by [H^3]thymidine incorporation in the presence of different concentrations of St-HT31 (a cell-permeable peptide that specifically disrupts RII-PKA binding to AKAPs) or its scrambled control peptide. (**D**) The effect of expressing RII-PKA–FLAG or RII$^{\Delta 2\text{-}5}$-PKA–FLAG on Shh-induced proliferation was studied by BrdU incorporation. (**E**) Images of Shh-treated CGNP cultures that had been incubated with either 100 μM St-HT31 or its control and double-stained with antibodies against the neuronal marker tubulin-βIII and BrdU. (**F**,**G**) Quantification of differentiated (tubulin-βIII) and proliferating cells (BrdU) in CGNP cultures treated with Shh and St-Ht31 or its control for different periods of time. Scale bars: 10 μm.

Discussion

Is Shh signalling in CGNPs mediated by a cAMP reduction?

Previous studies from other groups as well as data from our laboratory strongly suggest that a reduction of intracellular cAMP is a central step of Shh signalling. Various lines of evidence support this notion, including the fact that Shh signalling can be emulated through the inhibition of PKA activity by a cAMP-insensitive mutant (mRI-PKA) (Epstein et al., 1996). Consistent with this, the transfection of this mutant promoted Shh-independent proliferation of CGNPs cultures (supplementary material Fig. S3A). Additionally, the cAMP analogue DBA reversed Shh-induced proliferation in control cells but not in the CGNPs transfected with mR1-PKA (supplementary material Fig. S3A). Consequently, in the cells expressing mR1-PKA, DBA did not stimulate the phosphorylation of CREB, a major PKA target (supplementary material Fig. S3B). In addition, it has been reported that Gαi can be directly activated by Smo in reconstituted cell systems such as frog melanophores (DeCamp et al., 2000) and SF9 insect cells (Riobo et al., 2006) and is required for HH signalling in *Drosophila* (Ogden et al., 2008). However, using whole cell lysates, neither the studies of other groups (Murone et al., 1999) nor our own (supplementary material Fig. S3C) have demonstrated a decrease of a cAMP upon Shh stimulation. The present data indicate that Shh-mediated regulation of PKA occurs mainly at the primary cilium base. Thus, a similar spatial restriction would be expected for the Shh-induced regulation of cAMP levels. Because cAMP participates in many signalling cascades in different subcellular compartments, it is not surprising that local changes of cAMP were undetectable in whole cell extracts.

PKA accumulates at the cilium base

The term centrosome has been commonly used to identify the pair of centrioles and associated proteins involved in the mitotic spindle organization. However, although the two centrioles remain close to each other during the cell-cycle interface, one of them becomes the primary cilium basal body (Pedersen and Rosenbaum, 2008). It is important to note that in the present work we use the term 'cilium base' to refer to the space underneath the primary cilium shaft and not as a synonym of basal body. Thus, confocal Z-stacks revealed that PKA accumulated in the area of the centrioles but did not colocalize with them (Fig. 1D and supplementary material Fig. S2). Although our work is the first to demonstrate the accumulation of PKA at the primary cilium base, the presence of PKA in the region of the centrioles has long been known, even though in all previous reports the centrioles were considered as part of the centrosomes and never as primary cilium basal bodies. The initial description (Nigg et al., 1985) reported that RII-PKA could be detected at the centrosome during mitosis and more intensely in the Golgi area during the interface. Considering that no specific centriole markers were

Journal of Cell Science

available at the time of these reports and that the primary cilium base is very close to the Golgi apparatus (Sorokin, 1968), it is very probable that the PKA spot observed by these authors in non-mitotic cells represents the accumulation of PKA at the primary cilium base, as we describe in the present report. In accord with this, we found that in CGNPs the pool of C-PKA is frequently surrounded by cis- and trans-Golgi vesicles (supplementary material Fig. S4). A more recent report (De Camilli et al., 1986), using a combination of electron microscopy and anti-RII-PKA immunostainings, demonstrated PKA accumulation at the centrosomes during mitosis and at the base of motile cilia of the ependymal epithelium, but again this spot observed in non-mitotic cells was assumed to be an accumulation at the Golgi apparatus. Based on their observations, these authors proposed that PKA accumulates at all microtubule-organizing centres. However, although these authors observed centrioles near the Golgi in quiescent cells and the existence of primary cilia in nom-mitotic cells was already documented (Sorokin, 1968), they failed to consider the possibility that the site of PKA accumulation was the primary cilium. Since these initial reports, the supposed localization of PKA to the Golgi apparatus has attracted very little attention. With the present study, we demonstrate that in quiescent cells the accumulation of PKA is maximal in an area beneath the cilium shaft (Fig. 1B and supplementary material Fig. S1), between or under the centrioles (Fig. 1C and supplementary material Fig. S2), and it does not colocalize with the Golgi apparatus (supplementary material Fig. S4). In addition, an accumulation of C-PKA was not observed in metaphasic or anaphasic cells (supplementary material Fig. S5), indicating that the PKA accumulation in the region of the centrioles favours the centrioles forming the primary cilium basal body as compared to the centrioles organizing the mitotic spindle. Likewise, the association of RII-PKA to AKAP molecules has been reported in many subcellular locations including the centrioles (McConnachie et al., 2006). It was reported initially that a 350 kDa RII-PKA binding protein could be found in centriolar samples purified through sucrose gradient centrifugation (Keryer et al., 1993). When the sequence of AKAP-350 was revealed, the generation of specific monoclonal antibodies confirmed the colocalization of AKAP-350 with centrioles during mitosis (Schmidt et al., 1999). However, regarding RII-PKA, the AKAP-350 staining during interface was very intense and localized mainly to one of the centrioles. Although none of these studies mentioned the possible association between AKAP-350 and RII-PKA at the cilium base, images presented in these reports are certainly suggestive of this colocalization. Therefore, the results that we now present are in agreement with the previous reports, although either the absence of good primary cilium markers or the lack of interest in this organelle might have precluded prior detection of PKA at the cilium base.

Shh regulates PKA activity at the cilium base compartment

Although PKA is undoubtedly the main target of cAMP, a very large number of extracellular factors contribute to the regulation of cell cAMP levels. Thus, the G-protein-coupled receptors (GPCRs) associated with both stimulatory and inhibitory G proteins transduce signals from growth factors, neurotransmitters and extracellular matrix molecules to regulate intracellular cAMP levels. However, based on various lines of evidence, it seems unlikely that Shh signalling is mediated by global changes in cellular cAMP(PKA) activity. The recent reports that have demonstrated the accumulation of different Shh signalling molecules at the cilia clearly predicted a local regulation of the pathway downstream of Smo. Furthermore, both anterograde and retrograde cilium motor proteins seem to be required for Shh signalling, indicating that this regulation requires not just an accumulation of these molecules in the cilium, but also a continuous trafficking of proteins such as the Gli factors. An interesting working model has recently been proposed whereby the formation of a complex containing Gli, Smo and SuFu at the tip of the cilium results in the molecular modification of Gli, which targets it to the proteasome (Eggenschwiler and Anderson, 2007). Unfortunately, as of yet, there is no experimental evidence to support the existence of this complex or the Gli modifications, although the possibility of complexes between IFT proteins and Gli members is strengthened by the recent description of complexes containing Kif3a, β-Arrestin and Smo in the cilium shaft (Kovacs et al., 2008). The deficiency of IFT proteins has both positive and negative effects on the actions of Gli factors, indicating that the generation of the repressor forms of Gli2/3 also requires the integrity of the cilium (Huangfu and Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005). However, it is not known whether processing of Gli occurs before or after transport to the cilium region. It is tempting to speculate that the accumulation of Smo in the cilium might control the activity of the Gαi proteins present in the cilium membrane, which in turn would repress the local ciliar adenylate cyclase. In accord with this notion, large amounts of type III adenylate cyclase have been reported to accumulate in the cilium but the function of this localization is not known (Bishop et al., 2007) (supplementary material Fig. S6). Based on this hypothesis, Shh would generate a local environment of low cAMP(PKA) activity at the cilium. Thus, in the absence of Shh, the cilium would act as a 'cAMP gun' to activate the PKA accumulated at the cilium base. In adult hippocampal neurons, the RII-PKA is anchored at the dendrites by MAP-2, a RII-PKA-specific AKAP (Zhong et al., 2009) and upon activation of PKA by β-adrenergic stimulation, the C-PKA is released and enters the dendritic spines where it plays a crucial role in long-term potentiation (LTP) acquisition. Likewise, P350-AKAP concentrates at the centriole region (Shanks et al., 2002), forming complexes with RII-PKA and casein kinase (CK) (McConnachie et al., 2006), two of the three enzymes required for the processing of Gli factors. Thus, although the localization of PKA is optimal for interacting with Gli factors as they enter or exit the cilium, questions related to where Gli factors are processed and the identity of the Gli forms present in the cilium must be clarified before a working model for PKA function at the cilium base can be firmly established.

Materials and Methods

Cerebellar granular neuronal precursors cell culture and transfection

Cerebellar granular neuronal precursors cell culturing and plate coating were performed as described previously (Alvarez-Rodriguez and Pons, 2009). For transient transfection experiments, cells were electroporated in suspension and plated in Neurobasal medium supplemented with 150 mM KCl, B-27 and glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). Depending on the experiment, the mitogen Shh was added as indicated (3 μg/ml). Electroporation was performed using the Microporator MP-100 (Digital Bio, Seoul, Korea) according to manufacturer's instructions, with a single pulse of 1700 mV for 20 mseconds.

Plasmid preparation

Full-length cDNAs of mouse RI and RII PKA were kindly provided by Stan McKnight and were used to generate the $RII^{\Delta 2\text{-}5}$ PKA and $RII^{\Delta 2\text{-}50}$ PKA mutants. The smoothened M2 mutant was obtained from Frederic J. de Sauvage and wild-type Smoothened was generated by PCR. All these cDNAs were tagged by PCR and cloned into the pCIG bicistronic vector containing nuclear EGFP as a reporter. The constructs used for FRET experiments (pCDNA3 RII-CFP, pCDNA3 C-YFP, the empty control vectors, and $RII^{\Delta 2\text{-}50}$-CFP) were provided by Manuela Zaccollo.

Proliferation and cAMP measurement assays

Bromodeoxyuridine (BrdU) and [^{3}H]thymidine incorporation were performed as previously described (Alvarez-Rodriguez and Pons, 2009). Cellular cAMP levels were measured using the Biotrak cyclic AMP (^{3}H) assay system (Amersham Biosciences) according to manufacturer's instructions.

Journal of Cell Science

Western blotting

Primary cell cultures were lysed in a phosphoprotein-specific lysis buffer (150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 0.1 mM Na_3VO_4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing a protease inhibitor cocktail (Roche). Western blot analysis was performed as described previously (Alvarez-Rodriguez and Pons, 2009).

Immunofluorescence and quantitative image analysis

Cells were grown on coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with methanol and washed with PBS-BSA buffer. Samples were incubated with the corresponding primary antibodies overnight. After three washes, cells were incubated with secondary Alexa Fluor 488, 594 or 555 (Invitrogen), or Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) antibodies, and the nuclear marker DAPI (Molecular Probes). Finally, the coverslips were mounted with Mowiol (CalBiochem). Confocal images were acquired using a laser-scanning confocal spectral scanning microscope (Sp5; Leica).

Maximum projection of C-PKA(T197-*P*) and PKA-PS were quantified with ImageJ software (NIH; http://rsb.info.nih.gov/ij/). All images were converted into 32 bits, background was subtracted and original thresholds were set with the background as NaN (not a number). Finally, the mean grey value was quantified from the entire cell for PKA-PS or a from a constant circular area for C-PKA(T197-*P*). To obtain the mean intensity, a total of 100 cells per treatment were quantified. ImageJ software was also used for FRET quantification. The FRET intensity from RII-PKA–CFP to C-PKA–YFP was measured at the periciliar area of 100 fixed cells co-transfected with RII-PKA–CFP and C-PKA–YFP grown with Shh and treated with N^6,O^2-dibutyryl cAMP (DBA), or left untreated, for 1 hour. The percentage of FRET was calculated in each case after subtraction of the background measured in cells transfected separately with RII-PKA–CFP and C-PKA–YFP.

Antibodies and chemicals

The monoclonal antibody anti-bromodeoxyuridine (BrdU) was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa). The monoclonal antibody against βIII-tubulin was from Promega. Anti-C-PKA, anti-phospho-Thr197-C-PKA (C-PKA(T197-*P*), anti-phospho-(S/T)-PKA substrates (PKA-PS) and anti-phospho-CREB polyclonal antibodies where from Cell Signaling Technologies. Anti-FLAG, anti-acetylated tubulin and anti-γ-tubulin monoclonal antibodies were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-HA polyclonal antibody was from Zymed Laboratories (Invitrogen). Rabbit anti-adenylate cyclase III (C-20) was from Santa Cruz Biotechnology, mouse monoclonal anti-cis-Golgi (GM130), and anti-trans-Golgi (TGN38) were from BD Biosciences. Rabbit polyclonal anti-FLAG and anti-GFP antibodies were produced in our laboratory.

Forskolin and DBA were purchased from Calbiochem. The AKAP St-Ht31 peptide and its control were from Promega. Shh N-terminal peptide was produced in our laboratory as previously reported (Alvarez-Rodriguez et al., 2007).

Statistical analysis

Quantitative data are expressed as the mean ± s.d. Significant differences among groups were tested by two-way ANOVA followed by the Tukey's test.

We are grateful to all of the researchers who sent us the cDNAs as detailed in Materials and Methods. We also thank Deborah Burks for improving the English in the manuscript. Work in S.P.'s laboratory is supported by the Spanish Ministry of Education Grant BFU2008-02424/BFI.

Supplementary material available online at
http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/123/1/62/DC1

References

Altman, J. A. and Bayer, S. A. (2008). *Development of the Cerebellar System: In Relation to its Evolution, Structure and Functions.* Boca Raton, FL: CRC Press.

Alvarez-Rodriguez, R. and Pons, S. (2009). Expression of the proneural gene encoding Mash1 suppresses MYCN mitotic activity. *J. Cell Sci.* **122**, 595-599.

Alvarez-Rodriguez, R., Barzi, M., Berenguer, J. and Pons, S. (2007). Bone morphogenetic protein 2 opposes Shh-mediated proliferation in cerebellar granule cells through a TIEG-1-based regulation of Nmyc. *J. Biol. Chem.* **282**, 37170-37180.

Bishop, G. A., Berbari, N. F., Lewis, J. and Mykytyn, K. (2007). Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **505**, 562-571.

Clegg, C. H., Correll, L. A., Cadd, G. G. and McKnight, G. S. (1987). Inhibition of intracellular cAMP-dependent protein kinase using mutant genes of the regulatory type I subunit. *J. Biol. Chem.* **262**, 13111-13119.

Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y. and Reiter, J. F. (2005). Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018-1021.

Dahmane, N. and Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* **126**, 3089-3100.

De Camilli, P., Moretti, M., Donini, S. D., Walter, U. and Lohmann, S. M. (1986). Heterogeneous distribution of the cAMP receptor protein RII in the nervous system: evidence for its intracellular accumulation on microtubules, microtubule-organizing centers, and in the area of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **103**, 189-203.

DeCamp, D. L., Thompson, T. M., de Sauvage, F. J. and Lerner, M. R. (2000). Smoothened activates Galphai-mediated signaling in frog melanophores. *J. Biol. Chem.* **275**, 26322-26327.

Eggenschwiler, J. T. and Anderson, K. V. (2007). Cilia and developmental signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 345-373.

Epstein, D. J., Marti, E., Scott, M. P. and McMahon, A. P. (1996). Antagonizing cAMP-dependent protein kinase A in the dorsal CNS activates a conserved Sonic hedgehog signaling pathway. *Development* **122**, 2885-2894.

Hatten, M. E. and Heintz, N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* **18**, 385-408.

Haycraft, C. J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E. J. and Yoder, B. K. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* **1**, e53.

Huangfu, D. and Anderson, K. V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11325-11330.

Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A. S., Murcia, N. S., Niswander, L. and Anderson, K. V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* **426**, 83-87.

Ingham, P. W. and McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**, 3059-3087.

Iyer, G. H., Moore, M. J. and Taylor, S. S. (2005). Consequences of lysine 72 mutation on the phosphorylation and activation state of cAMP-dependent kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 8800-8807.

Keryer, G., Rios, R. M., Landmark, B. F., Skalhegg, B., Lohmann, S. M. and Bornens, M. (1993). A high-affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II in the centrosome of human cells. *Exp. Cell Res.* **204**, 230-240.

Kovacs, J. J., Whalen, E. J., Liu, R., Xiao, K., Kim, J., Chen, M., Wang, J., Chen, W. and Lefkowitz, R. J. (2008). Beta-arrestin-mediated localization of smoothened to the primary cilium. *Science* **320**, 1777-1781.

Liu, A., Wang, B. and Niswander, L. A. (2005). Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development* **132**, 3103-3111.

Lum, L. and Beachy, P. A. (2004). The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* **304**, 1755-1759.

May, S. R., Ashique, A. M., Karlen, M., Wang, B., Shen, Y., Zarbalis, K., Reiter, J., Ericson, J. and Peterson, A. S. (2005). Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev. Biol.* **287**, 378-389.

McConnachie, G., Langeberg, L. K. and Scott, J. D. (2006). AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol. Med.* **12**, 317-323.

McMahon, A. P., Ingham, P. W. and Tabin, C. J. (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* **53**, 1-114.

Murone, M., Rosenthal, A. and de Sauvage, F. J. (1999). Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothened receptor complex. *Curr. Biol.* **9**, 76-84.

Newhall, K. J., Criniti, A. R., Cheah, C. S., Smith, K. C., Kafer, K. E., Burkart, A. D. and McKnight, G. S. (2006). Dynamic anchoring of PKA is essential during oocyte maturation. *Curr. Biol.* **16**, 321-327.

Nigg, E. A., Schafer, G., Hilz, H. and Eppenberger, H. M. (1985). Cyclic-AMP-dependent protein kinase type II is associated with the Golgi complexand with centrosomes. *Cell* **41**, 1039-1051.

Ogden, S. K., Fei, D. L., Schilling, N. S., Ahmed, Y. F., Hwa, J. and Robbins, D. J. (2008). G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothened in Hedgehog signalling. *Nature* **456**, 967-970.

Pedersen, L. B. and Rosenbaum, J. L. (2008). Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr. Top. Dev. Biol.* **85**, 23-61.

Ramon y Cajal, S. (1911). *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebrates.* Paris: Malonie.

Riobo, N. A., Saucy, B., Dilizio, C. and Manning, D. R. (2006). Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothened. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 12607-12612.

Rohatgi, R., Milenkovic, L. and Scott, M. P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**, 372-376.

Sands, W. A. and Palmer, T. M. (2008). Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal.* **20**, 460-466.

Schmidt, P. H., Dransfield, D. T., Claudio, J. O., Hawley, R. G., Trotter, K. W., Milgram, S. L. and Goldenring, J. R. (1999). AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. *J. Biol. Chem.* **274**, 3055-3066.

Shanks, R. A., Steadman, B. T., Schmidt, P. H. and Goldenring, J. R. (2002). AKAP350 at the Golgi apparatus. I. Identification of a distinct Golgi apparatus targeting motif in AKAP350. *J. Biol. Chem.* **277**, 40967-40972.

Sorokin, S. P. (1968). Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J. Cell Sci.* **3**, 207-230.

Tempe, D., Casas, M., Karaz, S., Blanchet-Tournier, M. F. and Concordet, J. P. (2006). Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCFbetaTrCP. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4316-4326.

Wang, B. and Li, Y. (2006). Evidence for the direct involvement of {beta}TrCP in Gli3 protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 33-38.

Wang, B., Fallon, J. F. and Beachy, P. A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**, 423-434.

Wechsler-Reya, R. J. and Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* **22**, 103-114.

Zhong, H., Sia, G. M., Sato, T. R., Gray, N. W., Mao, T., Khuchua, Z., Huganir, R. L. and Svoboda, K. (2009). Subcellular dynamics of type II PKA in neurons. *Neuron* **62**, 363-374.

- **Supplemental Figure S1** -

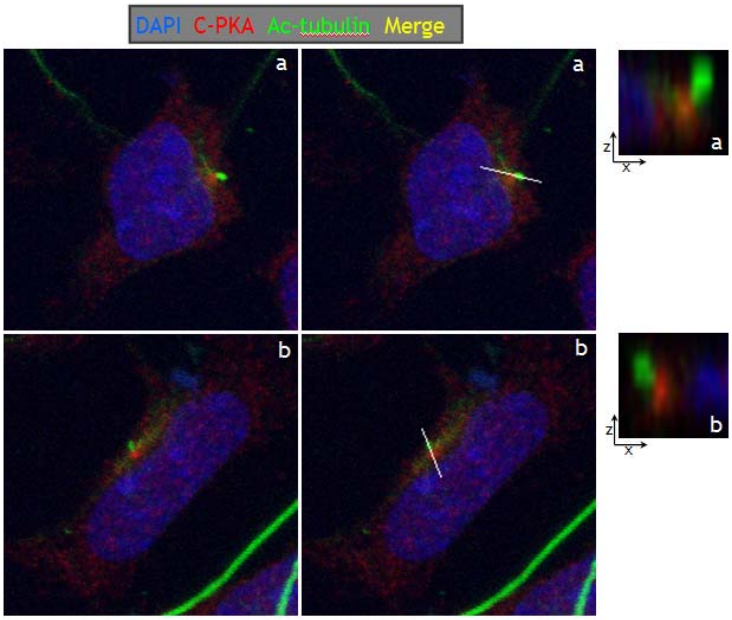


Fig. S1. C-PKA accumulates at the cilium base. CGNPs growing in the presence of Shh where double-stained with antibodies against C-PKA and acetylated tubulin. Z-stacks from two cells (a and b) with different orientation of cilia are shown. The white line indicates the position where the Z-plane were generated. For clarity, we have included the original picture without the line.

- **Supplemental Figure S2** -

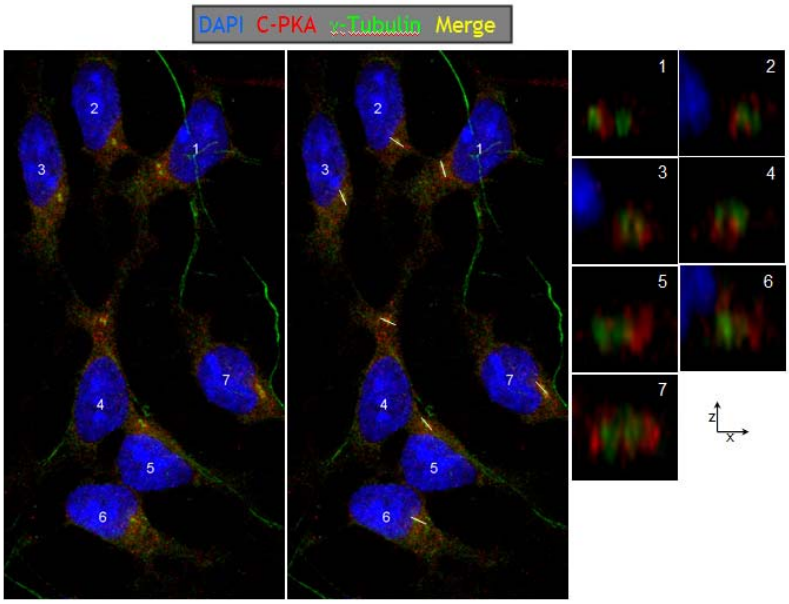


Fig. S2. C-PKA accumulates in the region of the centrioles. The location of the C-PKA was further studied by staining the centrioles with an antibody against γ-tubulin. Z-stacks with the Z-plane always crossing the two centrioles were generated in seven different cells. The white lines indicate the position where the Z-planes were generated. The accumulation of C-PKA was always detected between or surrounding the two centrioles.

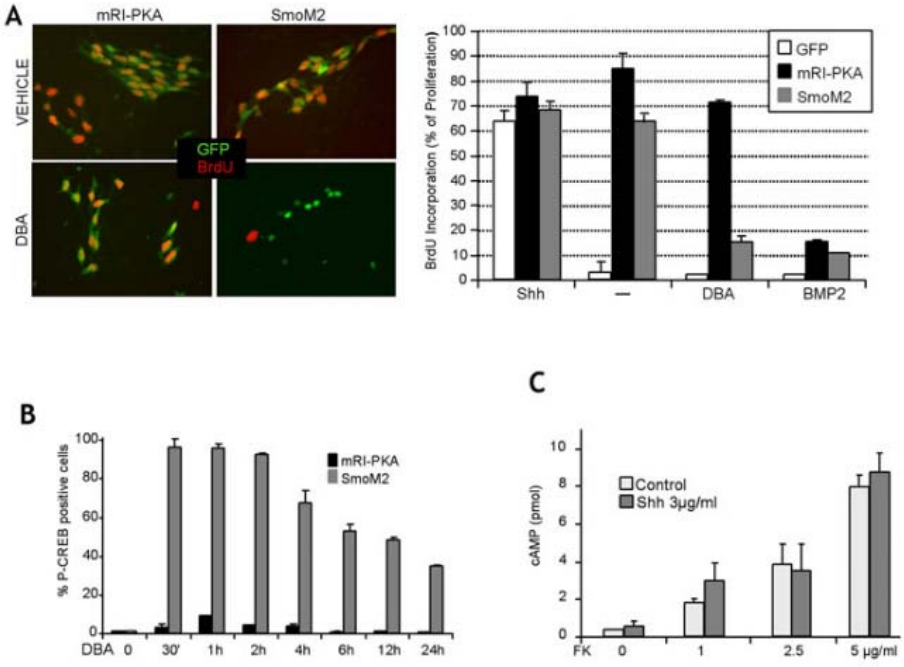


Fig. S3. mRI-PKA and M2-Smo-induce proliferation in CGNPs but total cellular cAMP levels are not modified by Shh. (A) CGNP cultures where transfected with PCIG, a GFAP containing bicistronic vector, expressing either mRI-PKA or M2-Smo. Cells were plated and treated with Shh, vehicle, DBA or BMP2 for 48 hours. At the end of this period, cell proliferation was measured by BrdU incorporation. The right panel shows the mean ± s.d. of at least 1000 transfected cells. (**B**) The capacity of DBA to induce CREB phosphorylation was studied in CGNPs cultures transfected with mRI-PKA or M2-Smo. The cells were transfected and cultured for 48 hours with Shh. DBA was added for different time periods and the cells where fixed and P-CREB expression assessed using a phospho-specific antibody. (**C**) Total cAMP levels were studied by RIA in control or CGNP cultures treated with Shh for 4 hours. The effect of Shh was analysed either under basal conditions or when the PKA was activated by different concentrations of the adenylyl cyclase activator Forskolin.

• **Supplemental Figure S4** -

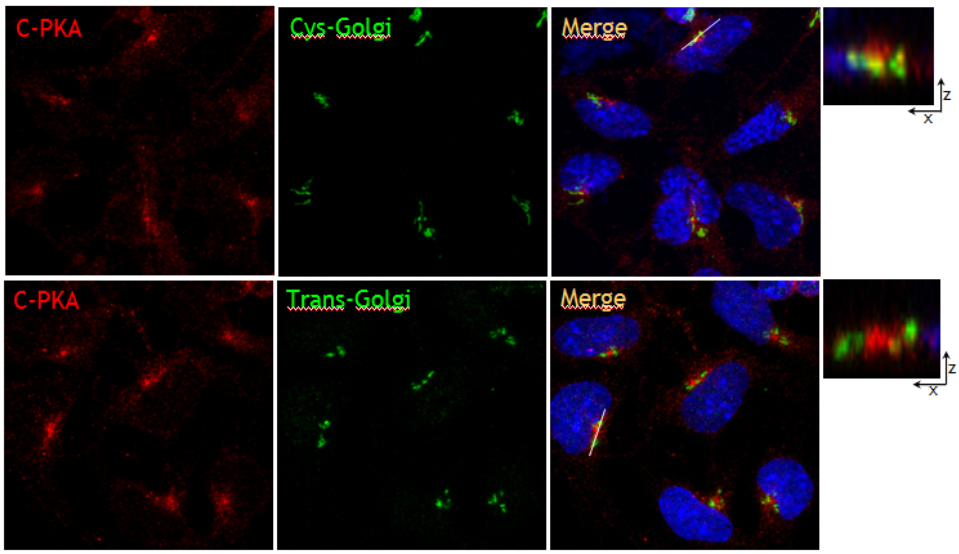
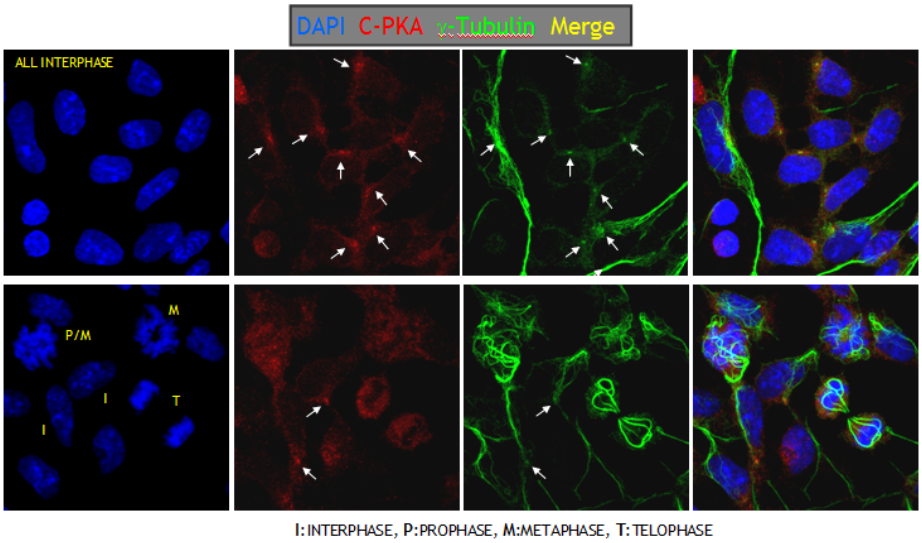


Fig. S4. C-PKA does not colocalize with Golgi complex. The subcellular distribution of C-PKA with respect to the Golgi complex was studied by double-labelling of proliferating CGNPs with anti-C-PKA and anti-cis (GM130) or trans (TGN38) Golgi vesicular components. The Z-plane stacks demonstrated that, although C-PKA and the Golgi complex where always detected in the same sub-cellular region, no colocalization was observed.

• **Supplemental Figure S5** -



I: INTERPHASE, P: PROPHASE, M: METAPHASE, T: TELOPHASE

Fig. S5. Accumulation of C-PKA does not occur during M phase. The localization of C-PKA was studied in proliferating CGNPs at different stages of the cell cycle. The cells were double-labelled with anti-C-PKA and anti-γ-tubulin. (Upper panels) A group of cells at interphase (no signs of DNA condensation by DAPI staining) in which the accumulation of C-PKC was observed (white arrows) in the area of the centrioles. (Lower panels) Cells at interphase and different stages of M phase. No accumulation of C-PKA was detected in any of the cells in M phase. The different stages of the M phase where estimated by the chromosome disposition and the mitotic spindle labelling.

• **Supplemental Figure S6 -**

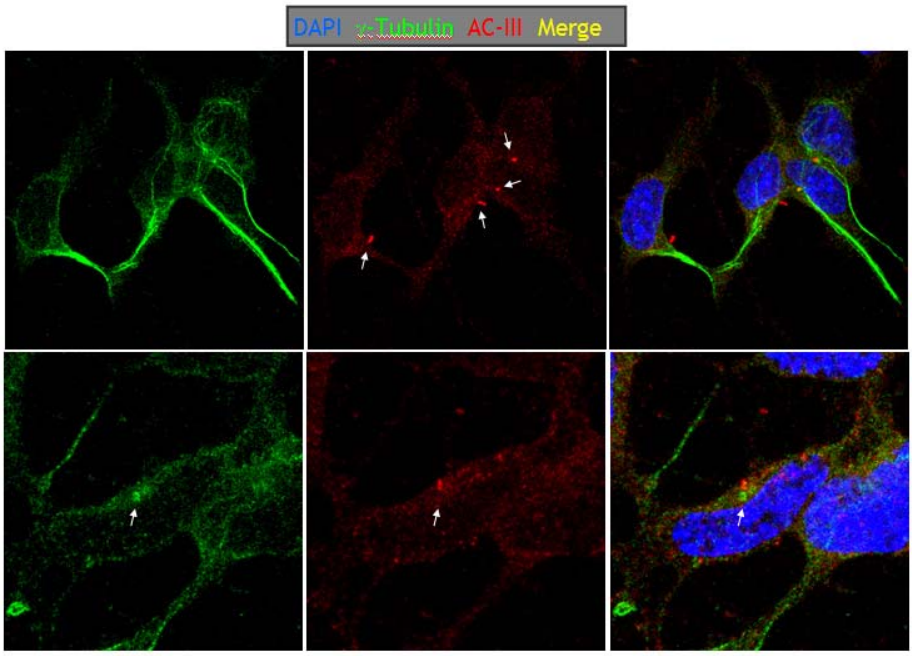


Fig. S6. AC-III is abundantly expressed at the cilium in CGNPs. Proliferating CGNPs were double-stained with anti-AC-III and anti-γ-tubulin antibodies. The upper panels show a group of cells with cilia positioned at different orientations with respect to the cell stained with anti AC-III (white arrows). Note that although the γ-tubulin stained the mitotic spindle in all these cells, the centrioles can be clearly identified at the base of the cilia stained with AC-III. The lower panels are a higher magnification of the same experiment, in which the position of the cilium shaft with respect to the two centrioles is clearly visible. The white arrow is placed exactly at the same position in the three images.

RESUMEN DEL ARTÍCULO 2

La proliferación de los precursores neuronales de células granulares de cerebelo (PNGCs) es mediada por Sonic Hedgehog (Shh), que activa al complejo de receptores formado por Patched y Smoothened. Aunque la secuencia de Smo sugiere que es un receptor acoplado a proteína G (GPCR), las evidencias de que éste utiliza proteínas G heterotriméricas como efectoras de la vía no son muy claras. En *Drosophila melanogaster*, la proteína Gαi es necesaria para la actividad de Hedgehog (Hh), pero la implicación de las proteínas G heterotriméricas en la vía de Shh de vertebrados aún no se ha establecido. En este trabajo demostramos que la inducción de la proliferación de PNGCs se potencia por la expresión de formas activas de proteínas de la familia Gαi/o (Gαi1, Gαi2, Gαi3 y Gαo) pero de otra clase (Gα12) de proteínas G heterotriméricas. Además, la expresión de miembros de la familia de Gαi poseen un patrón de expresión específico en el cerebelo en desarrollo; sólo Gαi2 y Gαi3 se encuentran altamente expresados en la parte más externa de la capa granula externa, donde los PNGCs proliferan. De acuerdo con esto, la proliferación de los PNGCs se reduce de manera significativa con la eliminación de Gαi2 y Gαi3 pero no mediante el silenciamiento de los otros miembros de la familia de Gαi/o. Finalmente, nuestros resultados demuestran que las subunidades Gαi2 y Gαi3 se localizan en el cilio primario cuando se expresan en cultivos de PCGCs. En resumen, concluímos que los efectos proliferativos de Shh en estas células están mediados por la activación combinada de las proteínas Gαi2 y Gαi3.

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2011/01/05/M110.178772.DC1.html

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 10, pp. 8067–8074, March 11, 2011
© 2011 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

Sonic Hedgehog-induced Proliferation Requires Specific Gα Inhibitory Proteins*[S]

Received for publication, August 25, 2010, and in revised form, December 13, 2010 Published, JBC Papers in Press, January 5, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.178772

Mercedes Barzi, Dorota Kostrz, Anghara Menendez, and Sebastian Pons[1]

From the Department of Cell Death and Proliferation, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain

Proliferation of cerebellar granular neuronal precursors (CGNPs) is mediated by Sonic Hedgehog (Shh), which activates the Patched and Smoothened (Smo) receptor complex. Although its protein sequence suggests that Smo is a G protein coupled receptor (GPCR), the evidence that this receptor utilizes heterotrimeric G proteins as downstream effectors is controversial. In *Drosophila*, $G\alpha_i$ is required for Hedgehog (Hh) activity, but the involvement of heterotrimeric G proteins in vertebrate Shh signaling has not yet been established. Here, we show that Shh-induced proliferation of rat CGNPs is enhanced strongly by the expression of the active forms of $G\alpha_{i/o}$ proteins ($G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, and $G\alpha_o$) but not by members of another class ($G\alpha_{12}$) of heterotrimeric G proteins. Additionally, the mRNAs of these different $G\alpha_i$ members display specific expression patterns in the developing cerebellum; only $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ are substantially expressed in the outer external granular layer, where CGNPs proliferate. Consistent with this, Shh-induced proliferation of CGNPs is reduced significantly by knockdowns of $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ but not by silencing of other members of the $G\alpha_{i/o}$ class. Finally, our results demonstrate that $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ locate to the primary cilium when expressed in CGNP cultures. In summary, we conclude that the proliferative effects of Shh on CGNPs are mediated by the combined activity of $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ proteins.

Cerebellar granular neuronal precursors (CGNPs)[2] are generated within the external germinal layer (EGL) during development of the cerebellar cortex. During cerebellum development, CGNPs exit the cell-cycle and migrate through the Purkinje cells to establish the three layers of the cerebellar cortex (1–3). Clonal expansion of CGNPs is achieved by the mitogenic activity of Sonic hedgehog (Shh) signaling emanating from the Purkinje cells to the EGL (4, 5). The binding of Shh to its membrane receptor Patched, located at the peri-ciliar area, promotes the accumulation of Smoothened (Smo) at the primary cilium and concomitant activation of this pathway (6, 7).

The Hedgehog (Hh) pathway can be regulated negatively by sequential phosphorylation of Gli2/3 by PKA, GSK3β and CK (8). These phosphorylation events target Gli2/3 to the proteasome, where removal of its transactivation domain generates a potent transcriptional repressor of the pathway (9, 10). Several lines of evidence suggest that inhibition of PKA is a universal requirement for Hh pathway activation. However, the precise details of this mechanism are not understood. Although PKA enzymatic activity is primarily controlled by cAMP levels, its sub-cellular distribution is determined by the association with specific members of protein kinase A anchoring protein (AKAP) protein family which permits local regulation of its activity (11, 12). In the basal state, the PKA catalytic subunit (C-PKA) is inactive due to the presence of a bound regulatory subunit of PKA. Increased levels of cAMP bind to and displace the regulatory subunit of PKA, thereby permitting active PKA to phosphorylate different substrates (13). The intracellular cAMP levels are regulated by stimulatory and inhibitory GTP-binding proteins (Gα proteins) which control the activity of adenylate cyclase (AC). Heterotrimeric G proteins are a family of intracellular proteins that are activated in response to G protein coupled receptors (GPCRs) and are involved in second messenger cascades. They are bound to the internal surface of the plasma membrane and consist of Gα and the tightly associated Gβγ subunits. There are four classes of Gα subunits: Gαs, $G\alpha_{i/o}$, Gαq/11 and Gα12/13. They share similar mechanisms of activation but differ in the recognition of their effectors. Ligand binding induces a conformational change in the GPCR, allowing it to act as a guanine nucleotide exchange factor (GEF). The exchange of GDP for GTP at the Gα subunit causes dissociation from the Gβγ dimmer, thereby activating other signaling molecules. The Gα subunit has an inherent GTPase activity that hydrolyzes the GTP to GDP and thus, re-associates with the Gβγ dimer (14). The main role of proteins of the $G\alpha_{i/o}$ class is to decrease cAMP production through inhibition of AC.

Smo belongs to the GPCR family and has been reported to activate various members of $G\alpha_{i/o}$ class in reconstituted cell systems like frog melanophores (15) or SF9 insect cells (16). However, G protein independent transduction mechanisms have also been proposed for Smo (17). Recently, it has been shown that, at least in *Drosophila,* Smo functions as a canonical GPCR which signals through $G\alpha_i$ to regulate activation of the Hh pathway (18). Given that important differences in Hh signaling have recently been described between *Drosophila* and mammals, (19, 20) we studied whether $G\alpha_i$ also mediates mam-

* This work was supported by Spanish Ministry of Education Grant BFU2008-02424/BFI.

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Table 1 and Figs. 1–5.

[1] To whom correspondence should be addressed: Institute for Biomedical Research of Barcelona (IIBB-CSIC-IDIBAPS), Roselló 161, 6th floor, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: 34933632382; Fax: 34933638301; E-mail: spfnqi@iibb.csic.es.

[2] The abbreviations used are: CGNP, cerebellar granular neuronal precursor; Smo, Smoothened; Shh, Sonic Hedgehog; GPCR, G protein-coupled receptor; Hh, Hedgehog; AC, adenylate cyclase; CS, coding sequence; ACIII, adenylate cyclase III; PTX, pertussis toxin; PKA, protein kinase A; C-PKA, PKA catalytic subunit; Gαi1QR, Gαi1Q204R.

Downloaded from www.jbc.org at Biblioteca de la Universitat de Barcelona, on May 14, 2011

malian Smo signal transduction. We demonstrate that Shh-induced proliferation of CGNPs was strongly enhanced by recombinant expression of the active forms of $G\alpha_i$ ($G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, and $G\alpha_o$) but not by members of the G12 class of heterotrimeric G proteins. In addition, we show that the different $G\alpha_{i/o}$ class members display distinct expression patterns in the developing cerebellum. Interestingly, only $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ are substantially expressed in the outer external granular layer (oEGL) where CGNPs proliferate. In addition, the capacity of Shh to promote proliferation of CGNPs was reduced significantly by knockdowns of $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ but not other members of the $G\alpha_i$ class. Finally, we show that $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ locate to the primary cilium when expressed in CGNP cultures. Collectively, our results suggest that Shh-induced proliferation of CGNPs is mediated by the combined activity of $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ proteins.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cerebellar Granular Neuronal Precursor Culture and Transfection—P7 rat cerebellar cultures and plate coating were performed as described previously (21). Cell cultures were either transfected with FuGENE 6 (Roche Diagnostics) or electroporated depending on the transfection efficiency requirements. For FuGENE transfection experiments, cells were plated in Neurobasal medium supplemented with B-27 (Invitrogen), 20 mM KCl, 2 mM glutamine, and Shh at 3 μg/ml for 24 h, and at the end of this period, the cells were transfected for 4 h following the manufacturer's guidelines. After removing the transfection mixture, the cultures were washed once, and fresh medium with or without Shh was added. The typical transfection efficiency of this procedure was 5–10%, making it the ideal method for experiments where an accurate cell counting is required. Electroporation was performed in suspension just after the tissue dispersion procedure with the Microporator MP-100 (Digital Bio, Seoul, Korea) according to the manufacturer's instructions, with a single pulse of 1700 mV for 20 ms. As above, electroporated cells were plated in Shh-containing media for 24 h prior to the start of different treatments. This procedure transfects up to 80% of the culture with minimal toxicity and is ideal for biochemistry or reporter assays. N-terminal Shh produced in our laboratory was used as indicated in each experiment.

Plasmid Preparation—Rat $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i3}$, and the corresponding mutants were produced by PCR site-directed mutagenesis. Human $G\alpha_o$, $G\alpha_2$, and their mutants were obtained from Hae Young Suh. Human $G\alpha_{12}$ and its mutant form were obtained from Silvio Gutkind. All $G\alpha$ protein versions used in this study were subcloned into the bicistronic vector pCIG (22) that contains nuclear EGFP as a reporter. To produce the RNA probes used in the *in situ* hybridization experiment, the coding sequence of rat, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, and $G\alpha_{io}$, kindly provided by Randall Reed, were subcloned into pBluescript IIKS. For mRNA knockdown experiments, the DNA primers designed to produce the different shRNA molecules, were cloned into pGHIN a GFP expressing version of pSUPER. The different shRNA target sequences were selected in accordance to the following rules: In brief, a size of 19 bp, not including the first or last nucleotides of the mRNA, flanked at 5′ by AA and, if possible, by TT nucleotides at 3′, the percentage of GC must be >50%, and finally, the sequence should not contain four or more A or T nucleotides together. The selected sequences were blasted against a rat cDNA database to ensure their specificity. We detected four different sequences with the above exposed characteristics in $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_{i2}$ 3′-UTRs and one against the coding region. Although $G\alpha_{i3}$ has a relatively large 3′-UTR, only three targeting sequences could be detected due to its high AT content. In addition, another sequence was found in the coding sequence. On the contrary, $G\alpha_o$ has a very short 3′-UTR and only two sequences were found, but none in the coding region. All targeting primers are listed in supplemental Table 1.

Semiquantitative RT-PCR Quantification of mRNA in Knockdown Experiments—Total cell RNA was purified following the method of Chomcynski and Sacchi (38). RNA integrity and concentration was assessed through spectral analysis with a NanoDrop Fotometer. Equal amounts of RNA were retrotranscribed with Omniscript reverse transcriptase (Qiagen). To avoid genomic DNA interferences, because all $G\alpha_{i/o}$ coding regions contained at least one large intronic sequence, we used primers spanning the entire coding region to measure $G\alpha_{i/o}$ mRNA concentrations. The optimal number of amplification cycles was established for each primer pair and cDNA preparation to ensure that no saturation occurred. GAPDH was used in all reactions as a control gene.

Immunofluorescence and Antibodies—Cells were grown in 24-well plates (Corning, Inc.), fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with methanol, washed three times with PBS/BSA buffer containing 0.2% of Triton X-100, and incubated overnight at 4 °C with the corresponding primary antibodies in this same buffer. For BrdU incorporation experiments, cells were treated with BrdU for 6 h before fixation, and an additional treatment with DNase II (SIGMA) for 15 min was included just after the methanol step. After three washes, cells were incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 488, 594, or 555 (Invitrogen) or Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories), and nuclei were stained with DAPI (Molecular Probes). The monoclonal anti-BrdU antibody was obtained from Developmental Studies Hybridoma Bank, rabbit anti-C-PKA was from Cell Signaling, monoclonal antibodies anti-FLAG (M2) and anti-acetylated tubulin were from Sigma, rabbit anti-adenylate cyclase III (C-20) was from Santa Cruz Biotechnology, mouse monoclonal anti-trans-Golgi (TGN38) was from BD Biosciences, mouse polyclonal anti-HA, rabbit polyclonal anti-FLAG, anti-HA, and anti-GFP antibodies were produced in our laboratory. For confocal images, cells were grown on coated coverslips, which were mounted with Mowiol (CalBiochem). Inmunofluorescent images were obtained either with a Leica inverted fluorescence microscope or a Leica Sp5 confocal spectral scanning microscope.

In Situ Hybridization—P7 rat cerebellum were fixed overnight with 4% of paraformaldehyde and washed three times for 10 min with PBT (DEPC-PBS1x, 0.1% Triton). 50-μm Slices from 10% sacarose/5% agarose blocks were sectioned with a vibratome (Leica) and dehydrated with increasing concentrations of methanol/PBT (25, 50, 75, and 100%). Hybridization was performed at 70 °C using standard procedures and revealed

Downloaded from www.jbc.org at Biblioteca de la Universitat de Barcelona, on May 14, 2011

by alkaline phosphatase-coupled anti-digoxigenin Fab fragments (Roche Applied Science). Rat Gα$_{i/o}$ RNA probes were produced with T7 enzyme from the corresponding cDNA sequences cloned in Bluescript-II-KS.

Proliferation Assays and [^{3}H]Thymidine Incorporation—Electroporated cells were plated for 48 h and then pulsed for 2 h with [^{3}H]thymidine (1 μCi in each well, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Cells were then lysed in 0.04% SDS, and proliferation was measured with a Wallac scintillation counter (Wallac-Perkin Elmer, Quebec, Canada).

Proliferation Assays and BrdU Incorporation, and Statistical Analysis—Cell proliferation was calculated as the percentage of BrdU-positive cells among the transfected population (GFP-expressing cells). Duplicate wells from at least three different cultures were counted (minimum of six wells), lack of coherence between duplicate wells always dismissed both. The number of cells counted per well ranged from 350 to 1500 with an average of 750, mainly depending on the transfection efficiency and the internal data dispersion of each experiment. Quantitative data were expressed as the mean ± S.D. Significant differences among groups were tested by two-way analysis of variance followed by the Tukey's test.

RESULTS

Capacity of Shh to Induce Proliferation of CGNPs Is Strongly Enhanced by Active Forms of Gα$_{i/o}$ Class Members but Not by Gα$_{12}$—Given the apparent discrepancy in CGNPs between the strong proliferative effect of a dominant negative form of PKA (mRI-PKA) and the lack of an effect of Shh on cAMP levels (11), we studied the relevance of Gα$_i$ activity in mammalian Hh signal transduction. In *Drosophila*, the inhibitory Gα$_{i/o}$ class is comprised of only one Gα$_i$ and one Gα$_o$ isoform. In mammals, this family is much more complex and is formed by three Gα$_i$, two Gα$_o$, three Gα$_t$, and one Gα$_z$ (23) (UniProtKB/SwissProt). However, considering that Gα$_t$ function is mostly restricted to taste transduction and that Gα$_z$ activation by Smo was only partially reversed by cyclopamine (16), we restricted our study to Gα$_i$ and Gα$_o$ isoforms. Thus, we created three putative Gα$_{i1}$ constitutive active forms based on known Gα$_s$ mutations (24). These mutations were designed to impair the endogenous Gα GTPase, thereby extending their active state (Gα-GTP). When transfected into CGNPs, all three mutants, Gα$_{i1}$H178R, Gαi1Q204R (Gαi1QR), and Gαi1H178R/Q204R, increased the proliferation rate of CGNPs as measured by BrdU or [^{3}H]thymidine incorporation (Fig. 1*A* and supplemental Fig. 1*A*, respectively), although the most potent effect was obtained with Gαi1QR. However, the proliferative effects were dependent on the presence of Shh, demonstrating that, although this mutation prolongs Gαi1QR activity, priming of the system by Smo was still required. Conversely, the mRI-PKA mutant potently increased (68%) cell proliferation even in the absence of Shh, due to its ligand-independent nature (Fig. 1*B*). Interestingly, Gαi1QR enhanced proliferation progressively as the sub-proliferative amounts of Shh in the culture were increased, reaching up to 42% with 0.25 μg/ml Shh. When CGNPs were cultured with a saturating concentration of Shh (3 μg/ml), the proliferation rates between cells transfected with either empty vector or Gαi1QR were very similar (59 and 64%, respectively), suggesting that when the Shh pathway is fully activated, endogenous Gα$_i$ activity is sufficient to maintain a maximum proliferation rate (Fig. 1*B*). It is worth noting that the wild-type form of Gα$_{i1}$ displayed a marked anti-proliferative effect, even in the presence of saturating concentrations of Shh, but this was not observed with the wild-type forms of Gα$_{i2}$, Gα$_{i3}$, Gα$_o$, or Gα$_{12}$ (supplemental Fig. 1*B*).

With the aim of identifying which Gα$_{i/o}$ class members mediate Shh-induced proliferation in CGNPs, we next studied the proliferation induced by transfecting GTPase-deficient mutants of Gα$_{i2}$ (Q204L), Gα$_{i3}$ (Q204L), Gα$_o$ (Q205L), and Gα$_{12}$ (Q231L) in cultures growing in a sub-proliferative concentration of Shh (0.25 μg/ml). Although Gα$_{12}$ does not belong to the Gα$_{i/o}$ class, it was included as it has been reported to participate in Shh signaling through Rho-kinase activation (25). Unexpectedly, all Gα$_{i/o}$ class members increased proliferation rates at similar levels when transfectd in CGNPs cultured with a low Shh concentration (0.25 μg/ml). In contrast, under these same conditions, the proliferation rate of cells transfected with the active form of G12 was lower than that of cells transfected with empty vector (Fig. 1*C*). Collectively, theses results suggest that Gα$_{i/o}$ members do indeed mediate Shh signaling in CGNPs.

Gα$_{i2}$ and Gα$_{i3}$ Are Specifically Enriched in Outer EGL of Developing Cerebellum—Given that the results with the activating mutants suggested that Shh signaling in CGNPs could be mediated indiscriminately by all Gα$_{i/o}$ members, we next explored the expression patterns of Gα$_o$, Gα$_{i1}$, Gα$_{i2}$, and Gα$_{i3}$ mRNAs in P7 rat cerebellum (Fig. 2). Using *in situ* hybridization, very distinct layer distributions could be appreciated at low magnification (Fig. 2, *a–d*). The expression pattern of each Gα$_{i/o}$ member in the different cerebellum layers was confirmed by comparing *in situ* hybridization alone (Fig. 2, *e–h*) with *in situ* hybridization plus immunohistochemistry performed with the Purkinje cell marker, Calbindin (Fig. 2, *i–l*). Thus, commencing from the innermost layer, we observed that the mRNAs of all four members of the Gα$_{i/o}$ class were significantly expressed at the internal granular layer, which contains primarily differentiated granular cells and Golgi cells in much lower abundance. Gα$_o$ and Gα$_{i1}$ were predominant forms expressed in the Purkinje cell layer, which is basically occupied by the huge cell bodies of Purkinje cells. In the adult cerebellum, the molecular layer is formed exclusively by the Purkinje cell dendrites, the granular cell axons, and low abundance interneurons, and although at P7, it also contains migrating granular cells, it is typically an area of low reactivity for most mRNAs probes due to its acellular nature. The internal part of the external granular layer contains the granular cells that have stopped dividing and initiated migration. In this layer, only Gα$_o$ expression was differentially augmented. Finally, the oEGL is where CGNPs intensively proliferate in response to Shh during early postnatal development (2 weeks in rat cerebellum). Interestingly, this layer expressed comparatively low levels of Gα$_{io}$ and Gα$_{i1}$ mRNAs and high levels of Gα$_{i2}$ and Gα$_{i3}$. Thus, we concluded that each of the four Gα$_{i/o}$ class members displays a distinct expression pattern, suggestive of participation in different signaling pathways.

Downloaded from www.jbc.org at Biblioteca de la Universitat de Barcelona, on May 14, 2011

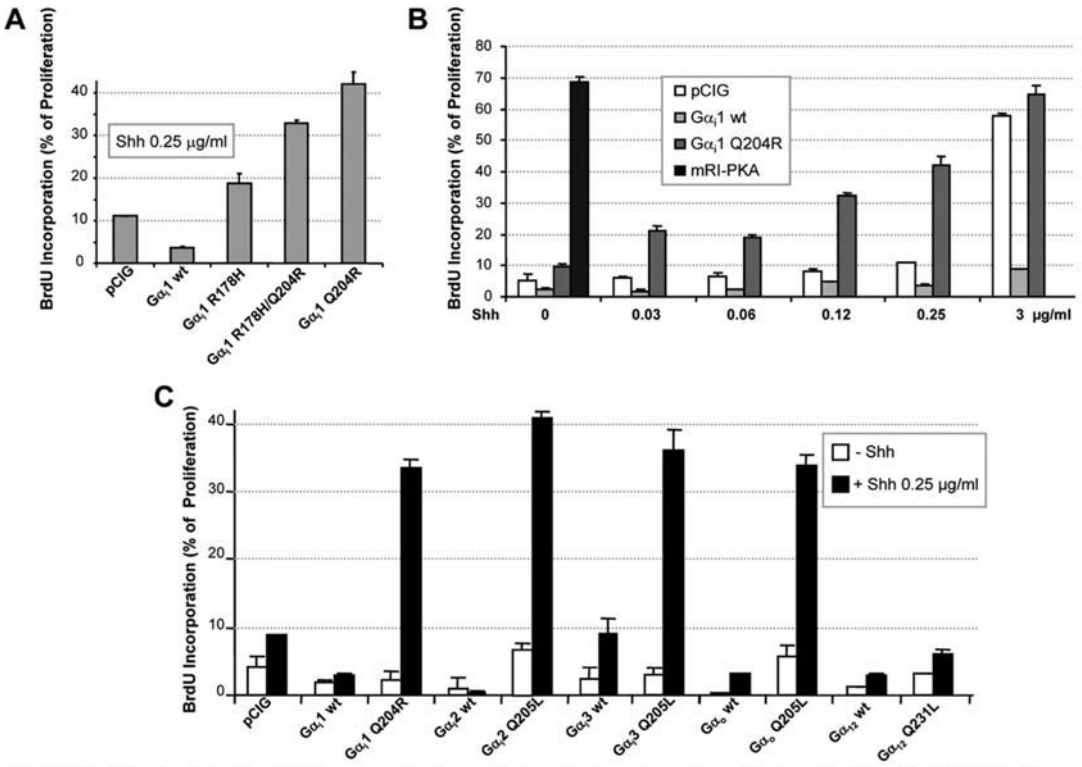


FIGURE 1. **Shh-induced proliferation of CGNPs is strongly enhanced by the active forms of members of the Gα$_{i/o}$ class but not by G12.** CGNP cells were plated in a saturating concentration of Shh (3 μg/ml) and transfected with different wild-type or active mutant forms of Gα cloned into pCIG, a nuclear GFP-expressing bicistronic vector. After 24 h, cells were washed and treated for an additional 48 h with the indicated amounts of Shh, and proliferation was analyzed by BrdU incorporation. *A*, comparison of different Gα$_{i1}$-activating mutations at 0.25 μg/ml Shh. *B*, proliferation was studied in cells transfected with wild-type Gα$_{i1}$, Gαi1Q204R, or mRI-PKA and treated with increasing amounts of Shh (0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, and 3 μg/ml). *C*, comparison of the proliferation induced by expression of wild-type or active mutant forms of Gα$_{i1}$, Gα$_{i2}$, Gα$_{i3}$, Gα$_o$, and Gα$_{12}$ in CGNPs maintained in 0.25 μg/ml Shh.

Knockdowns of Gα$_{i2}$ and Gα$_{i3}$ Significantly Reduce Shh-induced Proliferation in CGNP Cultures—Encouraged by the unique expression patterns of the different Gα$_{i/o}$ class members in the developing cerebellum, we next asked whether knockdowns of each would differentially alter Shh-induced proliferation of CGNPs. Thus, we designed different DNA sequences encoding short hairpin inhibitory RNA molecules (shRNA), which would target either the 3′-UTR (UTR) or the coding sequence (CS) of the different members of the Gα$_{i/o}$ class (see "Experimental Procedures" for details). These were then cloned into pGHIN (a pSUPER-based GFP-expressing bicistronic vector). The shRNA-expressing constructs were transfected in CGNPs cultured with a saturating concentration of Shh (3 μg/ml), and 48 h later, proliferation was measured by BrdU incorporation (Fig. 3). In addition, half of each transfected culture was used to evaluate the targeting efficiency of each shRNA by RT-PCR. As previously observed, shRNAs directed to CS were less efficient at reducing expression (Fig. 3, *A* and *B*, and supplemental Fig. 2 for representative cell pictures). Although most shRNAs designed against the 3′-UTRs efficiently reduced the mRNA levels of their targets, only the shRNAs directed against Gα$_{i2}$ and Gα$_{i3}$ attenuated significantly Shh-induced proliferation in CGNPs cultures (Fig. 3, *A* and *B*). Similar results were obtained when the effect of expressing different shRNA constructs on [^{3}H]thymidine incorporation, was tested in cultures treated with growing concentrations of Shh (supplemental Fig. 1*C*). These results agrees well with the expression patterns of the different Gα$_{i/o}$ class members in P7 rat cerebellum, where only Gα$_{i2}$ and Gα$_{i3}$ were appreciably expressed in the oEGL (Fig. 2). In an attempt to further define the individual roles played by Gα$_{i2}$ and Gα$_{i3}$ in mediating Shh-induced proliferation of CGNPs, we next tested the effects of reducing the expression of both molecules simultaneously. Using the experimental conditions described above, equal amounts of plasmid DNA encoding the most efficient shRNA for Gα$_{i2}$ and Gα$_{i3}$ (Gi2UTR2 and Gi3UTR2) were co-transfected into CGNPs. Additionally, different combinations of Gi2UTR2 or Gi3UTR2 with empty vector or the low performance Gi2CS were tested as controls. The combined effect of simultaneous knockdowns of Gα$_{i2}$ and Gα$_{i3}$ on Shh-induced proliferation was much greater than either of the individual knockdowns, whereas other combinations had no significant additional inhibitory effects (Fig.

Downloaded from www.jbc.org at Biblioteca de la Universitat de Barcelona, on May 14, 2011

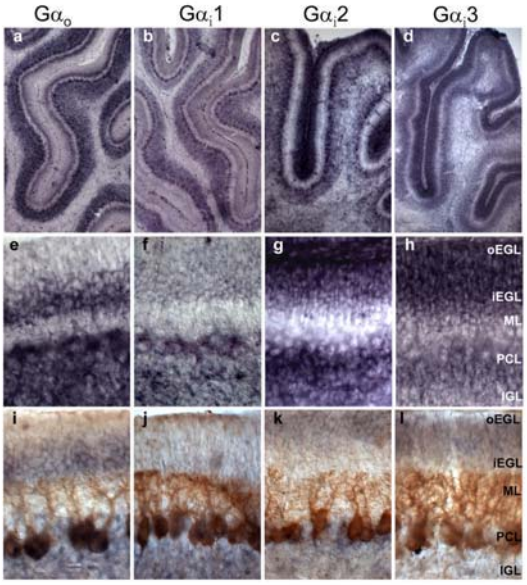


FIGURE 2. **In situ hybridization analysis of $G\alpha_{i/o}$ mRNA at P7 in rat cerebellum.** mRNA levels of $G\alpha_o$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, and $G\alpha_{i3}$ were studied in P7 rat cerebellum by *in situ* hybridization using rat specific riboprobes. *a–d*, low magnification images reveal the unique expression patterns of the mRNAs of the various $G\alpha_{i/o}$ class members. *e–h*, high magnification photos of the mRNA levels in the different cerebellar layers: oEGL, inner external granular layer (*iEGL*), molecular layer (*ML*), Purkinje cell layer (*PCL*), and internal granular layer (*IGL*). *i–l*, high magnification photos of the *in situ* hybridization of the $G\alpha_{i/o}$ class members combined with immuno-histochemistry against the Purkinje cell marker, calbindin, to further delineate the extension of each cerebellar layer. Only $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ were significantly expressed at the oEGL were CGNPs proliferate.

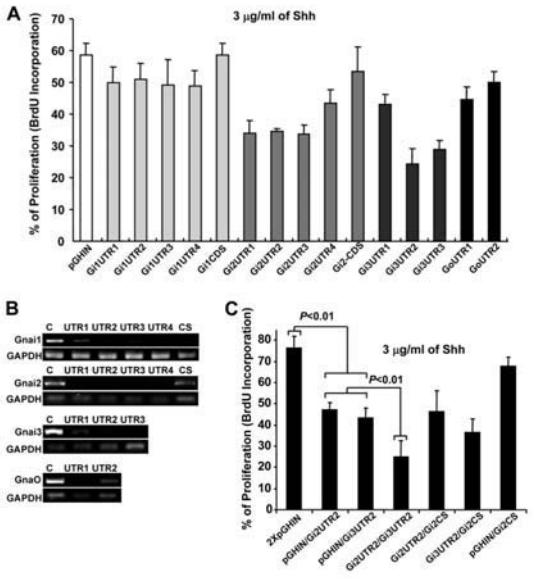


FIGURE 3. **$G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ knockdowns significantly reduce Shh induced CGNP proliferation.** Different DNA sequences encoding shRNA, targeting either the 3′UTR (*UTR*) or CS of the different $G\alpha_{i/o}$ class members, were cloned into pGHIN (a pSUPER-based GFP-expressing bicistronic vector). The number of shRNAs designed for each $G\alpha_{i/o}$ depended on the availability of adequate targeting motifs in the respective sequences (see "Experimental Procedures" for details). *A*, the shRNA expressing constructs were electroporated into freshly isolated CGNPs, which were then halved and grown in a saturating concentration of Shh (3 μg/ml) for 48 h. One culture was used to isolate mRNA for RT-PCR analysis and the other to measure proliferation by BrdU. *B*, the targeting efficiency of each shRNA was evaluated by RT-PCR. A direct correlation between targeting efficiency and proliferation reduction was observed only for shRNAs targeting $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$. *C*, the most efficient shRNAs against $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ (Gi2UTR2 and Gi3UTR2) were assayed together or in combination with Gi2CS, a low efficiency shRNA which was used as a control. The total amount of DNA was equivalent for all transfections. Proliferation was significantly reduced compared with empty vector when either Gi2UTR2 or Gi3UTR2 were transfected ($p < 0.01$). Double transfection of Gi2UTR2 and Gi3UTR2 significantly reduced proliferation as compared with single transfections or to doubles with Gi2CS ($p < 0.01$).

3*C*). It is worth noting that no additional reduction of proliferation was ever observed when two shRNA against the same molecule were combined (data not shown). These results strongly suggest that Shh-induced proliferation in CGNPs is mediated by the additive effects of $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$.

Ectopic Expression of Different $G\alpha_{i/o}$ Class Proteins, but Not $G\alpha_{12}$, Rescues Impaired Proliferation Caused by $G\alpha_{i2}$/$G\alpha_{i3}$ Knockdown—Although sequence analysis predicted that all shRNAs used in the previous experiment were 100% specific for their indicated targets, cross-reactivity with other genes cannot be totally excluded. Thus, to demonstrate specificity, we tested whether the anti-proliferative effects induced by $G\alpha_{i2}$/$G\alpha_{i3}$ knockdowns could be restored by co-transfecting shRNA-resistant expression constructs (coding sequences with no UTRs) of these molecules. Hence, CGNP cultures were transfected with mixtures containing Gi2UTR2/Gi3UTR2 and constructs to express wild-type (Fig. 4*A*) or active forms (Fig. 4*B*) of the different members of the $G\alpha_{i/o}$ class. Interestingly, Shh-induced proliferation was rescued by both wild-type and active forms of $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, and $G\alpha_o$ but not by $G\alpha_{12}$. This result was consistent with the experiments shown in Fig. 1*C*, where similar levels of cell proliferation were induced by overexpressing the individual members of the $G\alpha_{i/o}$ class but not with $G\alpha_{12}$. Moreover, wild-type $G\alpha_{i1}$ did not rescue proliferation, in agreement with its anti-proliferative effect observed in Fig. 1*B* and supplemental Fig. 1*B*. Selected images of these experiments are shown in Fig. 4*C*, and a complete set of images is presented in supplemental Fig. 3. These observations reinforce the notion that although $G\alpha_{i/o}$ class molecules display rather specific expression patterns in the developing cerebellum, their function is interchangeable, at least, in transmitting Shh-induced proliferation of CGNPs under our experimental conditions.

Three $G\alpha_i$ Members Are Distributed Differently between Base and Shaft of Primary Cilium—Various lines of evidence have demonstrated that the primary cilium acts as the main integration center for Shh signaling, because the majority of molecules involved in Shh signaling have been observed in the vicinity of the cilium. On the other hand, members of the $G\alpha_i$ family transduce signals from a wide range of membrane receptors in addition to Smo. Thus, we studied the cellular distribution of $G\alpha_i$ isoforms in the cilium and although the knockdown experiments suggested the potential importance of $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ subunits, we also evaluated the expression pattern of $G\alpha_{i1}$. To

Downloaded from www.jbc.org at Biblioteca de la Universitat de Barcelona, on May 14, 2011

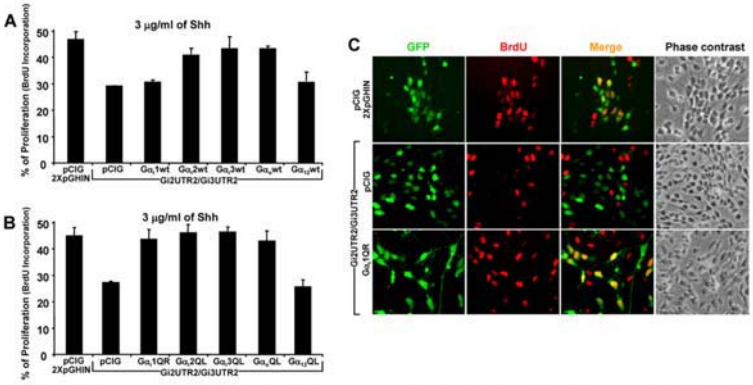


FIGURE 4. **Expression of different $G\alpha_{i/o}$ class members but not $G\alpha_{12}$ rescues the impaired proliferation caused by $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ knockdowns.** Freshly isolated CGNPs were electroporated with mixtures of cDNA containing Gi2UTR2/Gi3UTR2 and constructs including wild-type (*A*) or active forms (*B*) of the different $G\alpha_{i/o}$ class members. Cells were cultured in a saturating concentration of Shh (3 μg/ml) for 48 h, and proliferation was measured by BrdU incorporation. Selected images of transfected cells are shown in *C*. A more complete panel of images is presented in supplemental Fig. 3.

avoid complications of cross-reactivity or nonspecific staining observed for most of the commercial antibodies tested, we cloned FLAG-tagged constructs for the different $G\alpha_i$ subunits in pCIG, a nuclear-GFP expressing bicistronic vector that permitted us to assess $G\alpha_i$ distribution in transfected cells. We generated Z-stacks from confocal images of cells double-stained with anti-FLAG and anti-adenylate cyclase III (ACIII), a cilium shaft marker (11, 26). Although positive staining was detected throughout cells transfected with the individual constructs, a periciliar (below and surrounding the cilium shaft) accumulation was observed for each of the three subunits in CGNPs. However, we observed marked differences with respect to their expression in the cilium shaft. $G\alpha_{i1}$ was detected at the periciliar area but never in the shaft (Fig. 5*A*). Although $G\alpha_{i2}$ was also detected in most cells below the cilium, low levels of this protein were detected in the cilium shaft of some cells (see Fig. 5*B*, which depicts two neighbor cells with similar $G\alpha_{i2}$ periciliar expression, one of which also expresses $G\alpha_{i2}$ in the cilium shaft). Finally, $G\alpha_{i3}$ was detected mainly in the cilium shaft rather than underneath it, where it accumulates similarly to Smo (Fig. 5*C* and supplemental Fig. 4*C*). Thus, although these results suggested that $G\alpha_{i3}$ localization could be mediated through its binding to Smo, we did not observe the required stable association between these two molecules (supplemental Fig. 4*A*). Moreover, $G\alpha_{i3}$ location to the cilium was not affected by Shh deprivation, which prevents Smo accumulation at the cilium (supplemental Fig. 4*B*), neither by the trasnsfection of SmoM2, an active form of Smo that constitutively accumulates at the cilium (supplemental Fig. 4*C*). To further define the periciliar location of $G\alpha_i$, we double-stained FLAG-$G\alpha_{i1}$ transfected cells with anti-FLAG and anti-C-PKA or anti-TGN38, a trans-Golgi marker. We have previously shown that C-PKA in CGNPs locates at the cilium base surrounding the centrioles (11). The present results revealed that $G\alpha_{i1}$ distributes around the area positive for anti-C-PKA, coincident with the vesicles of the trans-Golgi network (supplemental Fig. 5).

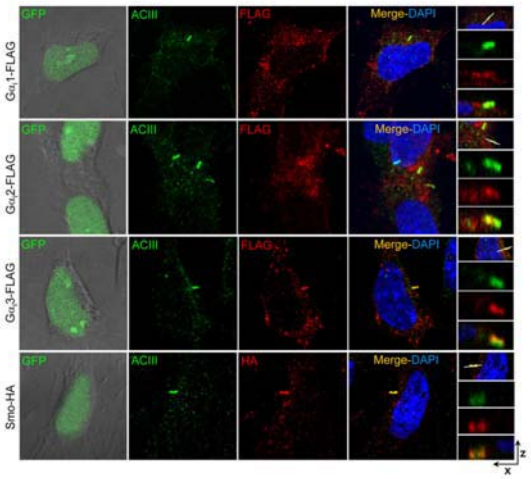


FIGURE 5. **The three $G\alpha_i$ members are distributed differently between the base and the shaft of the primary cilium.** CGNP cultures were transfected with FLAG tagged constructs of $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, and $G\alpha_{i3}$ subunits cloned in pCIG, a nuclear-GFP expressing bicistronic vector that permitted us to compare the $G\alpha_i$ distribution in similarly transfected cells. Transfection of Smo-HA was included as a positive control. Cells were cultured for 48 h with 3 μg/ml of Shh, fixed, and double-stained with rabbit anti-ACIII (used as a cilium marker) and mouse anti-FLAG or anti-HA. The *first column* depicts images of direct GFP fluorescence combined with phase contrast pictures, demonstrating the transfection levels of each cell. ACIII staining was detected with anti-rabbit Cy5 (far red 675) but has been colored *green* for clarity. FLAG or HA tags were detected with anti-mouse Alexa Fluor 555 (*red*). The last column contains Z-stacks generated from the confocal images.

DISCUSSION

Smo Signals through Gα Inhibitory Proteins in CGNPs—The downstream components of Smo signaling have long been a question of intense debate. Although its protein sequence clearly predicts that Smo belongs to the GPCR family, the evidence that this receptor uses heterotrimeric G proteins as downstream effectors is inconclusive. Early experiments in zebrafish embryos demonstrated that inhibition of $G\alpha_i$-medi-

Downloaded from www.jbc.org at Biblioteca de la Universitat de Barcelona, on May 14, 2011

ated events with pertussis toxin (PTX) produced phenotypes, which resembled those obtained by inhibition of the Hh pathway, suggesting a possible role for Gα_i in Smo signaling (27). Similarly, expression of human Smo in frog melonophores caused a phenotype of persistent pigment aggregation that could be blocked by PTX (15). However, other reports have shown that neither PTX nor Gα_i Q205L has effects on Hh-mediated events in chicken embryos such as spinal cord patterning and Gli3 processing, suggesting that G proteins may not be required for all Hh-dependent signaling. Additionally, silencing of a wide spectrum of G protein subunits in cultured Drosophila cells failed to disrupt Hh signaling (28). Nevertheless, a more recent report has demonstrated a direct activation of different G$\alpha_{i/o}$ class members by Smo in a reconstituted SF9 cell system (16). These authors additionally showed that, in NIH-3T3 cells, PTX inhibits Gli-dependent luciferase activity stimulated either by addition of Shh or the transfection of an oncogenic form of Smo (SmoM2). Another line of evidence to support the involvement of heterotrimeric G proteins in Smo signaling has come from the embryonic fibroblasts of Patched-1 knock-out mice where transcription of Hh target genes appears to depend on Gα_i-mediated signal transduction (29). Finally, it has recently been shown that at least in *Drosophila*, Smo functions as a canonical GPCR, which signals through Gα_i to regulate Hh pathway activation (18). In the present work, we demonstrate that Shh-induced proliferation of rat CGNPs is enhanced by recombinant expression of active forms of G$\alpha_{i/o}$ class. Conversely, when endogenous G$\alpha_{i/o}$ proteins were knocked down by shRNA transfection, Shh-mediated proliferation was reduced significantly. Our results agree completely with the results obtained in *Drosophila* (18) and reflect the first study to implicate Gα_i proteins in a physiologic process (proliferation of CGNPs) mediated by Hh activity in mammals. It is worth noting that the signal transduction associated with the different Hh-mediated processes, such as proliferation and patterning, may have different molecular components. When attempting to reconcile all the data mentioned above, one must bear in mind that studies performed with PTX must be interpreted with caution because not all cell types can process this toxin (23). Likewise, is important to note that, although the Gα_i Q205L mutation used in particular studies (29) extends the period in which Gα_i is active (Gα_i-GTP), it is not a constitutively active mutant and thus, still requires an upstream signal for activation. Consistent with this, the data we present in Fig. 1*B* demonstrates that this same mutant could enhance proliferation of CGNPs but only if a minimum of Shh was present in the culture medium.

Smo Specificity among G$\alpha_{i/o}$ Class Members—Relatively few types of G proteins transduce signals from a vast number of GPCRs. Regulating the specificity of these interactions is important for proper signal transduction. Therefore, the receptor-G protein interface must contain important information that determines which G proteins can interact with a particular receptor. However, although many of the contact sites that comprise this interface have been identified, the connections that define the coupling between receptors and specific G protein family members remain poorly defined (14). Although it is now clear that the three components of the G protein trimer (α,β,γ) may participate in the receptor-G protein binding, it is still not possible to predict which class of G proteins will interact with a particular GPCR (14). In the present work, we found that all G$\alpha_{i/o}$ class members, but not Gα_{12}, were able to mediate Shh signaling. Similarly, Riobo and colleagues (16) demonstrated that Smo-induced GTP loading was restricted to G$\alpha_{i/o}$ class members. Kasai *et al.* (25), however, have reported that Shh-induced activation of Gli in HEK-293 cells was repressed by the inhibitors of Gα_{12} or Rho, a downstream effector of Gα_{12}. It is possible that Gli-dependent transcription requires Rho activity, but our current results strongly suggest that Gα_{12} is not essential for Smo activity in CGNPs. Similar to other studies (16), we observed that the capacity to promote Shh-induced proliferation in CGNPs was similar among the members of the G$\alpha_{i/o}$ class. These results suggest that, at least in terms of cell proliferation, Smo signals can be mediated by any member of this class of G proteins when overexpressed. Alternatively, a G$\beta\gamma$-dependent effect could be considered in this way; it has been reported that the G$\beta\gamma$ complex can modulate local cAMP production through regulating the activity of specific AC isoforms (30). Nevertheless, the fact that proliferation was increased by the active forms of the G$\alpha_{i/o}$ class and not by the wild-type molecules and that GTPase-deficient G$\alpha_{i/o}$ mutants decrease Gβ/γ turnover instead of augmenting it, strongly suggests that the lack of specificity can be a direct consequence of the overexpression itself. On the other hand, only the silencing of Gα_{i2} and/or Gα_{i3} significantly impaired proliferation, indicating that, although all class members can mediate Smo-dependent proliferation, only Gα_{i2} and Gα_{i3} are expressed appropriately for the transduction of Shh proliferation signals in CGNPs. These results are consistent with the mRNA expression patterns of the G$\alpha_{i/o}$ members in the developing cerebellum (Fig. 2); only Gα_{i2} and Gα_{i3} were expressed at the oEGL where the CGNPs proliferate.

Gα$_i$ Subcellular Distribution and Function—Local regulation of cAMP production at the primary cilium may function as a key event in Shh signal transduction (11, 31). Recently, we have demonstrated that the activity of PKA, which accumulated at the cilium base, was directly regulated by Shh signaling (11). Therefore, we hypothesized that cAMP production at the cilium may be locally controlled by Smo. Consistent with this, high levels of ACIII were detected in the cilium shaft, although participation of this specific isoform of AC in Shh signaling has not yet been established. According to this working hypothesis, signal transduction from Smo to AC would require Gα_i in the cilium. With the present study, we now show that Gα_{i3} clearly accumulates in the cilium shaft of rat CGNPs. In addition, knockdown of Gα_{i3} reduced more potently the Shh-induced proliferation of CGNPs as compared with the knockdowns of the other Gα_i proteins. Moreover, a direct correlation between distribution to the cilium and impaired proliferation could be observed, suggesting that the localization of Gα_i proteins to the cilium is a requirement for their participation in Shh signal transduction. On the other hand, we have also observed that the constitutive mutants of Gα_{i1} and Gα_{i2} increased cell proliferation to the same extent as Gα_{i3}, although Gα_{i1} and Gα_{i2} were detected predominantly at the cilium base rather than in the shaft. Additionally, the knockdown experiments of Fig. 4 clearly

Downloaded from www.jbc.org at Biblioteca de la Universitat de Barcelona, on May 14, 2011

demonstrate that reduction of both Gα$_{i2}$ and Gα$_{i3}$ expression has an additive effect on Smo signal transduction, although Gα$_{i2}$ was localized mainly out of the cilium shaft. These results, along with the surprising antiproliferative activity demonstrated by the wild-type Gα$_{i1}$, suggest a more complex mechanism than simple regulation by distribution to the cilium. It was recently demonstrated that the control Smo entrance into the cilium is a rather a complicated mechanism (32) that depends on a Septin diffusion barrier at the cilium base (33); however, a participation of Gα$_i$ on ciliar Smo location seems not to occur because we have observed it to be independent of Gα$_i$ signaling (supplemental Fig. 4*D*). Proper anterograde and retrograde intraflagellar transport are both required for cilium formation, maintenance, and signaling of cilium-dependent pathways (34). Likewise, vesicular traffic from the trans-Golgi network to the cilium has been considered as the main source of proteins entering the cilium (35). Conversely, Milenkovic *et al.* (32), using innovative SNAP-tag technology, have recently demonstrated that at least for Smo, lateral diffusion and local recycling are the main sources of Smo entering the cilium upon Shh stimulation. In agreement with this study, the expression of a dominant negative form of the Rab23, a small GTPase previously implicated in vesicular traffic, caused a significant decrease of Smo recycling pathway when measured by fluorescence recovery after photobleaching of cilium yellow fluorescent protein-SmoA1 (36). Consequently, the cilium shaft and base should not be considered as separate compartments but rather as a continuous conveyor belt where the different signaling molecules cycle and interact with each other in a dynamic manner. Thus, Gα$_i$ at the cilium base could interact with the Smo exiting the cilium, thereby inhibiting the ACIII pool in the lower part of the shaft. This proposed model could explain the fact that, although the active form of Gα$_{i1}$ was detected mainly out of the cilium shaft, it still mediated Shh-induced proliferation activity in CGNPs. Interestingly, Gα$_i$ has also been reported to control microtubule dynamics through an AC-independent mechanism (37). Thus, although the experiments mentioned in Introduction clearly indicate that control of AC is the main task performed by Gα$_i$ in Shh signaling, AC-independent activities cannot be excluded for the different Gα$_i$ proteins. Due to the complexities of the system, which cannot be captured by static methods, a complete understanding of the details of Smo signal transduction mechanisms will require simultaneous real-time recordings of Smo, ACIII, and the different Gα$_i$.

Acknowledgments—We wish to thank the invaluable research assistance of Anghara Menendez. We are grateful to all of the researchers who sent us the cDNAs as detailed under "Experimental Procedures." We kindly thank Dr. Deborah Burks for editing the manuscript.

REFERENCES

1. Altman, J. A., and Bayer, S. A. (1997) *Development of the Cerebellar System in Relation to Its Evolution, Structure, and Functions*, CRC Press, Boca Raton, FL
2. Hatten, M. E., and Heintz, N. (1995) *Annu. Rev. Neurosci.* **18,** 385–408
3. Ramon y Cajal, S. (1911) *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebrates*, Malonie, Paris, France
4. Dahmane, N., Ruiz, i., and Altaba, A. (1999) *Development* **126,** 3089–3100
5. Wechsler-Reya, R. J., and Scott, M. P. (1999) *Neuron* **22,** 103–114
6. Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y., and Reiter, J. F. (2005) *Nature* **437,** 1018–1021
7. Rohatgi, R., Milenkovic, L., and Scott, M. P. (2007) *Science* **317,** 372–376
8. Tempé, D., Casas, M., Karaz, S., Blanchet-Tournier, M. F., and Concordet, J. P. (2006) *Mol. Cell. Biol.* **26,** 4316–4326
9. Wang, B., Fallon, J. F., and Beachy, P. A. (2000) *Cell* **100,** 423–434
10. Wang, B., and Li, Y. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103,** 33–38
11. Barzi, M., Berenguer, J., Menendez, A., Alvarez-Rodriguez, R., and Pons, S. (2010) *J. Cell Sci.* **123,** 62–69
12. McConnachie, G., Langeberg, L. K., and Scott, J. D. (2006) *Trends Mol. Med.* **12,** 317–323
13. Iyer, G. H., Moore, M. J., and Taylor, S. S. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 8800–8807
14. Oldham, W. M., and Hamm, H. E. (2007) *Adv. Protein Chem.* **74,** 67–93
15. DeCamp, D. L., Thompson, T. M., de Sauvage, F. J., and Lerner, M. R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 26322–26327
16. Riobo, N. A., Saucy, B., Dilizio, C., and Manning, D. R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103,** 12607–12612
17. Ruiz-Gómez, A., Molnar, C., Holguín, H., Mayor, F., Jr., and de Celis, J. F. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1768,** 901–912
18. Ogden, S. K., Fei, D. L., Schilling, N. S., Ahmed, Y. F., Hwa, J., and Robbins, D. J. (2008) *Nature* **456,** 967–970
19. Gerdes, J. M., Davis, E. E., and Katsanis, N. (2009) *Cell* **137,** 32–45
20. Varjosalo, M., Li, S. P., and Taipale, J. (2006) *Dev. Cell* **10,** 177–186
21. Rios, I., Alvarez-Rodríguez, R., Martí, E., and Pons, S. (2004) *Development* **131,** 3159–3168
22. Megason, S. G., and McMahon, A. P. (2002) *Development* **129,** 2087–2098
23. Riobo, N. A., and Manning, D. R. (2007) *Biochem. J.* **403,** 369–379
24. Landis, C. A., Masters, S. B., Spada, A., Pace, A. M., Bourne, H. R., and Vallar, L. (1989) *Nature* **340,** 692–696
25. Kasai, K., Takahashi, M., Osumi, N., Sinnarajah, S., Takeo, T., Ikeda, H., Kehrl, J. H., Itoh, G., and Arnheiter, H. (2004) *Genes Cells* **9,** 49–58
26. Bishop, G. A., Berbari, N. F., Lewis, J., and Mykytyn, K. (2007) *J. Comp Neurol.* **505,** 562–571
27. Hammerschmidt, M., and McMahon, A. P. (1998) *Dev. Biol.* **194,** 166–171
28. Lum, L., Yao, S., Mozer, B., Rovescalli, A., Von Kessler, D., Nirenberg, M., and Beachy, P. A. (2003) *Science* **299,** 2039–2045
29. Low, W. C., Wang, C., Pan, Y., Huang, X. Y., Chen, J. K., and Wang, B. (2008) *Dev. Biol.* **321,** 188–196
30. Diel, S., Klass, K., Wittig, B., and Kleuss, C. (2006) *J. Biol. Chem.* **281,** 288–294
31. Milenkovic, L., and Scott, M. P. (2010) *Sci. Signal.* **3,** e14
32. Milenkovic, L., Scott, M. P., and Rohatgi, R. (2009) *J. Cell Biol.* **187,** 365–374
33. Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M. P., Nachury, M. V., Spiliotis, E. T., and Nelson, W. J. (2010) *Science* **329,** 436–439
34. Pedersen, L. B., and Rosenbaum, J. L. (2008) *Curr. Top. Dev. Biol.* **85,** 23–61
35. Wang, Y., Zhou, Z., Walsh, C. T., and McMahon, A. P. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106,** 2623–2628
36. Boehlke, C., Bashkurov, M., Buescher, A., Krick, T., John, A. K., Nitschke, R., Walz, G., and Kuehn, E. W. (2010) *J. Cell Sci.* **123,** 1460–1467
37. Yu, J. Z., Dave, R. H., Allen, J. A., Sarma, T., and Rasenick, M. M. (2009) *J. Biol. Chem.* **284,** 10462–10472
38. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162,** 156–159

Downloaded from www.jbc.org at Biblioteca de la Universitat de Barcelona, on May 14, 2011

SONIC HEDGEHOG INDUCED PROLIFERATION REQUIRES SPECIFIC G-ALPHA-INHIBITORY PROTEINS

Mercedes Barzi[1], Dorota Kostrz[1], Anghara Menendez[1] and Sebastian Pons[1]

LEGENDS FOR SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Fig 1. (A) Shh-induced proliferation of CGNPs is strongly enhanced by the active forms of members of the Gαi/o class. CGNPs cells were plated in a saturating concentration of Shh (3 μg/ml) and transfected with different active mutant forms of Gα cloned into pCIG, a nuclear GFP expressing bicistronic vector. After 24 hours, cells were washed, treated for 48 additional hours with the indicated amounts of Shh, and proliferation was analyzed through H3-Thymidin incorporation. (B) Effect of different wild-type Gα proteins expression on Shh induced proliferation. CGNPs cultures treated as above, were transfected with different wild type Gα proteins and 48 h later proliferation measured by BrdU incorporation. (C) CGNPs cultures were transfected with either empty vector (pGHIN), or pGHIN expressing shRNAs directed against Gαi2 and Gαi3 (Gi2UTR2 and Gi3UTR2). The proliferation induced by different amounts of Shh was measured 48 later by H3-Thymidin incorporation.

Supplementary Fig 2. Representative images of cells transfected with Gi1UTR3, Gi2UTR2 or Gi3UTR3. Representative photos of cells transfected with the most efficient shRNA constructs for Gαi1, Gαi2 or Gαi3. The shRNA expressing constructs were electroporated into freshly isolated CGNPs, grown in a saturating concentration of Shh (3 μg/ml) for 48h and the proliferation measured by BrDu incorporation.

Supplementary Fig 3. Representative photos of rescue of proliferation in cells transfected with Gi2UTR2/Gi3UTR3. Freshly isolated CGNPs were electroporated with vectors containing Gαi2UTR2/Gαi3UTR2 and constructs expressing the active forms of the different Gαi class members. Cells were cultured in a saturating concentration of Shh (3 μg/ml) for 48h and proliferation measured by BrdU incorporation..

Supplementary Fig 4. (A) Association between Smo and Gαis was studied through co-immunoprecipitation assay as previously described (38). Fresh isolated CGNPs were electroporated with pCIG vectors expressing either SmoM2-HA and/or different Gαis-FLAG. Cells were cultured with Shh for 48h, lysated in a non denaturing buffer and immunoprecipitated with anti-HA or anti-FLAG antibodies. Western blots developed with these same antibodies failed to show an association between Smo and Gαi. (B) Ciliar location of Gαi3 was not affected by Shh deprivation. CGNPs were transfected with Gαi3QL-FLAG, grown for 48 and Shh starved or not 4h prior fixation. Cilium position and Gαi3QL-FLAG were revealed with anti-ACIII (adenylate cyclase III) and anti-FLAG respectively (white arrows). (C) Ciliar location of Gαi3QL-FLAG was not affected by SmoM2 co-expression. Freshly isolated CGNPs were electroporated with Gαi2QL-FLAG or Gαi3QL-FLAG and a 5x excess of either empty vector or SmoM2. Percentage of transfected cells showing either ciliar or non ciliar Gαi2QL-FLAG or Gαi3QL-FLAG were counted in each case. (D) Smo location at the cilium is not affected by Gαi2/Gαi3 depletion. CGNPs were electroporated with SmoM2-HA and a 5X excess of either empty vector (pGHIN), or pGHIN expressing shRNAs directed against Gαi2 and Gαi3 (Gi2UTR2 and Gi3UTR2). SmoM2 and cilium were developed by anti-HA and anti-Acetylated Tubulin staining respectively.

Supplementary Fig 5. Gαi1 accumulates in the trans-golgi network. CGNPs were transfected with FLAG-Gαi1 and then double-stained with anti-FLAG and anti-ACIII (adenylate cyclase III) or anti-C-PKA (PKA catalytic sub-unit) or anti-TGN38 (a trans-golgi marker). We had previously shown that C-PKA in CGNPs locates at the cilium base surrounding the centrioles. We now observe that Gαi1 distributes around the area positive for C-PKA, coincident with the vesicles of the trans-golgi network.

Downloaded from www.jbc.org at Biblioteca de la Universitat de Barcelona, on May 14, 2011

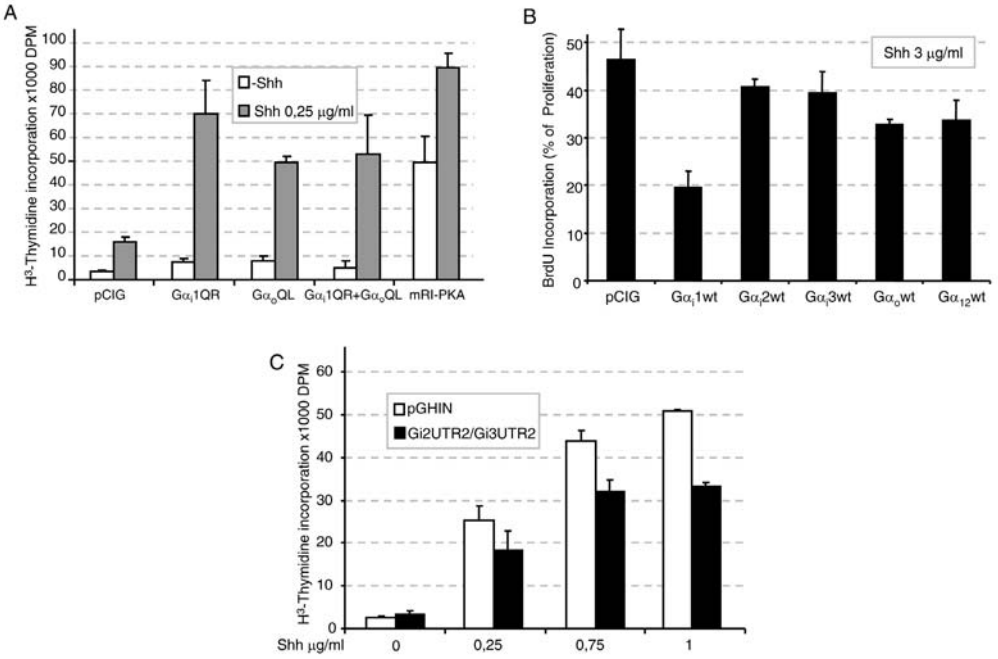
Supplementary Table 1

RNAi NAME	TARGETED SEQUENCE	GENE
Gαi1 UTR1	5'aaggacctttcgagaaggc 3'	Gnai1
Gαi1 UTR2	5'aagatggtcctggagtgtg 3'	Gnai1
Gαi1 UTR3	5'aatgtcaacccccttaccc 3'	Gnai1
Gαi1 UTR4	5'aacccccttaccctgattc 3'	Gnai1
Gαi1 CS	5'aaggcggccgtggagcgca 3'	Gnai1
Gαi2 UTR1	5 aagccctgggcccaggctc 3'	Gnai2
Gαi2 UTR2	5 aaccgccgctgcctgctga 3'	Gnai2
Gαi2 UTR3	5'aatctaggaaccgccgctg 3'	Gnai2
Gαi2 UTR4	5'aagcccacctgctcattct 3'	Gnai2
Gαi2 CS	5'aagatcacacagagccccc 3'	Gnai2
Gαi3 UTR1	5'aagtcgaggtgctgcattc 3'	Gnai3
Gαi3 UTR2	5'aactgctcttgggtacagac 3'	Gnai3
Gαi3 UTR3	5'aagcagtgacttgctgctac 3'	Gnai3
GαO UTR1	5'aagcccctgtctaacctac 3'	GnaO
GαO UTR2	5'aacctacgaccccagagtg 3'	GnaO

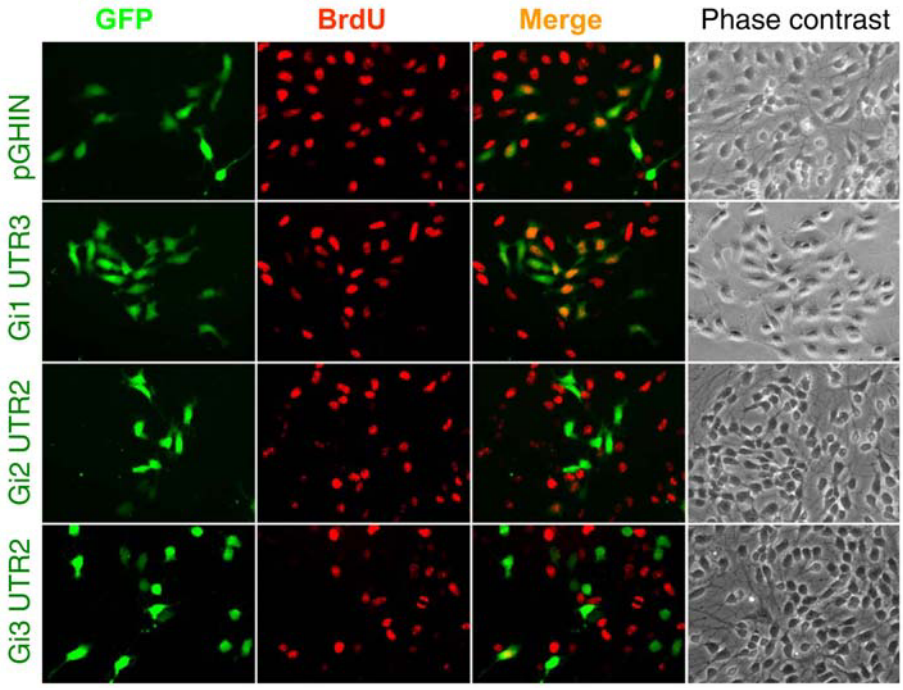
Example showing the primer set used to clone Gai1 UTR1 into HindIII/BglII sites of pSHIN.

HindIII	Targeted sequence	Loop	R.C. of targeted sequence	BglII
5'GATCCCC	AAGGACCTTTCGAGAAGGC	TTCAAGAGA	GCCTTCTCGAAAGGTCCTT	TTTTTGGAAA 3'
3'GGG	TTCCTGGAAAGCTCTTCCG	AAGTTCTCT	CGGAAGAGCTTTCCAGGAA	AAAAACCTTTTCGA 5'

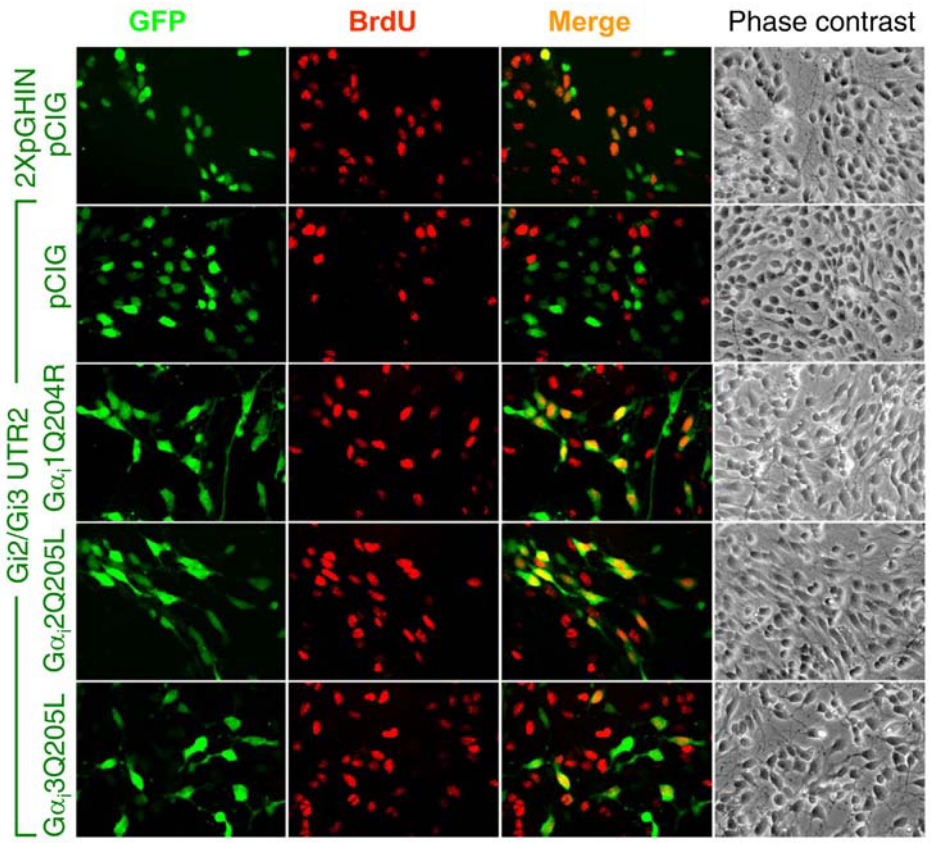
Supplementary Fig. 1



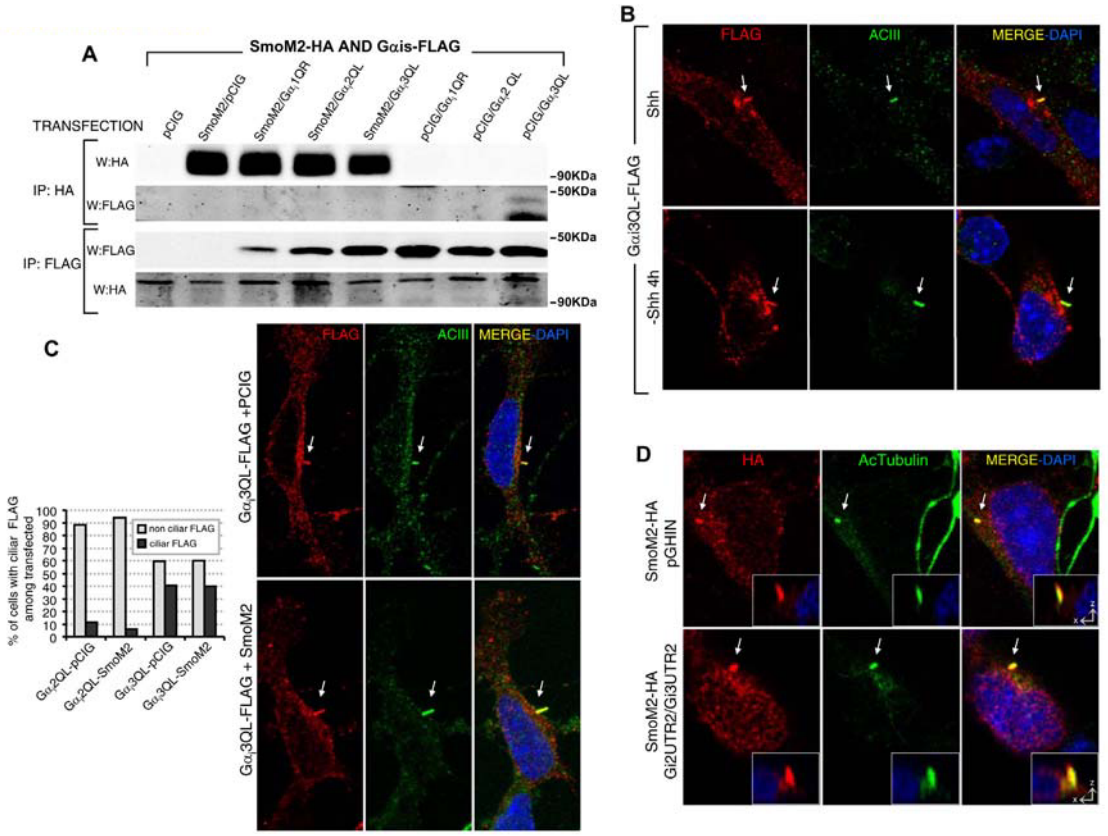
Supplementary Fig. 2



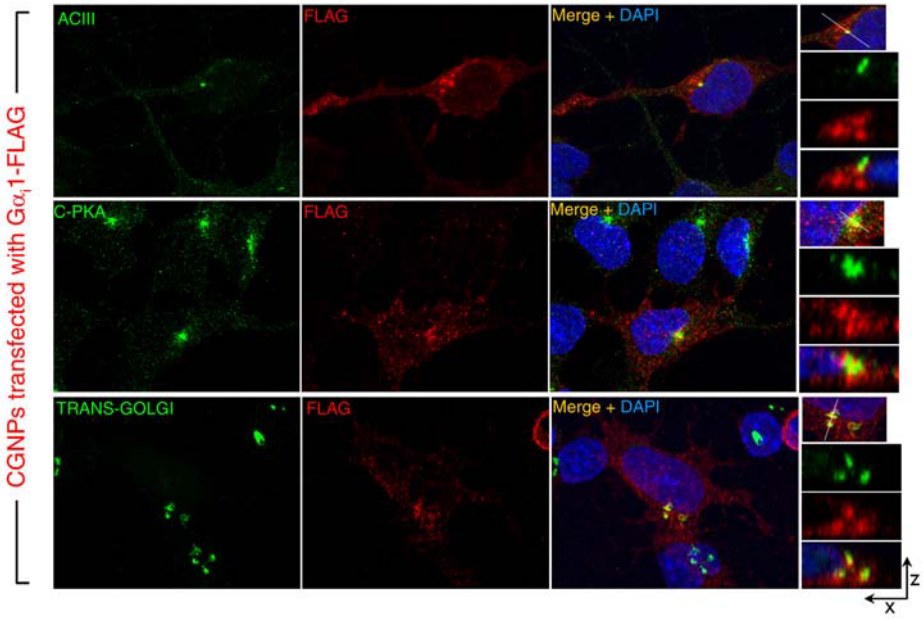
Supplementary Fig. 3

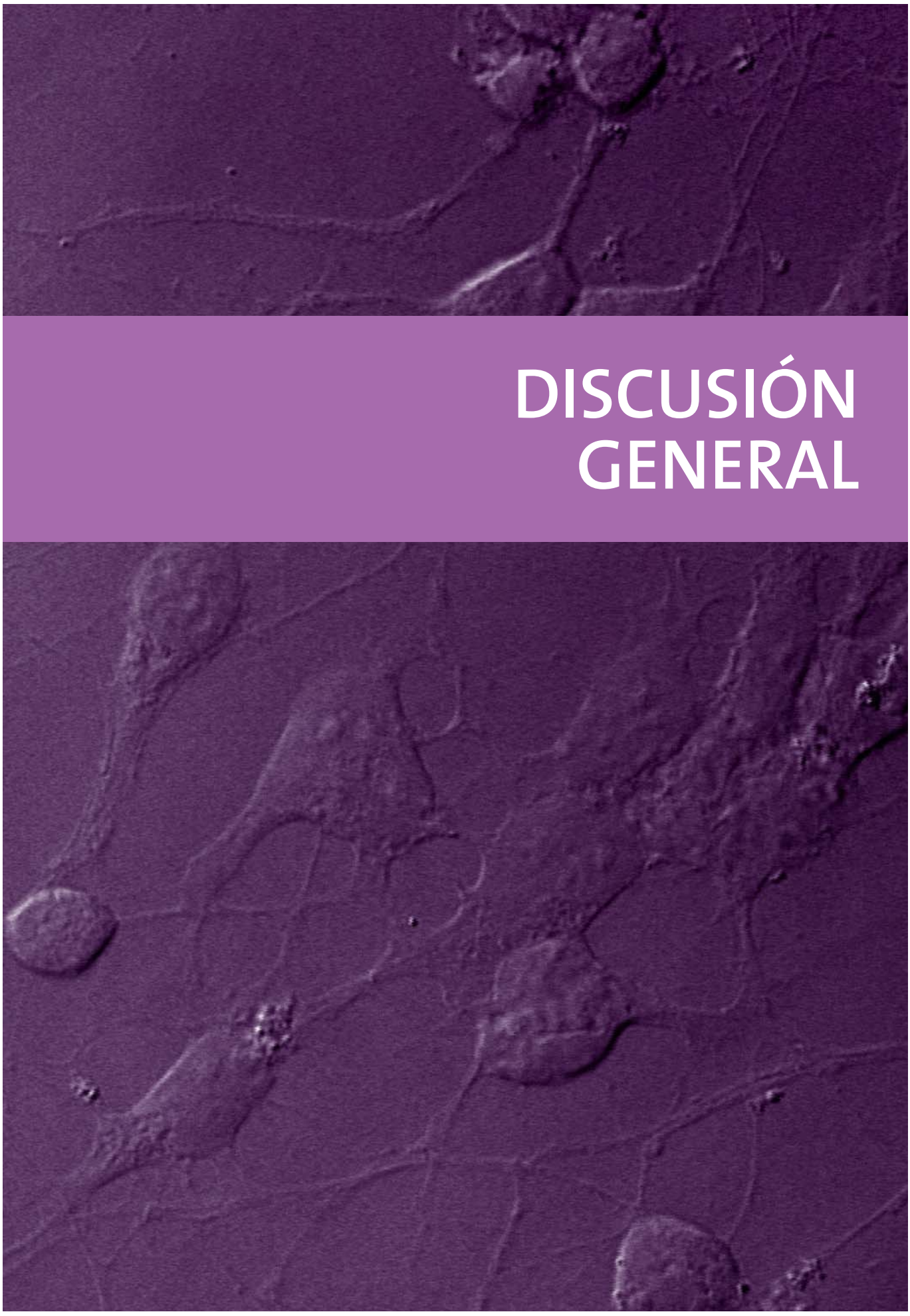


Supplementary Fig. 4



Supplementary Fig. 5





DISCUSIÓN GENERAL

Señalización de Smoothened a través de proteínas Gα inhibitorias

Desde el descubrimiento de Smo y la descripción de su estructura se predijo que pertenecía a la familia de GPCR. Sin embargo, los resultados que demuestran que las proteínas G son las efectoras de su señalización hasta el momento han sido dispares en los vertebrados (Alcedo et al., 1996; Van den Heuvel et al., 1996). Como he mencionado en la introducción, la primera evidencia que indicó una posible implicación de las Gαis en la transducción de la señal de Smo resultó del análisis del fenotipo causado por la toxina pertúsica (PTX) en el pez zebra, que era similar al producido por la inhibición de la vía de Hh (Hammerschmidt et al., 1998). Posteriormente, en melanóforos de rana se demostró la capacidad de Smo de inducir la agregación de melatonina, mecanismo conocido por ser mediado por Gαis y que pudo ser bloqueado mediante PTX (DeCamp et al., 2000). La activación directa de Gαis por parte de Smo se demostró mediante ensayos de carga de P^{32}-γ-GTP en células de mariposa Sf9. En este estudio se determinó también que la PTX podía inhibir a la actividad de una luciferasa dependiente de Gli en la línea celular NIH3T3, estimulada tanto por Shh como por la transfección de SmoM2 (una molécula de Smo con una mutación que resulta oncogénica). La deleción de la porción carboxi-terminal intracelular de Smo impidió que la molécula activase a una luciferasa dependiente de Gli sin evitar que cargase el GTP en las Gαis. A partir de este resultado, los autores propusieron que Smo transduce la señal por dos mecanismos independientes: uno asociado a Gαis y otro (desconocido) a través de su fragmento carboxi-terminal (Riobo et al., 2006b). Mediante el uso de PTX otro grupo llegó a una conclusión similar ya que consiguió inhibir parcialmente la activación del reportero de Gli mediada por SmoM2 en estas mismas células. En MEFs mutantes para Patched-1 (*Ptch1-/-*), la toxina también logró reprimir la transcripción de los genes diana inducida por la activación ectópica de Hh. No obstante, tanto con la PTX como con la transfección de una subunidad GαiQ205L (constitutivamente activa) obtuvieron un leve efecto en el procesamiento de Gli3 o en el patterning del tubo de pollo en desarrollo mediado por Hh (Low et al., 2008). En *Drosophila melanogaster*, en cambio, aunque en un primer estudio (mediante el silenciamiento de las diferentes subunidades de proteínas G) se rechazó la implicación de la Gαi en la vía de Hh, recientemente se demostró que Smo funciona como un GPCR que requiere de Gαis para regular muchos de los eventos del desarrollo en los que Hh participa. La implicación directa de las proteínas Gαis en procesos fisiológicos mediados por Shh quedaba, por lo tanto, pendiente de ser evaluada en los vertebrados.

En el segundo estudio de la presente tesis demostramos que la proliferación de los progenitores neuronales de las células granulares de cerebelo de rata (PNGCs), aumenta significativamente con la sobreexpresión de formas activas de los miembros de la clase de Gαi/o en presencia de concentraciones bajas de Shh (y que por sí mismas no son proliferativas). Demostramos también que el silenciamiento de Gαi2 y Gαi3 (las dos subunidades de Gαis que se más expresan en la capa granular externa del cerebelo en desarrollo), reduce significativamente la proliferación de cultivos de PNGCs en presencia de Shh. Nuestro resultado concuerda, por lo tanto, con el

estudio realizado en *Drosophila melanogaster* y es el primero en implicar a las Gαis en un proceso fisiológico mediado por la actividad de Hh en células de mamíferos.

Vale la pena mencionar que los diferentes procesos asociados a la señalización mediada por Hh (como la proliferación y el patterning) pueden estar mediados por diferentes componentes moleculares de la vía de Hh y quizás por ello no se obtuvieron los efectos esperados en el tubo neural de pollo en desarrollo (Low et al., 2008). Los resultados de los estudios obtenidos con PTX mencionados deben ser interpretados con cautela, ya que hay que tener en cuenta que no todos los tipos celulares son capaces de procesar a la toxina y, en consecuencia, no en todos los casos la Gαi se ribosila de manera efectiva (Riobo et al., 2007).

Un detalle a destacar es que muchos de los resultados obtenidos en vertebrados se realizaron con anterioridad al descubrimiento de la implicación del cilio primario en la vía de Shh, o sin tener en cuenta esta estructura. El cilio primario es necesario para que Smo transmita la señal y para que active a los factores de transcripción Gli2 y Gli3, acumulados en su punta (Haycraft et al., 2005). Si al eliminar la cola intracelular de Smo se estuviera afectando su tráfico al compartimento ciliar, podría ser que se estuviera impidiendo la activación de los factores de transcripción Gli2 y Gli3 allí acumulados sin evitar, en cambio, la activación de las Gαis en otras zonas de la célula (Riobo et al., 2006b). Sería interesante, por lo tanto, determinar si la fracción carboxi-terminal de Smo es necesaria para la localización de Smo en el cilio primario.

Por otro lado, el efecto de potenciación de la proliferación que obtenemos con la sobreexpresión de Gαis constitutivamente activas sólo lo observamos en presencia de concentraciones bajas de Sh. Este resultado indica que, aunque estas moléculas son incapaces de hidrolizar el GTP, requieren ser activadas por un receptor para transducir la señal. Este hecho podría explicar también por qué en el estudio anterior realizado en el tubo neural (en el que se utilizaron las mismas moléculas mutantes) no obtuvieron resultados similares (Low et al., 2008). No obstante, el hecho de que hayamos realizado estos experimentos en presencia de Shh sigue sin descartar que, aunque a estas bajas dosis de ligando no se pueda inducir la proliferación (por una incapacidad de inhibir a PKA de manera eficiente), se estén activando otras vías que complementen a la activación de Gαis. Una candidata a mencionar es la vía de la PI3K ya que se demostró que esta quinasa se encarga de estabilizar a los factores de transcripción Gli1, Gli2 y Gli3 en presencia del Shh (Riobo et al., 2006a). La vía de la PI3K-AKT es activable por el complejo Gβγ, al que de momento no se le ha atribuido ninguno de los efectos en la vía de Hh. Debido a la alta expresión de las subunidades de la clase Gαi/o, al ser activadas por un receptor se suelen liberar altas cantidades de complejos Gβγ (Clapham et al., 1997). Podría ser que, a concentraciones bajas de Shh se estén activando parcialmente las Gαis endógenas y que se liberen, por lo tanto, ciertas cantidades de complejo Gβγ suficientes como para activar a la vía de PI3K, que estabilizaría a los factores de transcripción Gli2 y Gli3.

Especificidad de Smo por miembros de la familia Gαi/o

Como he mencionado en la introducción, el número de clases de proteínas G que median la señalización de los receptores acoplados a

proteínas G es relativamente bajo comparado con la cantidad de receptores descritos hasta el momento. Aunque muchos de los sitios de interacción entre las Gα con los receptores se empiezan a conocer, es casi imposible predecir, a partir de la estructura de un GPCR, con qué subunidad interaccionará (Oldham et al., 2008). Como suele ocurrir con la mayoría de los GPCR, éstos no suelen limitarse a interaccionar con una única tipo de subunidad, si no que pueden activar a más de un tipo dentro de la misma o dentro de diferentes clases (Haycraft et al., 2005; Wettschureck et al., 2005). Además de su estructura, uno de los factores que limitan la interacción entre un GPCR y las proteínas G es la expresión restrictiva de estas últimas en los diferentes tejidos (Haycraft et al., 2005; Malbon, 2005). El hecho de que la Gαi2 y la Gαi3 sean las que más se expresan en el cerebelo en desarrollo, junto con el efecto sinérgico que observamos en la bajada de la proliferación de PNGCs mediante el silenciamiento de ambas, indica que la señalización de Smo en estas células tiene lugar por la activación de estas dos subunidades al tiempo. No obstante, con la sobreexpresión de Gαi1 y Gαo, los dos miembros que muestran una menor o casi ausente expresión en la capa granular externa del cerebelo en desarrollo, demostramos que Smo es capaz de inducir la proliferación mediante la activación a cualquiera de los miembros de la clase Gαi/o.

Este resultado se podría explicarse por la alta cantidad de moléculas que se producen mediante la sobreexpressión y por la similitud estructural entre todos los miembros de la clase las subunidades Gαis. De hecho, los estudios con ratones mutantes que carecen de subunidades de esta clase indican que las moléculas tienen funciones solapantes. El fenotipo más grave se obtiene por la deficiencia de Gαi2, que es muy ubicua. La viabilidad de los ratones se atribuye a la redundancia en actividad por parte de las subunidades Gαi1 y Gαi3, que se expresan ampliamente en la mayoría de los tejidos (Moxham et al., 1993). Una deficiencia en Gαi1 o Gαi3 no posee ningún fenotipo obvio mientras que una eliminación de ambas causa letalidad embrionaria (Wettschureck et al., 2004).

En este trabajo demostramos que Smo no transduce la señal mediante la activación de las subunidades de la clase Gα12-13 de proteínas G, mecanismo que se había descrito anteriormente. La sobreexpresión de la molécula de Gα12 constitutivamente activa no posee ningún efecto en la proliferación de PNGCs inducida por Shh. El efecto sobre la activación de los sitios de Gli que el grupo de Kasai *et al.* observa con Gα12 en las células HEK-293 pudo reprimirse por inhibidores de Gα12 o Rho, un efector de esta subunidad (Kasai et al., 2004). Podría ser que la activación de la transcripción genética de Gli en este tipo celular esté mediada por la actividad de Rho, pero nuestros experimentos demuestran que, al menos en PNGCs, la activación de Gα12 no es esencial para el proceso de proliferación mediada por Shh. Estos resultados no descartan, en cambio, una implicación de estas subunidades en procesos mediados por Shh independientes de la transcripción (como lo son la movilidad y la morfología celular) o formas adicionales de quimioatracción (como, por ejemplo, la guía en el crecimiento del axón). Las reglas que median el proceso de crecimiento del axón suelen seguir una serie de eventos citoplasmáticos que normalmente convergen en AMPc. En las neuronas, niveles elevados de AMPc inducen la extensión del cono de crecimiento mientras que niveles bajos están asociados a la inhibición y a la retracción de los movimientos del mismo. En ratón, a partir de modelos *in vivo* e *in vitro* con

explantes de espina dorsal se demostró que el Shh producido en la notocorda es necesario para el crecimiento del axón (Charron et al., 2003). De manera similar, a bajas dosis de N-Shh purificado (0.5 µg/ml) las células ganglionares de la retina responden con un crecimiento del axón (Kolpak et al., 2005). En estas mismas células, otro grupo demostró que, a mayores concentraciones de ligando (2.5ug/ul), el N-Shh induce la retracción del cono de crecimiento y un incremento en el tamaño del árbol dendrítico (Trousse et al., 2001). Este último proceso se conoce por ser dependiente de Gα12 y por tener lugar a través de la activación de la quinasa Rho (Buhl et al., 1995). Por lo tanto, esta clase de proteínas G podría estar implicada en una serie de procesos fisiológicos distintos a la proliferación.

Regulación de la señal de AMPc mediada por Shh en el entorno del cilio primario

Ya citado en la introducción, la inhibición de la PKA tiene un potente efecto sobre la señalización de Shh. En el ratón mutante que contiene la subunidad RIα (que es insensible a la activación por AMPc) los animales presentan defectos por una ganancia de función de la vía de Shh (Epstein et al., 1996). La sobreexpresión de esta misma molécula en cultivos de PNGCs induce la proliferación de las células en ausencia de Shh. Observamos además que el DBA no puede de incrementar los niveles nucleares de P-CREB en las células transfectadas con este mutante. Estos resultados sugieren que la represión de la PKA y, por lo tanto, la inhibición de la producción de AMPc es un requisito para que la vía se active correctamente.

Dos estudios previos al nuestro demostraron que Smo podía inducir una bajada en la concentración celular de AMPc. Uno de ellos se realizó en melanóforos de rana, que en un inicio no respondieron con una bajada de AMPc por la estimulación directa con el ligando, seguramente debido a una baja expresión del receptor Ptch. Al sobreexpresar Smo, en cambio, los niveles del segundo mensajero bajaron significativamente, probablemente por la alta expresión de Gαis que poseen estas células. El segundo estudio se realizó en células ganglionares de retina y el AMPc fue detectado con un anticuerpo por inmunocitoquímica (DeCamp et al., 2000; Trousse et al., 2001). El análisis de los niveles de AMPc en PNGCs, sin embargo, demuestra que Shh no puede regular los niveles totales de la célula. Este resultado concuerda con el del estudio realizado previamente pot Murone *et al*. en células C3H10T1/2, que también responden a Shh. Los autores no lograron observar cambios en los niveles totales de AMPc en presencia de N-Shh (Murone et al., 1999).

El inicio de la señalización de la vía de Shh de vertebrados en el cilio primario y la tendencia de PKA a localizarse en zonas específicas de la célula (y de responder, por lo tanto, a cambios discretos de AMPc producidos en su entorno), nos llevó a analizar la localización subcelular de PKA y su relación con este compartimento. En el primer artículo de la presente tesis demostramos que PKA se acumula en la base del cilio primario y que su actividad está regulada por Shh ya que, en ausencia del ligando, la PKA se activa y se dispersa. Los cambios en los niveles de AMPc mediados por Shh parecen estar regulados, por lo tanto, en el entorno del cilio primario. Esta hipótesis explicaría por qué no pudimos detectar una bajada en los niveles totales de AMPc mediada por Shh (Milenkovic et al., 2010).

Si los niveles de AMPc se regulan de forma local, las ACs responsables de la producción de AMPc deberían localizarse en zonas de membrana cercanas a PKA (como el bolsillo ciliar, en la base del cilio) o en el propio orgánulo. Desde allí, el segundo mensajero podría difundir hacia la base del cilio y activar a PKA. Sería interesante determinar qué isoforma de AC está siendo inhibida por parte de Gαis cuando la vía está activa y dónde se localiza. Los resultados obtenidos sobre la localización de las Gαis más abundantes en los progenitores del cerebelo en desarrollo podrían estar dándonos una pista de dónde tiene lugar este fenómeno. La localización ciliar de la Gαi3 indica que, muy probablemente, su activación por parte de Smo (también ciliar) tenga lugar en este compartimento. Sería interesante determinar por qué esta subunidad, y no las demás, se acumula en el cilio primario y si alguna molécula participa en esta localización. Aunque nosotros no observamos que Shh regule la localización de Gαi3 en el cilio, un par de candidatos a estudiar en este último proceso son Kif7 y Kif27, los dos homólogos del gen Cos2 de *Drosophila melanogaster*. Cos2 es la molécula encargada de reclutar los componentes de la vía de Hh. Recientemente, se ha demostrado que la Gαi puede unirse a Cos2 y que, al activarse por Hh puede promover una leve bajada en los niveles de AMPc totales (Ogden et al., 2008).

Al analizar la localización de Gαi1 y Gαi2 , observamos que la Gαi1 se acumula en la base del cilio y está ausente en su porción extracelular. La Gαi2, en cambio, puede ir a cilio pero en menor proporción que la subunidad Gαi3, y esta acumulación tampoco es regulable por Shh. La sobreexpresión de Gαi1 y Gαi2 en PNGCs puede inducir la proliferación en presencia de bajas concentraciones de Shh de la misma manera que lo hace la Gαi3. Estos resultados sugieren que, dependiendo de qué subunidad se trate, Smo es capaz de activar a la familia de las Gαis no sólo en el cilio primario sino también en la base del mismo. El efecto sinérgico sobre la proliferación que poseen los silenciamientos de Gαi3 y Gαi2 al tiempo (las dos subunidades que más se expresan en el cerebelo en desarrollo) demuestra que, al menos en PNGCs, estas dos subunidades están mediando la señalización de Shh.

Como se ha descrito recientemente, en presencia de Shh hay un recambio y reciclaje constante de Smo en el cilio, que es donde se activa (Milenkovic et al., 2009). Una posibilidad es que, una vez en el cilio, el Smo activo transduzca la señal a través de la Gαi3 y que, en su regreso a la base, active a la Gαi2 allí localizada. Para demostrar dónde tiene lugar la activación de cada subunidad tendrían que poder diferenciarse las formas activas de las formas no activas de Gαi (unidas a GTP y GDP, repectivamente). Para ello, se podría utilizar el anticuerpo comercial que detecta a las formas endógenas activas de proteínas G (NewEast Biosciences). No obstante, hasta el momento no se ha publicado ningún artículo en el que éste se ultilice.

Sea cuál sea el lugar concreto de activación de las Gαis por parte de Smo, la finalidad de estas moléculas es la de mantener inhibida a la PKA acumulada en la base del cilio. Para realizar esta función, deben sostenerse bajos los niveles de AMPc en esta zona. Las Gαis, están mediando, por lo tanto, la inhibición de una o de varias ACs. Las candidatas de esta familia más atractivas a estudiar son la ACIV, ACVI, ACVIII y la ACIII. Las tres primeras se encuentran presentes en los cilios primarios de las células del conducto biliar y están reguladas por estímulos químicos como el ADP y ATP (a través de receptores purinérgicos). De éstas, la más atractiva a ser estudiada es la ACIII, ya que observamos que

se acumula en los cilios primarios de PNCGs. Esta isoforma se acumula también en el cilio primario de las células del hipocampo (en cuyo desarrollo también está implicada la vía de Shh) (Berbari et al., 2007; Bishop et al., 2007; Han et al., 2008; Masyuk et al., 2008).

Sin embargo, de todas estas isoformas detectadas en cilios primarios, la única a que responde a la inhibición por las subunidades Gαis es la ACIV. Recientemente se ha demostrado que, al igual que las isoformas de ACI y ACVIII, la ACIII puede ser inhibidas por el complejo Gβγ de proteínas G. Las ACII, ACIV y ACVII resultan, en cambio, activadas por este dímero y por la subunidad Gαs (Diel et al., 2006; Linder, 2006). El estudio de la implicación del dímero Gβγ en la vía de Shh resulta cada vez más interesante de analizar. En los últimos años se ha demostrado que estas subunidades juegan importantes papeles en el desarrollo de *C.elegans* y de *Drosophila melanogaster* como, por ejemplo, la división asimétrica. En neuroblastos de mosca, la inhibición de Gγ, Gβ o Gα, impide la orientación del huso mitótico y la separación del centrosoma (Gotta et al., 2001; Izumi et al., 2004).

Como he mencionado anteriormente, la activación de la clase Gαi/o hace que se liberen altas cantidades de complejos Gβγ ya que esta clase de proteínas G se encuentra ampliamente expresadas (Clapham et al., 1997). Teniendo en cuenta que la expresión en la CGE del cerebelo de estas subunidades es bastante alta, sería poco probable que la ACIV y la ACVII sean las isoformas implicadas en la señalización de Shh, ya que, ni responden a una inhibición por Gαis ni por la del complejo Gβγ (Linder, 2006). Las isoformas ACI, ACV y ACVI, en cambio, son más ambiguas ya que están sujetas a un control mediado por diferentes vías: pueden ser reguladas tanto por el complejo Gβγ como por las subunidades de las clases Gαs y/o Gαis de proteínas G.

No podemos descartar, por otro lado, que las ACs acumuladas en el cilio primario estén implicadas en otras funciones ciliares independientes de PKA. La acumulación de ACIII en PNGCs podría estar jugando también algún papel en la remodelación cilio ya que se ha demostrado que su inhibición induce la elonganción del axonema ciliar (Ou et al., 2009).

Otro dato interesante a destacar es que la PKA es capaz de crear un loop de regulación negativa inhibiendo a las ACV y ACVI. (Chen et al., 1997; Iwami et al., 1995). La ACVI no se acumula en cilio pero podría estar haciéndolo en su base, próxima a PKA (Masyuk et al., 2008). Al ser proteínas de membrana sería más acertado predecir su localización en el collar ciliar, el entramado formado por fibras y membrana.

La señalización mediada por Shh a través de Gαis (y de sus correspondientes complejos Gβγ liberados) podría dar lugar o bien a la represión de una única isoforma de AC, o bien a la inhibición de varias isoformas de esta familia, que podrían situarse tanto en el cilio y comoen la base del mismo. Si esto último se diera, el conjunto de estas inhibiciones convergería en el control de los niveles de AMPc en donde se localiza la PKA: la base del cilio. Pero el control local de la producción de AMPc por parte de Shh podría darse por la inhibición de una única isoforma de AC. En el caso de que ésta se localizara en el cilio primario, debería estar sometida a un constante movimiento de entrada y salida del compartimento ciliar para poder ser interaccionar, en su retorno a la base, con las Gαi allí localizadas. Ésta sería la única manera de explicar nuestro resultado con Gαi1, y en menor grado de Gαi2. La otra opción es que esta única AC se localizase en la base del cilio. En este caso

debería ser la Gαi3 (activada en el cilio) la que esté sometida a un constante movimiento hacia la base para reprimirla. Si es que existe un tráfico de Gαi3, nosotros demostramos que éste no es dependiente de Shh, ya que no observamos una cambio en la localización de Gαi3 ni en ausencia de ligando ni en presencia de SmoM2.

Implicación de las AKAPs en la localización de PKA en la base del cilio primario

La presencia de la subunidad RII de PKA en la región del centrosoma durante la mitosis se había fue descrita previamente. Durante la interfase del ciclo celular, en cambio, la PKA fue observada por otro grupo en el aparato de Golgi (De Camilli et al., 1986; Nigg et al., 1985). Durante la fase G1 (interfase) el cilio primario emerge a partir del centriolo madre. La combinación de técnicas de microscopía electrónica y de tinciones de la subunidad RII permitió determinar la localización más precisa de PKA. Así, se observó que PKA se localiza en los centrosomas de células del epitelio ependimal en mitosis y en la base del flagelo de las mismas en células en fase Go. En estas últimas, los autores también asumieron que se situaba en el aparato de Golgi. Propusieron que la PKA se acumulaba en los centros organizadores de microtúbulos, pero en ningún moemento lo relacionaron con el ya conocido proceso de formación del cilio primario descrito por Sorokin a partir de una vesícula de Golgi (De Camilli et al., 1986; Sorokin, 1968a).

Algunos ensayos realizados *in vitro* en cilios y flagelos móviles demostraron, de manera indirecta mediante la estimulación de PKA con análogos de AMPc, la presencia de actividad de PKA en el axonema. Sin embargo, en ninguno de estos estudios demuestra una localización de C-PKA en estas estructras (Hasegawa et al., 1987; Howard et al., 1994; San Agustin et al., 1994). Se ha descrito que la PKA está implicada en el movimiento de batida de cilios móviles y de flagelos por regulación de la actividad de las dineínas motoras. No se se puede descartar, por lo tanto, la posibilidad de que esta enzima se acumule en el axonema de cilios y flagelos móviles presentes en algunos tipos celulares. Un único estudio (realizado en células del conducto biliar) muestra que las subunidades de PKA RIIα la RIβ se localizan con el cilio primario. Las imágenes de estas inmunocitoquímicas (a diferencia de las que muestran sobre la localización de ACs) no son muy claras. Los autores no realizan una reconstrucción en "z" de las series confocales para determinar si es en la base o la porción extracelular donde se localiza la PKA. Como ocurre en nuestro caso, en algunas fotos los cilios se ven orientados hacia fuera y en otros plegados hacia el interior de la célula, encima de la base del cilio (Masyuk et al., 2008).

En el primer trabajo de la presente tesis observamos que la subunidad catalítica de PKA (C-PKA) se localiza debajo del cilio primario y no en su porción extracelular. Denominamos a esta zona "base del cilio primario", ya que la C-PKA no colocaliza con el centriolo madre o cuerpo basal del mismo, del cual hay que diferenciarla. Observamos que este pool de C-PKA se encuentra rodeado de vesículas Cys y Trans de Golgi pero que, a diferencia de los estudios mencionados anteriormente, no colocaliza con estas estructuras. Observamos que la acumulación de C-PKA en células que se encuentran en otras fases del ciclo (como anafase o telofase) es muy baja.

Determinamos que la responsable de la localización de C-PKA en la base del cilio es la subunidad RII y no RI de PKA, que se encuentra dispersa por en el citoplasma.

La localización específica de PKA en diferentes compartimentos por su unión a AKAPs es uno de los fenómenos más estudiados de la señalización de esta enzima. La deleción que impide que la subunidad RII dimerize y se ancle a las AKAPs (RIIΔ1-50) muestra una localización citoplasmática de la subunidad reguladora, resultado que demuestra que la acumulación de PKA se realiza por interacción de las subunidades RII a AKAPs. Observamos también que tanto esta mutación como el Ht31 (que provoca la disrupción de la unión entre subunidades R y AKAPS) tienen un potente efecto en la disminución de la proliferación. Este péptido, aunque posee mayor afinidad por RII, puede también inhibir la interacción entre AKAPs y RI. Existen otros péptidos de nueva generación que permitirían estudiar más específicamente la unión de las AKAPs con la RII (como el AKAP-IS, SuperAKAP-IS) y otros que inhiben únicamente la unión de AKAPs a RI (como RIAD)(Gold et al., 2006). Sería interesante comparar los diferentes inhibidores para determinar si la disrupción de la unión de RI a una AKAP tiene algún otro efecto en la vía de Shh.

En cuanto a qué compartimento se está uniendo la PKA en las PNGCs, nosotros observamos que, en células quiescentes, la PKA se encuentra muy próxima al centrosoma pero sin colocalizar con él. La asociación de la RII con AKAPs centrosomales se había determinado previamente tanto en células quiescentes como en mitóticas (Keryer et al., 1993; Schmidt et al., 1999). Ciertas variantes de splicing de AKAP450/350 tienen regiones con capacidad para unirse a los centriolos. Algunas de éstas se localizaron también en el Aparato de Golgi y, en su fracción C-terminal, se identificaron sitios de unión para esta estructura. Se determinó que, dependiendo del tipo celular en el que se expresen, estas AKAPs tienen capacidad para dirigirse a un compartimento o a otro (Gillingham et al., 2000; McConnachie et al., 2006; Shanks et al., 2002). Por su estrecha proximidad con los centriolos y el aparato de Golgi, esta AKAP es una de las AKAPs más interesantes a estudiar a la hora de evaluar qué miembro de esta familia está implicado en la localización de PKA en la base del cilio primario.

Las AKAPs tienen capacidad de formar complejos multi-proteicos mediante la interacción con otros componentes implicados de la vía de señalización del AMPc. Ésta es una estrategia utilizada por la célula para optimizar la respuesta a cambios discretos de este segundo mensajero y que le permite regular de una manera muy estricta la actividad de PKA.

Existen dos AKAPs capaces de asociarse con la membrana y de interaccionar con GPCR: Gravin (también conocida como AKAP250 o AKAP12) y la AKAP79/150 (AKAP150 es el ortólogo de la AKAP79 humana, también conocida como AKAP5) (Wang et al., 2006b). Gravin destaca por funcionar como proteína scaffold de más de doce proteínas entre las que se incluyen PKA, PKC, Src y PP2B. Puede unir también, de manera reversible, al receptor GPCR β2-adrenérgico y a β-arrestina. Esta última está implicada en internalización de varios GPCR y, en el caso de Smo, en su localización en la membrana del cilio primario a través de la unión a Kif3A (Chen et al., 2004; Kovacs et al., 2008). Se han identificado otras regiones de Gravin que le confieren la capacidad de unirse a microtúbulos del

citoesqueleto, así que también podría estar interacciondo con proteínas del axonema ciliar (Malbon et al., 2004).

Recientemente se ha demostrado que algunas AKAPs pueden unir también a ACs en el complejo multiproteico. La AKAP150 de cerebro de ratón se une a ACV y ACVI (Bauman et al., 2006). Esta AKAP se ha localizado recientemente en el cilio primario y se le atribuye la acumulación de ACV en el mismo (Masyuk et al., 2008). Yotiao (la variante de splicing de menor peso molecular de la famila de la AKAP79) es una AKAP asociada a membrana que se encuentra en las densidades post-sinápticas de cerebro, del corazón y de la unión neuromuscular. Puede unir a PDE4D3, a una subunidad del receptor NMDA y al canal de K+ responsable del potencial de acción en el corazón y se asocia también a las isoformas de ACI, ACII, ACIII y ACIX . Posee la capacidad de regular los niveles de AMPc mediante la inhibición de las ACII y III, por un mecanismo aún desconocido (Piggott et al., 2008). mAKAPβ (la variante de splicing cardíaca de la AKAP de músculo) integra la señalización de cAMP con la del calcio y la de las MAP quinasas. Se asocia a la membrana nuclear y puede unir a ACII y ACV e inhibir también a la primera (localizada en la membrana plasmática) cuando estas dos membranas se encuentran en estrecha proximidad (Boivin et al., 2008).

La identificación de la AKAP encargada de reclutar a PKA en la base del cilio primario daría luz a la localización de muchos otros componentes no sólo de la vía de PKA, sino también de otras vías de señalización con las que Shh podría estar interaccionando.

Papel dual de la PKA en la señalización de Hh

Es difícil hablar de la vía de señalización de Hh de mamíferos sin mencionar la de *Drosophila melanogaster*, ya que fue en esta especie donde se desvelaron muchos de los eventos descritos para la vía de Hh. Desde un principio se observaron muchas diferencias entre la ruta de vertebrados e invertebrados pero durante mucho tiempo se consideró que los principales mecanismos de la vía de Hh se encontraban conservados evolutivamente. El reciente descubrimiento del cilio primario en la vía de Shh hizo que se replanteara el modelo de señalización de la vía de Shh de vertebrados. Muchas de estas diferencias interespecíficas observadas en la vía podrían estar señalando los posibles caminos que dieron lugar a la divergencia de especies a lo largo de la evolución.

El movimiento o "recolocalización" de los receptores en presencia de ligando es una tendencia común en los GPCR. El movimiento a la membrana de Smo es necesario para que éste se active y parece estar conservado en todas las especies. Tanto en vertebrados como en *Drosophila*, la β-Arrestina juega un papel esencial para que Smo se transloque a la membrana correctamente (Chen et al., 2004; Cheng et al., 2010). En el caso de los vertebrados, es la translocación de Smo a la membrana ciliar (a través de su unión a Kif3A) la que está regulada (Kovacs et al., 2008). Aunque los invertebrados carecen de cilio primario en la mayoría de sus células, la estabilización de Smo en la membrana celular de *Drosophila melanogaster* recae sobre el citoesqueleto y las redes de tubulina (Zhu et al., 2003). En esta especie, la proteína que se encarga de secuestrar a otros miembros de la

ruta de señalización hacia la membrana (como Fu y Ci) y de promover su fosforilación es Cos2. Esta proteína está relacionada con la familia de las quinesinas y tiene capacidad para unirse a los microtúbulos y de moverse a lo largo de éstos (Farzan et al., 2008; Robbins et al., 1997). Curiosamente, la cola C-terminal de Smo de mamíferos difiere bastante de la de *Drosophila melanogaster* en cuanto a longitud y secuencia se refiere y carece de la zona de unión a Cos2. Esto sugiere que, aunque el movimiento a través de los microtúbulos se encuentra conservado, los vertebrados han adoptado un mecanismo más complejo en el que el papel de Cos2 fue asumido por muchas otras proteínas (Varjosalo et al., 2006).

En lo que respecta al papel de la PKA, existen grandes similitudes pero también cierta discrepancia. Tanto en vertebrados como en *Drosophila*, la inhibición de la PKA tiene un potente efecto en el incremento de señalización de Shh (como ocurre con la subunidad mRIα insensible a AMPc que produce una ganancia de función de Hh) (Collier et al., 2004; Epstein et al., 1996). La inhibición de la PKA, por lo tanto, parece ser un requisito para que la vía se active correctamente. En varias especies se ha demostrado que PKA es un potente regulador negativo de la vía de Hh. Tanto en *Drosophila melanogaster* como en vertebrados, la activación de PKA induce la fosforilación de los factores de transcripción Ci y Gli2/3 (respectivamente). Ésta inicia una cascada de fosforilaciones que promueven su procesamiento por el proteasoma dando lugar a sus formas represoras (que inhiben la transcripción genética) (Chen et al., 1998; Chen et al., 1999; Price et al., 1999; Tempe et al., 2006; Wang et al., 2006a; Wang et al., 1999).

Tanto en vertebrados como en *Drosophila melanogaster* se ha demostrado que Smo homodimeriza por su porción amino-terminal y que esta interacción es necesaria para que se las moléculas activen (Zhang et al., 2004). En ambas especies, las GRKs juegan un papel esencial en la en la correcta activación de la vía mediante la fosforilación de Smo (Chen et al., 2004; Cheng et al., 2010; Meloni et al., 2006; Molnar et al., 2007; Philipp et al., 2008). No obstante, tanto en *Drosophila* como en vertebrados, quedan aún por identificar los sitios de fosforilación por GRKs y por demostrar una directa transferencia del fosfato por parte de esta quinasa. Cabe destacar que en *Drosophila melanogaster* pero no en vertebrados, la PKA actúa como un modulador positivo de la vía a de Hh mediante la fosforilación de la cola carboxilo terminal de Smo, que promueve su activación y su unión a otros miembros de la ruta (Apionishev et al., 2005; Jia et al., 2004; Zhang et al., 2004). El Smo de vertebrados también carece de los sitios de fosforilación por PKA (Varjosalo et al., 2006). Este hecho creó desde un inicio la sospecha de que PKA tuviera efectos similares en el contexto de los vertebrados. Adjacentes a los sitios de fosforilación por PKA y CKI se encuentran varios dominios de arginina (Arg) cargados positivamente. A diferencia de los sitios para PKA, estos clusters de Arg se encuentran conservados. Tanto en vertebrados como en *Drosophila* se ha demostrado que regulan negativamente la activación del receptor (Zhang et al., 2004). Si se reemplazan con aminoácidos neutros, la molécula adquiere una actividad ectópica y, en el caso del Smo de *Drosophila*, éste puede translocarse a la membrana. Los ensayos de FRET realizados con moléculas de Smo marcadas intra e intercelularmente con CFP e YFP demuestran que, en ausencia de Hh, la cola de Smo se encuentra plegada hacia el tercer loop intracelular. La presencia de Hh neutraliza la carga de los clusters

promoviendo la fosforilación por PKA de aminoácidos próximos. De esta manera, la cola se despliega y entra en contacto con la cola de la pareja con la que homodimeriza. Si se mutan los sitios de fosforilación por PKA, esto no puede ocurrir (Zhang et al., 2004). El mecanismo de despliegue de la cila carboxi-terminal se comprobó también para el Smo de mamíferos. En este caso, la fosforilación debe estar mediada por otra quinasa (aún por identificar) ya que, como he mencionado anteriormente, los sitios de fosforilación de PKA no se encuentran en los vertebrados.

En los vertebrados, la presencia de Smo en cilio es necesaria para su activación. La forma activa de Smo (SmoM2) se localiza en cilio primario en ausencia de Shh mientras que una mutación del sitio de localización ciliar impide que éste se acumule (Corbit et al., 2005). Además de su presencia en el cilio, la exacta localización de Smo en el compartimento parece ser importante para su activación. Se ha visto que Smo está activo o no según la porción del cilio donde se localice. Se ha demostrado que en las zonas más proximales tiene menor actividad que en las zonas distales (Aanstad et al., 2009; Wilson et al., 2009). En presencia de ciclopamina (un inhibidor específico de Smo) el Smo se acumula en cilio pero no está activo (Rohatgi et al., 2009; Wang et al., 2009). Dos modelos proponen que Smo sufre una serie de cambios conformacionales durante el proceso de activación que va desde su estado inactivo (fuera del cilio) a su estado activo (en el cilio) pasando por un estado intermedio de estado ciliar inactivo (Rohatgi et al., 2009; Wilson et al., 2009).
Aunque los sitios de fosforilación por PKA no se encuentran presentes en el Smo de vertebrados, recientemente se ha observado que tanto la activación de las subunidades Gαs de proteína G con CTX o de las ACs con FSK, así como la expresión de subunidades de PKA activas promueven la localización de Smo en la parte más proximal del cilio. Aunque esto ocurra, la molécula no es capaz de inducir la actividad de los factores de transcripción Glis (Milenkovic et al., 2009; Wen et al., 2010; Wilson et al., 2010). Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición de PKA con inhibidores específicos de PKA impide la transcripción genética mediada por Shh (Milenkovic et al., 2009).
Podría ser que el papel positivo de PKA sobre la fosforilación de Smo que se observa en *Drosophila melanogaster* haya evolucionado, en vertebrados, hacia un mecanismo más complejo. La PKA se encuentra en estrecha proximidad con el Aparato de Golgi y su actividad es necesaria para el transporte de vesículas hacia la membrana. La inhibición de PKA con inhibidores químicos (como el H89 o el péptido inhibidor de PKA) impide la exocitosis celular. La activación de la vía con FSK, por el contrario, induce la secreción celular (Muniz et al., 1996; Muniz et al., 1997). La activación de PKA mediante CTX o FSK, por lo tanto, prodría estar promoviendo el tráfico de vesículas de secreción que contengan a Smo desde hacia la membrana plasmática. El exceso de Smo en la membrana podría estar induciendo su transporte al cilio, donde Ptch se localiza y puede inhibirlo.

Otra evidencia a favor de un rol positivo de PKA en la vía de Shh de vertebrados surge del estudio de las moléculas activas e inactivas de PKA en el desarrollo de los miembros de pollo. La sobreexpresión de ambas moléculas resultan en el mismo efecto: la formación de un dígito extra (que normalmente se produce por una activación excesiva de la vía) (Tiecke et al., 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que los factores de transcripción Gli2 y Gli3 requieren localizarse en la punta del cilio para activarse, donde se separarán de SuFu (Tukachinsky et al., 2010). La activación de PKA mediante FSK impide que los complejos formados por Gli y Sufu vayan al cilio e induce el procesamiento de los factores de transcripción por el proteasoma (Tukachinsky et al., 2010). No obstante, recientemente se ha demostrado que para que se liberen los Glis en la punta del cilio es necesaria la fosforilación de Sufu por PKA, GSK3β y CKI. Estos resultados también indican que se requiere cierta actividad "basal" de PKA para que la vía de Shh se transduzca correctamente.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de un papel dual de PKA en la vía de Shh. El anticuerpo anti C-PKA-P que utilizamos en el primer trabajo detecta la autofosforilación de PKA en la Thr197, necesaria para la activación de la enzima. En presencia de N-Shh, la actividad de PKA que observamos en la base del cilio con este anticuerpo no es nula, si no que la enzima posee cierta actividad basal, que aumenta en ausencia del ligando. Los efectos que poseen tanto la subunidad RIIΔ1-5 (que no posee capacidad de unirse a AKAPs) como el péptido Ht31 en la disminución de la proliferación confirman la necesidad de cierta actividad de PKA en la base del cilio para que la vía se active correctamente.

Uno de los resultados que desconcierta en cuanto a esta hipótesis es el que concierne a la molécula mRIα-PKA, que actúa como dominante negativo de la quinasa. El mRIα-PKA no permite que PKA se active y que fosforile a sus sutratos (aún en presencia del análogo de AMPc DBA) y es capaz de inducir la proliferación de PNGCs en ausencia de Shh. Sin embargo, se ha demostrado que esta misma molécula no puede promover la activación de los Glis en células que carecen del ITF anterógrado o del retrógrado (Ocbina et al., 2008). Una posible explicación al efecto observado con el dominante negativo de PKA es que, aunque este mutante retenga a gran parte de las subunidades catalíticas, no impida que la C-PKA se una a la subunidad endógena de RII, localizada en la base del cilio. Sería interesante determinar la localización de C-PKA en las células que sobreexpresan el dominante negativo de PKA y si éste es capaz de desplazar por completo la C-PKA de la base del cilio. Se ha demostrado que la formación de la holoenzima de PKA in vivo favorece preferentemente la formación del tipo II, aunque el tipo I sea el más sensible a cAMP y sea el principal subtipo que media la señalización de PKA. En células que sólo tienen la holoenzima tipo II, únicamente cuando los niveles de subunidad C exceden (ya sea por sobreexpresión de las mismas o por eliminación de las subunidades RII) se forma la holoenzima tipo I. Existe, por lo tanto, una compensación por parte de la subunidad RIα cuando los niveles de subunidades Cα o Cβ son elevados. Los ratones mutantes para RIIα y RIIβ son viables, fértiles y no poseen ningún un fenotipo aparente o éste es muy leve, probablemente por esta compensación por parte de la subunidad RIα en ausencia de RII (Amieux et al., 2002). La sobreexpresión de la subunidad RIIα, en cambio, elimina casi por completo la formación de la holoenzima tipo I (Amieux et al., 2002; Bossis et al., 2004). Este hecho confirma que el efecto positivo que posee la PKA en la vía de Shh tiene lugar a través del holoenzima RII, ya que su sobreexpresión no afecta a la proliferación de PNCGs. Una manera de demostrar su implicación en la vía de Shh sería mediante la creación de mutantes condicionales para PNGCs en los que se eliminen ambas moléculas al tiempo.

Gli2/3 y el cilio primario

Los factores de transcripción Gli2 y Gli3 dependen del IFT retrógrado para activarse y para transducir la señal (Huangfu et al., 2005; Tran et al., 2008). Se ha demostrado que estas moléculas, al igual que Smo, también se mueven constantemente dentro y fuera del cilio, aunque por mecanismos distintos a éste (Endoh-Yamagami et al., 2009; Liem, Jr. et al., 2009). La fosforilación de Gli3 por PKA tiene lugar en la base del cilio y sus formas fosforiladas o truncadas no se han observado en la porción extracelular del cilio primario. Las quinasas CKI y CSK3β, así como los componentes del proteasoma se localizan también próximas a los centrosomas (Rogers et al., 2009 Fumoto et al., 2006; Sillibourne et al., 2002; Freed et al., 1999). Todo apunta, por lo tanto, a que el procesamiento de Gli3 se da en el citoplasma. Se ha demostrado que las proteínas situadas en el cuerpo celular están también implicadas en este proceso. En el ratón knock out *Ftm* (que carece de las proteínas del cuerpo basal) la producción del Gli3R se encuentra muy afectada (Vierkotten et al., 2007).

Por qué la activación de los factores de transcripción tiene lugar concretamente en la punta del cilio primario? Los factores Gli2/3 localizados en la punta parecen estar actuando como sensores que se mueven constantemente a lo largo del cilio y que detectan cambios en la inducción de la vía. Al activarse, se dirigen al núcleo en su forma completa y libres de Sufu para promover la transcripción de sus genes diana. Este fenómeno se ha demostrado con Gli2 (Kim et al., 2009). Es destacable que todos los experimentos de localización y de activación de Gli2 y Gli3 en presencia o ausencia de Shh se hayan hecho con células fijadas. Sería interesante hacer un seguimiento del movimiento de las moléculas *in vivo*.
Existe un llamativo estudio realizado en *Chlamydominas* con la subunidad no motora del complejo de la quinesina II KAP, que curiosamente también se localiza en la punta del cilio, lugar donde realiza su función en el transporte. Observaciones *in vivo* demuestran que la molécula puede concentrarse además en el cuerpo basal. En la mitosis temprana, después de la retracción del cilio y antes de la ruptura de la envuelta nuclear, KAP se mueve hacia el nucleo y se mantiene en el mismo hasta después de la formación de la nueva envoltura nuclear. Sólo desaparece del núcleo una vez comienza la ciliogénesis. Se han identificado secuencias de localización nuclear en el homólogo de erizo de mar (Morris et al., 2004). Las proteínas del transporte IFT podrían estar implicadas en la comunicación entre el cilio primario y el núcleo, ambos situados en estrecha proximidad. Una posible hipótesis es que, después de pasar por el cilio, las moléculas de Gli2 y Gli3 activas sean inyectados en el núcleo por alguna de las proteínas del IFT. Sería interesante determinar si la internalización en el núcleo del homólogo de KAP (o de alguna otra molécula del IFT) tiene lugar en vertebrados.

Modelo resumen

Con los mecanismos ya establecidos de la vía de Shh de vertebrados y los resultados obtenidos en los dos artículos de la presente tesis, se podría proponer un modelo (a modo de resumen).

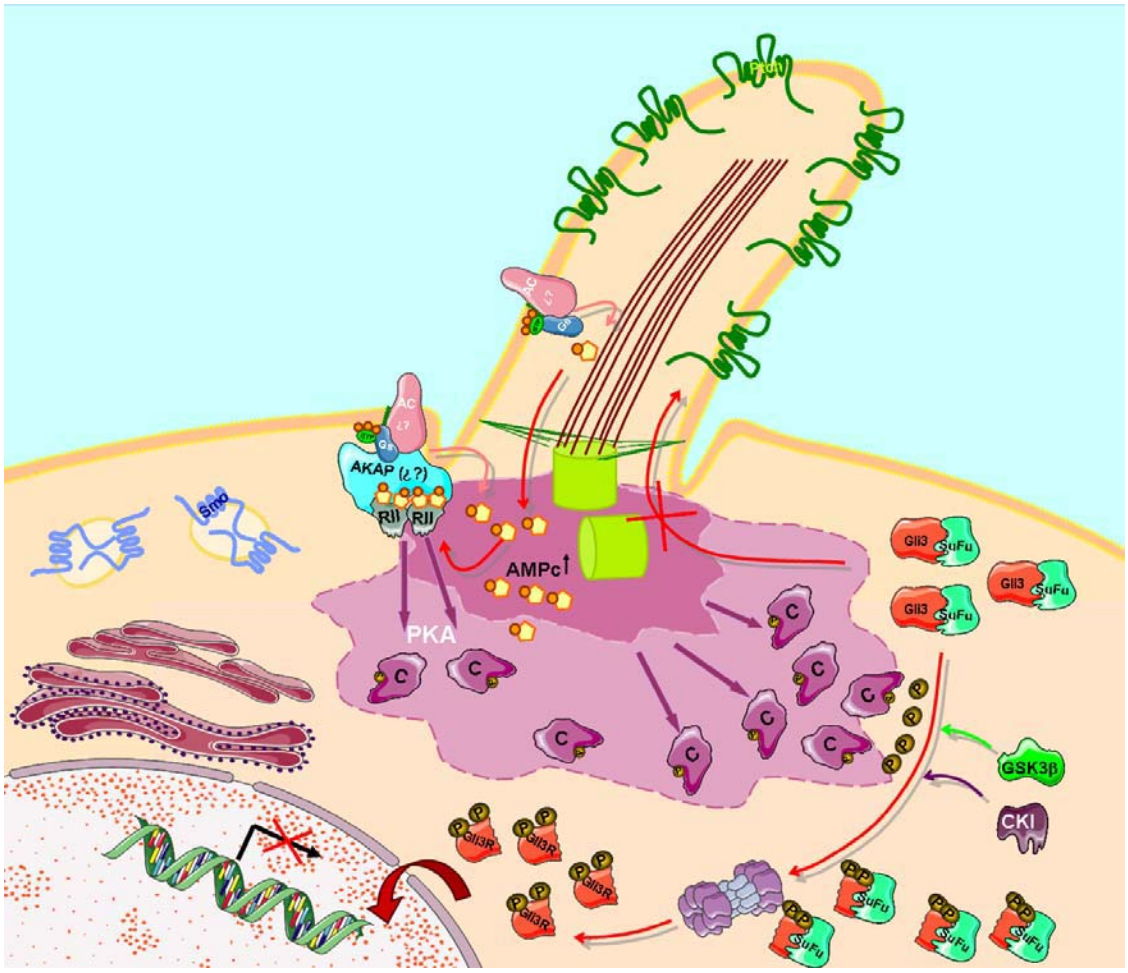


FIGURA 35. En en ausencia de Shh, Smo se encuentra reprimido por Ptch y no puede translocarse al cilio. Las subunidades Gαis, por tanto, se encuentran inhibidas y la AC (aún no identificada) se activa. Tiene lugar, por tanto, un incremento de los niveles de AMPc en el microdominio celular donde se encuentra la PKA, unida a una AKAP a través de la subunidad RII. La AC puede localizarse o bien en la membrana del cilio o en la base del mismo, por la interacción o no con alguna AKAP. Como consecuencia del incremento del AMPc en la base del cilio, la PKA se activa y la subunidad catalítica de la misma se separa y difunde en busca de sustratos a fosforilar. Entre éstos se encuentra Gli3, que será procesado por el proteasoma. Una vez formado, el Gli3 represor no puede entrar en el compartimento ciliar y se dirige al núcleo para reprimir la transcripción genética, impidiendo la proliferación de las PNGCs.

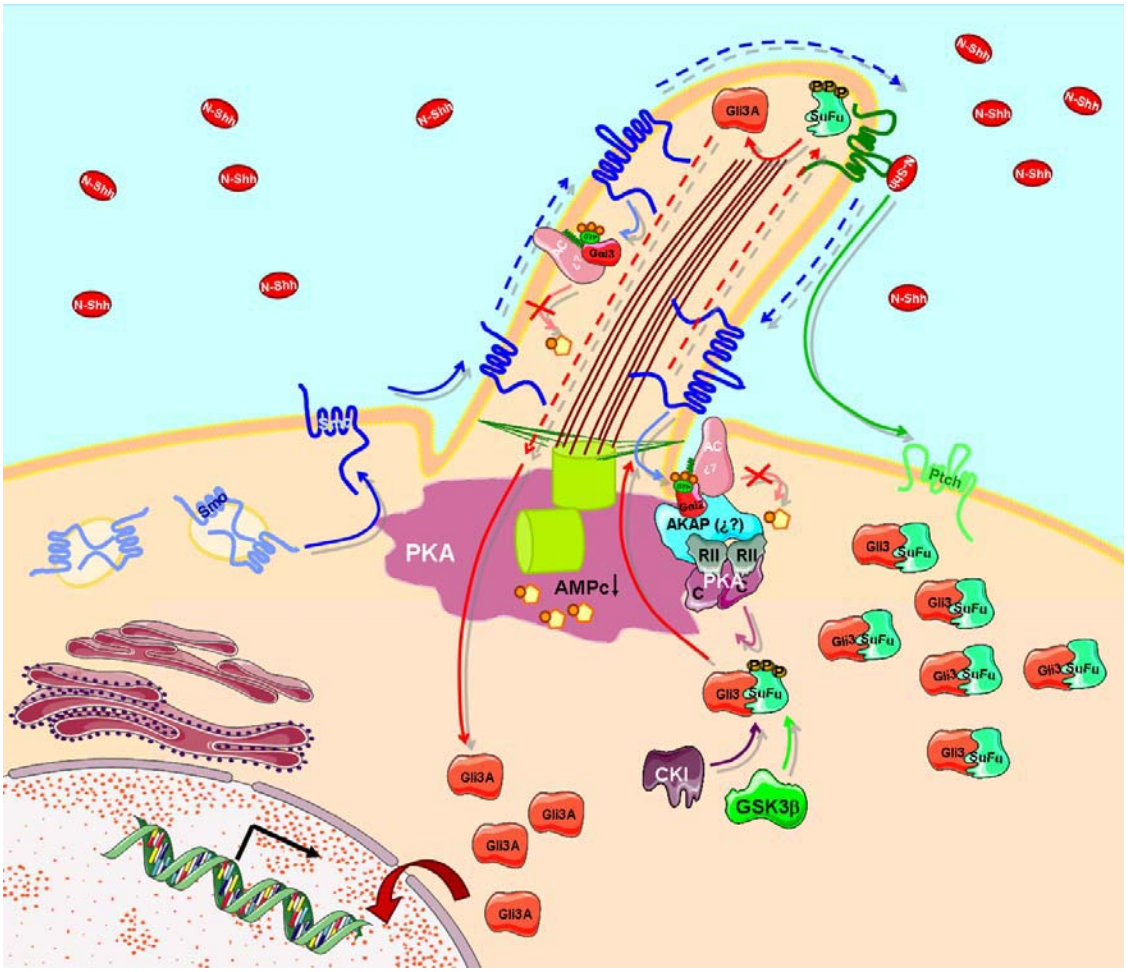
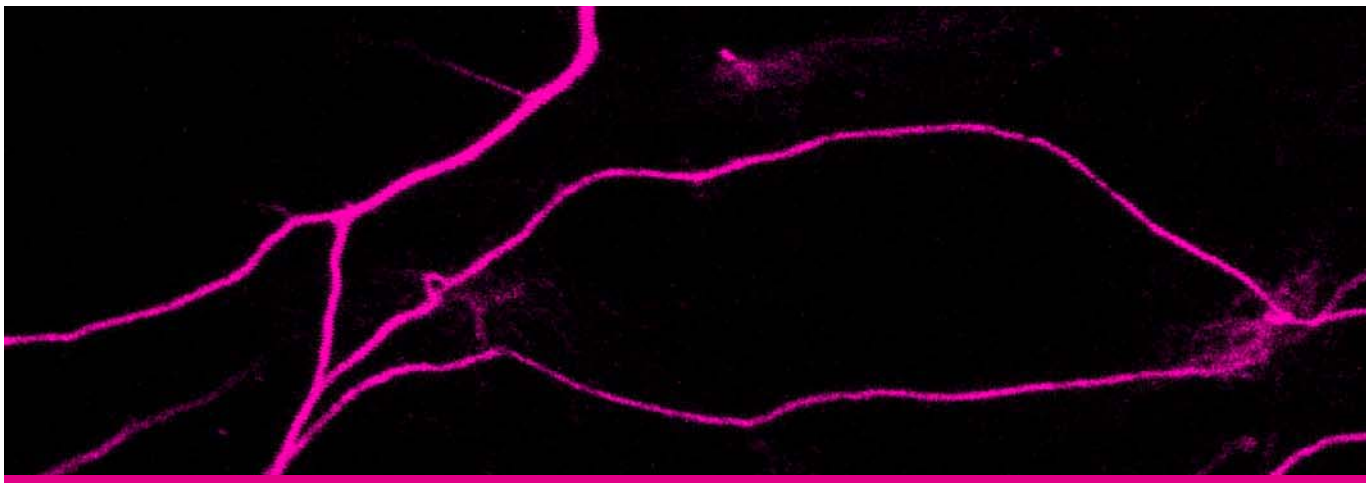
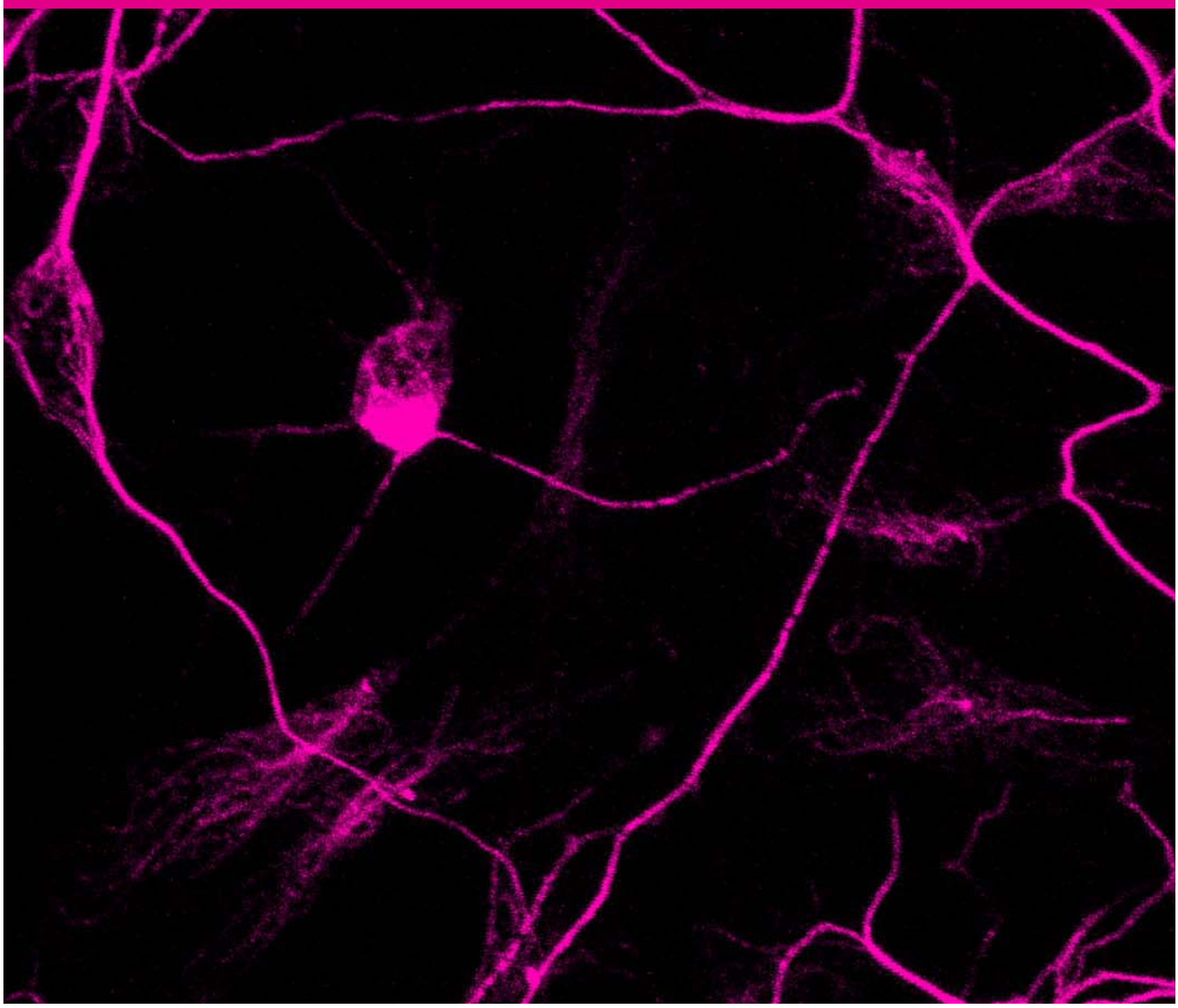


FIGURA 36. En presencia de Shh, en cambio, Ptch se internaliza y permite la entrada de Smo en el cilio. Allí interacciona con la subunidad Gαi3 acumulada y, en su retorno a la base, activa a la Gαi2. La AC se encuentra inactiva y tiene lugar una disminución de la producción de AMPc en el entorno del cilio primario. La PKA no puede activarse y no puede fosforilar a los factores de transcripción Gli2 y Gli3 que, en sus formas completas y unidas a Sufu se dirigen al cilio. Previamente a su entrada tiene lugar en el citoplasma la fosforilación de Sufu por PKA, CKI y GSK3β que promoverá la liberación de Gli2 y Gli3 en la punta del cilio. Una vez activados, estos factores de transcripción entran en el compartimento nuclear para mediar la transcripción genética e inducir la proliferación.



CONCLUSIONES



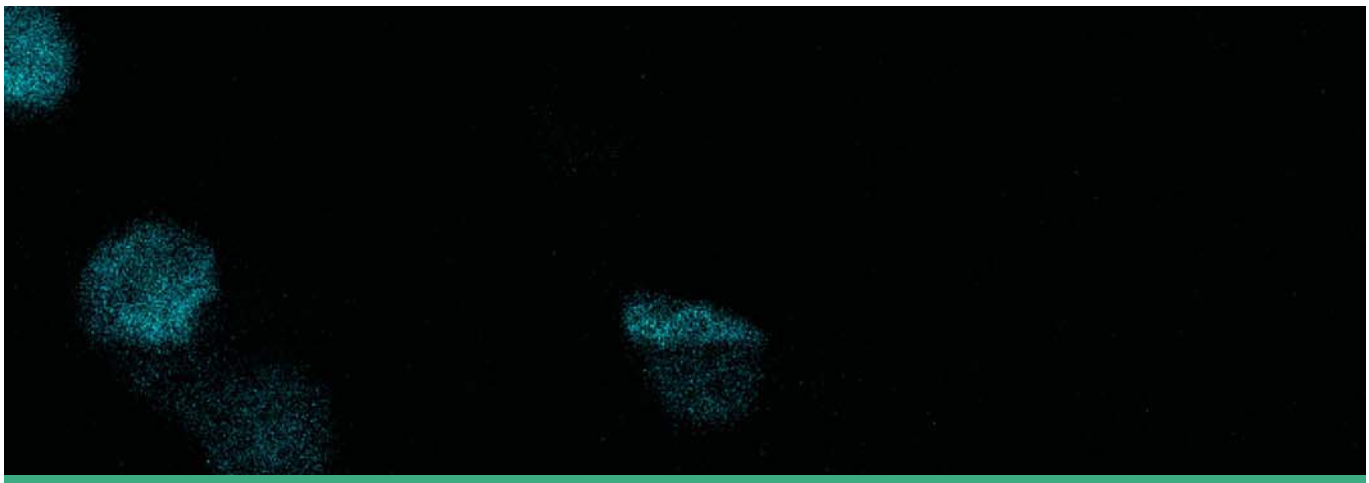
- La inhibición de la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico (PKA) induce la proliferación de los progenitores neuronales de células granulades de cerebelo (PNGCs) en ausencia de Shh. Sin embargo, Shh no es capaz de modular los niveles celulares totales de AMPc.

- La subunidad RII de PKA es la responsable de la acumulación de C-PKA en la base del cilio primario de PNGCs a través de la unión a una AKAP. Esta localización se encuentra regulada por Shh y es necesaria para que éste induzca la proliferación en PNGCs.

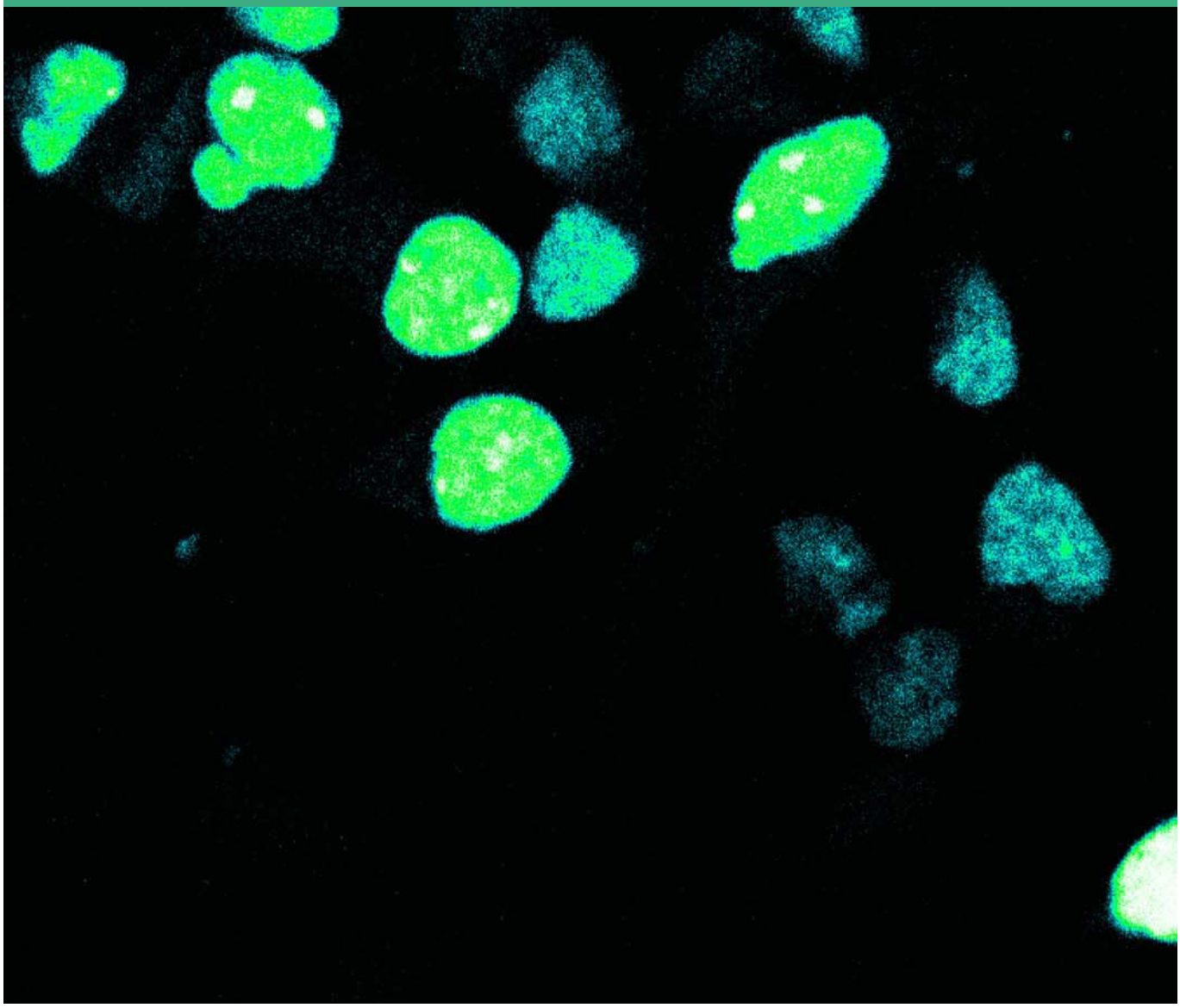
- Los mutantes constitutivamente activos de miembros de la clase Gαi/o de proteínas G, pero no de la clase Gα12-13, inducen la proliferación de PNGCs en presencia de concentraciones sub-proliferativas de Shh.

- Las subunidades Gαi2 y Gαi3 de proteína G son los únicos miembros de la clase Gαi/o que se expresan en la capa granular externa del cerebelo en desarrollo (CGEe), donde tiene lugar la la proliferación de los PNGCs. La eliminación de estas dos subunidades tiene un potente efecto antiproliferativo en cultivos de PNGCs.

- Las subunidades Gαi3 y Gαi2 se localizan en el cilio primario de PNGCs, de igual manera que lo hacen otros componentes de la ruta de Shh como Smo y los Gli.



BIBLIOGRAFÍA



Aanstad, P., Santos N., Corbit K. C., Scherz P. J., Trinh l. A., Salvenmoser W., Huisken J., Reiter J. F. and Stainier D. Y. (2009). The extracellular domain of Smoothened regulates ciliary localization and is required for high-level Hh signaling. *Curr.Biol*. **19**, 1034-1039.

Abraham, H., Tornoczky T., Kosztolanyi G. and Seress L. (2001). Cell formation in the cortical layers of the developing human cerebellum. *Int.J.Dev.Neurosci.* **19**, 53-62.

Acampora, D., Gulisano M., Broccoli V. and Simeone A. (2001). Otx genes in brain morphogenesis. *Prog.Neurobiol*. 64, 69-95.

Adams, J. A., McGlone M. L., Gibson R. and Taylor S. S. (1995). Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **34**, 2447-2454.

Ahlgren, S. C. and Bronner-Fraser M. (1999). Inhibition of sonic hedgehog signaling in vivo results in craniofacial neural crest cell death. *Curr.Biol*. **9**, 1304-1314.

Alcedo, J., Ayzenzon M., Von Ohlen T., Noll M. and Hooper J. E. (1996). The *Drosophila* smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* **86**, 221-232.

Altaba, A., Palma V. and Dahmane N. (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat.Rev.Neurosci*. **3**, 24-33.

Altman, J. and Bayer S. A. (1997). Development of the cerebellar system in relation to its evolution, structure and functions. *CRC Press*, Boca Raton.

Alvarez-Rodriguez, R., Barzi M., Berenguer J. and Pons S. (2007). Bone morphogenetic protein 2 opposes Shh-mediated proliferation in cerebellar granule cells through a TIEG-1-based regulation of Nmyc. *J.Biol.Chem*. **282**, 37170-37180.

Amatruda, T. T., III, Steele D. A., Slepak V. Z. and Simon M. I. (1991). G alpha 16, a G protein alpha subunit specifically expressed in hematopoietic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 5587-5591.

Amieux, P. S. and McKnight G. S. (2002). The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. **968**, 75-95.

Apionishev, S., Katanayeva N. M., Marks S. A., Kalderon D. and Tomlinson A. (2005). Drosophila Smoothened phosphorylation sites essential for Hedgehog signal transduction. *Nat.Cell Biol.* **7**, 86-92.

Asai, J., Takenaka H., Kusano K. F., Ii M., Luedemann C., Curry C., Eaton E., Iwakura A., Tsutsumi Y., Hamada H. et al. (2006). Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation* **113**, 2413-2424.

Badano, J. L., Mitsuma N., Beales P. L. and Katsanis N. (2006). The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 7, 125-148.

Banky, P., Roy M., Newlon M. G., Morikis D., Haste N. M., Taylor S. S. and Jennings P. A. (2003). Related protein-protein interaction modules present drastically different surface topographies despite a conserved helical

platform. *J.Mol.Biol*. **330**, 1117-1129.

Basto, R., Lau J., Vinogradova T., Gardiol A., Woods C. G., Khodjakov A. and Raff J. W. (2006). Flies without centrioles. *Cell* **125**, 1375-1386.

Bauman, A. L., Soughayer J., Nguyen B. T., Willoughby D., Carnegie G. K., Wong W., Hoshi N., Langeberg L. K., Cooper D. M., Dessauer C. W. et al. (2006). Dynamic regulation of cAMP synthesis through anchored PKA-adenylyl cyclase V/VI complexes. *Mol. Cell* **23**, 925-931.

Beene, D. L. and Scott J. D. (2007). A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr.Opin.Cell Biol.* **19**, 192-198.

Belloni, E., Muenke M., Roessler E., Traverso G., Siegel-Bartelt J., Frumkin A., Mitchell H. F., Donis-Keller H., Helms C., Hing A. V. et al. (1996). Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat.Genet.* **14**, 353-356.

Berbari, N. F., Bishop G. A., Askwith C. C., Lewis J. S. and Mykytyn K. (2007). Hippocampal neurons possess primary cilia in culture. *J.Neurosci.Res*. **85**, 1095-1100.

Berman, D. M. and Gilman A. G. (1998). Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J.Biol.Chem.* **273**, 1269-1272.

Bishop, G. A., Berbari N. F., Lewis J. and Mykytyn K. (2007). Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *J.Comp Neurol.* **505**, 562-571.

Boivin, B., Vaniotis G., Allen B. G. and Hebert T. E. (2008). G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm? *J.Recept.Signal. Transduct.Res.* **28**, 15-28.

Bossis, I. and Stratakis C. A. (2004). Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**, 5452-5458.

Bourne, H. R., Landis C. A. and Masters S. B. (1989). Hydrolysis of GTP by the alpha-chain of Gs and other GTP binding proteins. *Proteins* **6**, 222-230.

Bouvier, M., Hausdorff W. P., De Blasi A., O'Dowd B. F., Kobilka B. K., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1988). Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **333**, 370-373.

Briscoe, J., Pierani A., Jessell T. M. and Ericson J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-445.

Buhl, A. M., Johnson N. L., Dhanasekaran N. and Johnson G. L. (1995). G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. J.Biol.Chem. 270, 24631-24634.

Bumcrot, D. A., Takada R. and McMahon A. P. (1995). Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2294-2303.

Burke, R., Nellen D., Bellotto M., Hafen E., Senti K. A., Dickson B. J. and Basler K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* **99**, 803-815.

Carr, D. W., Stofko-Hahn R. E., Fraser I. D., Bishop S. M., Acott T. S., Brennan R. G. and Scott J. D. (1991). Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *J.Biol.Chem*. **266**, 14188-14192.

Caspary, T., Garcia-Garcia M. J., Huangfu D., Eggenschwiler J. T., Wyler M. R., Rakeman A. S., Alcorn H. L. and Anderson K. V. (2002). Mouse Dispatched homolog1 is required for long-range, but not juxtacrine, Hh signaling. *Curr.Biol*. **12**, 1628-1632.

Chamoun, Z., Mann R. K., Nellen D., von Kessler D. P., Bellotto M., Beachy P. A. and Basler K. (2001). Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* **293**, 2080-2084.

Charron, F., Stein E., Jeong J., McMahon A. P. and Tessier-Lavigne M. (2003). The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* **113**, 11-23.

Chen, C. A. and Manning D. R. (2001). Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* **20**, 1643-1652.

Chen, M. H., Wilson C. W., Li Y. J., Law K. K., Lu C. S., Gacayan R., Zhang X., Hui C. C. and Chuang P. T. (2009). Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev.* **23**, 1910-1928.

Chen, W., Ren X. R., Nelson C. D., Barak L. S., Chen J. K., Beachy P. A., de Sauvage F. and Lefkowitz R. J. (2004). Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science* **306**, 2257-2260.

Chen, Y., Cardinaux J. R., Goodman R. H. and Smolik S. M. (1999). Mutants of cubitus interruptus that are independent of PKA regulation are independent of hedgehog signaling. *Development* **126**, 3607-3616.

Chen, Y., Gallaher N., Goodman R. H. and Smolik S. M. (1998). Protein kinase A directly regulates the activity and proteolysis of cubitus interruptus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 2349-2354.

Chen, Y., Harry A., Li J., Smit M. J., Bai X., Magnusson R., Pieroni J. P., Weng G. and Iyengar R. (1997). Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* **94**, 14100-14104.

Chen, Y., Yue S., Xie L., Pu X. H., Jin T. and Cheng S. Y. (2011). Dual Phosphorylation of Suppressor of Fused (Sufu) by PKA and GSK3{beta} Regulates Its Stability and Localization in the Primary Cilium. *J.Biol. Chem.* **286**, 13502-13511.

Cheng, S., Maier D., Neubueser D. and Hipfner D. R. (2010). Regulation of smoothened by G-protein-coupled receptor kinases. *Dev.Biol.* **337**, 99-109.

Chiang, C., Litingtung Y., Lee E., Young K. E., Corden J. L., Westphal H. and Beachy P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog

gene function. *Nature* **383**, 407-413.

Chizhikov, V. V., Davenport J., Zhang Q., Shih E. K., Cabello O. A., Fuchs J. L., Yoder B. K. and Millen K. J. (2007). Cilia proteins control cerebellar morphogenesis by promoting expansion of the granule progenitor pool. *J.Neurosci*. **27**, 9780-9789.

Chomczynski, P. and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem*. **162**, 156-159.

Christensen, S. T., Pedersen L. B., Schneider L. and Satir P. (2007). Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. *Traffic*. **8**, 97-109.

Clapham, D. E. and Neer E. J. (1993). New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**, 403-406.

Clapham, D. E. and Neer E. J. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu.Rev. Pharmacol.Toxicol.* **37**, 167-203.

Clegg, C. H., Correll L. A., Cadd G. G. and McKnight G. S. (1987). Inhibition of intracellular cAMP-dependent protein kinase using mutant genes of the regulatory type I subunit. *J.Biol.Chem*. **262**, 13111-13119.

Collier, L. S., Suyama K., Anderson J. H. and Scott M. P. (2004). Costal1 mutations are alleles of protein kinase A that modulate hedgehog signaling. *Genetics* **167**, 783-796.

Concordet, J. P., Lewis K. E., Moore J. W., Goodrich L. V., Johnson R. L., Scott M. P. and Ingham P. W. (1996). Spatial regulation of a zebrafish patched homologue reflects the roles of sonic hedgehog and protein kinase A in neural tube and somite patterning. *Development 122*, 2835-2846.

Corbit, K. C., Aanstad P., Singla V., Norman A. R., Stainier D. Y. and Reiter J. F. (2005). Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018-1021.

Dahmane, N. and Altaba A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* **126**, 3089-3100.

Dahmane, N., Lee J., Robins P., Heller P. and Altaba A. (1997). Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* **389**, 876-881.

Davies, J. E. and Miller R. H. (2001). Local sonic hedgehog signaling regulates oligodendrocyte precursor appearance in multiple ventricular zone domains in the chick metencephalon. *Dev.Biol.* **233**, 513-525.

De Camilli, P., Moretti M., Donini S. D., Walter U. and Lohmann S. M. (1986). Heterogeneous distribution of the cAMP receptor protein RII in the nervous system: evidence for its intracellular accumulation on microtubules, microtubule-organizing centers, and in the area of the Golgi complex. *J.Cell Biol.* **103**, 189-203.

DeCamp, D. L., Thompson T. M., de Sauvage F. J. and Lerner M. R. (2000). Smoothened activates Galphai-mediated signaling in frog melanophores. *J.Biol.Chem*. **275**, 26322-26327.

Dessauer, C. W. (2009). Adenylyl cyclase--A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol. Pharmacol.* **76,** 935-941.

Diel, S., Klass K., Wittig B. and Kleuss C. (2006). Gbetagamma activation site in adenylyl cyclase type II. Adenylyl cyclase type III is inhibited by Gbetagamma. *J.Biol. Chem.* **281**, 288-294.

Downes, G. B. and Gautam N. (1999). The G protein subunit gene families. *Genomics* **62**, 544-552.

Echelard, Y., Epstein D. J., St Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J. A. and McMahon A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**, 1417-1430.

Emmer, B. T., Maric D. and Engman D. M. (2010). Molecular mechanisms of protein and lipid targeting to ciliary membranes. *J.Cell Sci.* **123**, 529-536.

Endoh-Yamagami, S., Evangelista M., Wilson D., Wen X., Theunissen J. W., Phamluong K., Davis M., Scales S. J., Solloway M. J., de Sauvage F. J. *et al.* (2009). The mammalian Cos2 homolog Kif7 plays an essential role in modulating Hh signal transduction during development. *Curr. Biol.* **19**, 1320-1326.

Epstein, D. J., Marti E., Scott M. P. and McMahon A. P. (1996). Antagonizing cAMP-dependent protein kinase A in the dorsal CNS activates a conserved Sonic hedgehog signaling pathway. *Development* **122**, 2885-2894.

Farzan, S. F., Ascano M., Jr., Ogden S. K., Sanial M., Brigui A., Plessis A. and Robbins D. J. (2008). Costal2 functions as a kinesin-like protein in the hedgehog signal transduction pathway. *Curr.Biol.* **18**, 1215-1220.

Fogarty, M. P., Emmenegger B. A., Grasfeder L. L., Oliver T. G. and Wechsler-Reya R. J. (2007). Fibroblast growth factor blocks Sonic hedgehog signaling in neuronal precursors and tumor cells. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* **104**, 2973-2978.

Foord, S. M., Bonner T. I., Neubig R. R., Rosser E. M., Pin J. P., Davenport A. P., Spedding M. and Harmar A. J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol. Rev.* **57**, 279-288.

Freed, E., Lacey K. R., Huie P., Lyapina S. A., Deshaies R. J., Stearns T. and Jackson P. K. (1999). Components of an SCF ubiquitin ligase localize to the centrosome and regulate the centrosome duplication cycle. *Genes Dev.* **13**, 2242-2257.

Fumoto, K., Hoogenraad C. C. and Kikuchi A. (2006). GSK-3beta-regulated interaction of BICD with dynein is involved in microtubule anchorage at centrosome. *EMBO J.* **25**, 5670-5682.

Gales, C., Van Durm J. J., Schaak S., Pontier S., Percherancier Y., Audet M., Paris H. and Bouvier M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **13**, 778-786.

Garg, V., Yamagishi C., Hu T., Kathiriya I. S., Yamagishi H. and Srivastava D. (2001). Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development. *Dev.Biol*. **235**, 62-73.

Gerdes, J. M., Davis E. E. and Katsanis N. (2009). The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* **137**, 32-45.

Gill, D. M. and Meren R. (1978). ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **75**, 3050-3054.

Gillingham, A. K. and Munro S. (2000). The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Rep*. **1**, 524-529.

Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu.Rev. Biochem.* **56**, 615-649.

Goetz, J. A., Singh S., Suber L. M., Kull F. J. and Robbins D. J. (2006). A highly conserved amino-terminal region of sonic hedgehog is required for the formation of its freely diffusible multimeric form. *J.Biol. Chem.* **281**, 4087-4093.

Gold, M. G., Lygren B., Dokurno P., Hoshi N., McConnachie G., Tasken K., Carlson C. R., Scott J. D. and Barford D. (2006). Molecular basis of AKAP specificity for PKA regulatory subunits. *Mol.Cell* **24**, 383-395.

Goodrich, L. V., Johnson R. L., Milenkovic L., McMahon J. A. and Scott M. P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev.* **10**, 301-312.

Goodrich, L. V., Milenkovic L., Higgins K. M. and Scott M. P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277**, 1109-1113.

Gorlin, R. J. (1987). Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Medicine* (Baltimore) **66**, 98-113.

Gorlin, R. J. and GOLTZ R. W. (1960). Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N.Engl.J Med.* **262**, 908-912.

Gotta, M. and Ahringer J. (2001). Distinct roles for Galpha and Gbetagamma in regulating spindle position and orientation in Caenorhabditis elegans embryos. *Nat.Cell Biol.* **3**, 297-300.

Graf, R., Mattera R., Codina J., Evans T., Ho Y. K., Estes M. K. and Birnbaumer L. (1992). Studies on the interaction of alpha subunits of GTP-binding proteins with beta gamma dimers. *Eur.J.Biochem*. **210**, 609-619.

Haines D.E. (2008). Neuroanatomy: an atlas of structures, sections and systems. lippincott *Williams & Wilkins, Phyladelphya.*

Hammerschmidt, M., Bitgood M. J. and McMahon A. P. (1996). Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo. *Genes Dev.* **10**, 647-658.

Hammerschmidt, M. and McMahon A. P. (1998). The effect of pertussis toxin on zebrafish development: a possible role for inhibitory G-proteins in hedgehog signaling. *Dev.Biol*. **194**, 166-171.

Han, Y. G., Kwok B. H. and Kernan M. J. (2003). Intraflagellar transport is required in to differentiate sensory cilia but not sperm. *Curr.Biol.* **13**, 1679-1686.

Han, Y. G., Spassky N., Romaguera-Ros M., Garcia-Verdugo J. M., Aguilar A., Schneider-Maunoury S. and Alvarez-Buylla A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat.Neurosci.* **11**, 277-284.

Hasegawa, E., Hayashi H., Asakura S. and Kamiya R. (1987). Stimulation of in vitro motility of Chlamydomonas axonemes by inhibition of cAMP-dependent phosphorylation. *Cell Motil.Cytoskeleton* **8**, 302-311.

Hatten, M. E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu.Rev.Neurosci.* **22**, 511-539.

Hausdorff, W. P., Bouvier M., O'Dowd B. F., Irons G. P., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J.Biol.Chem.* **264**, 12657-12665.

Hausken, Z. E., Coghlan V. M., Hastings C. A., Reimann E. M. and Scott J. D. (1994). Type II regulatory subunit (RII) of the cAMP-dependent protein kinase interaction with A-kinase anchor proteins requires isoleucines 3 and 5. *J.Biol.Chem.* **269**, 24245-24251.

Haycraft, C. J., Banizs B., Aydin-Son Y., Zhang Q., Michaud E. J. and Yoder B. K. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS. Genet.* 1, e53

Haycraft, C. J., Zhang Q., Song B., Jackson W. S., Detloff P. J., Serra R. and Yoder B. K. (2007). Intraflagellar transport is essential for endochondral bone formation. *Development* **134**, 307-316.

Hidalgo-Sanchez, M., Millet S., Simeone A. and Alvarado-Mallart R. M. (1999). Comparative analysis of Otx2, Gbx2, Pax2, Fgf8 and Wnt1 gene expressions during the formation of the chick midbrain/hindbrain domain. *Mech.Dev.* **81**, 175-178.

Hirokawa, N., Tanaka Y., Okada Y. and Takeda S. (2006). Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* **125**, 33-45.

Hochman, E., Castiel A., Jacob-Hirsch J., Amariglio N. and Izraeli S. (2006). Molecular pathways regulating pro-migratory effects of Hedgehog signaling. *J.Biol.Chem.* **281**, 33860-33870.

Houde, C., Dickinson R. J., Houtzager V. M., Cullum R., Montpetit R., Metzler M., Simpson E. M., Roy S., Hayden M. R., Hoodless P. A. *et al*. (2006). Hippi is essential for node cilia assembly and Sonic hedgehog signaling. *Dev.Biol*. **300**, 523-533.

Howard, D. R., Habermacher G., Glass D. B., Smith E. F. and Sale W. S. (1994). Regulation of Chlamydomonas flagellar dynein by an axonemal protein kinase. *J.Cell Biol.* **127**, 1683-1692.

Hu, Q., Milenkovic L., Jin H., Scott M. P., Nachury M. V., Spiliotis E. T. and Nelson W. J. (2010). A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* **329**, 436-439.

Huang, Y., Roelink H. and McKnight G. S. (2002). Protein kinase A deficiency causes axially localized neural tube defects in mice. *J.Biol.Chem.* **277**, 19889-19896.

Huangfu, D. and Anderson K. V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 11325-11330.

Huangfu, D., Liu A., Rakeman A. S., Murcia N. S., Niswander L. and Anderson K. V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* **426**, 83-87.

Hynes, M., Porter J. A., Chiang C., Chang D., Tessier-Lavigne M., Beachy P. A. and Rosenthal A. (1995). Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* **15**, 35-44.

Ingham, P. W. and McMahon A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**, 3059-3087.

Inglis, P. N., Boroevich K. A. and Leroux M. R. (2006). Piecing together a ciliome. *Trends Genet.* **22**, 491-500.

Iwami, G., Kawabe J., Ebina T., Cannon P. J., Homcy C. J. and Ishikawa Y. (1995). Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J.Biol.Chem*. **270**, 12481-12484.

Izumi, Y., Ohta N., Itoh-Furuya A., Fuse N. and Matsuzaki F. (2004). Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in neuroblast asymmetric division. *J.Cell Biol*. **164**, 729-738.

Jia, J., Tong C., Wang B., Luo L. and Jiang J. (2004). Hedgehog signalling activity of Smoothened requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* **432**, 1045-1050.

Jiang, J. and Struhl G. (1995). Protein kinase A and hedgehog signaling in limb development. *Cell* **80**, 563-572.

Josep, J. T. and Cardozo D. L. (2004). Functional neuroanatomy: an interactive text and manual. *J.Wiley & Sons, Hoboken, N.Y.*

Kamenetsky, M., Middelhaufe S., Bank E. M., Levin L. R., Buck J. and Steegborn C. (2006b). Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J.Mol.Biol.* **362,** 623-639.

Kamenetsky, M., Middelhaufe S., Bank E. M., Levin L. R., Buck J. and Steegborn C. (2006a). Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J.Mol.Biol.* **362**, 623-639.

Kasai, K., Takahashi M., Osumi N., Sinnarajah S., Takeo T., Ikeda H., Kehrl J. H., Itoh G. and Arnheiter H. (2004). The G12 family of heterotrimeric G proteins and Rho GTPase mediate Sonic hedgehog signalling. *Genes Cells* **9**, 49-58.

Katoh, Y. and Katoh M. (2009). Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr.Mol.Med*. **9**, 873-886.

Kemp, B. E., Graves D. J., Benjamini E. and Krebs E. G. (1977). Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem*. **252**, 4888-4894.

Kenney, A. M. and Rowitch D. H. (2000). Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol.Cell Biol.* **20**, 9055-9067.

Keryer, G., Rios R. M., Landmark B. F., Skalhegg B., Lohmann S. M. and Bornens M. (1993). A high-affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II in the centrosome of human cells. *Exp.Cell Res*. **204**, 230-240.

Kim, C., Cheng C. Y., Saldanha S. A. and Taylor S. S. (2007). PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell* **130**, 1032-1043.

Kim, J., Kato M. and Beachy P. A. (2009). Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothened in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**, 21666-21671.

Kiprilov, E. N., Awan A., Desprat R., Velho M., Clement C. A., Byskov A. G., Andersen C. Y., Satir P., Bouhassira E. E., Christensen S. T. *et al.* (2008). Human embryonic stem cells in culture possess primary cilia with hedgehog signaling machinery. *J.Cell Bio*l. **180**, 897-904.

Kleppisch, T. (2009). Phosphodiesterases in the central nervous system. *Handb.Exp. Pharmacol*.71-92.

Kolpak, A., Zhang J. and Bao Z. Z. (2005). Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J.Neurosci.* **25**, 3432-3441.

Kovacs, J. J., Whalen E. J., Liu R., Xiao K., Kim J., Chen M., Wang J., Chen W. and Lefkowitz R. J. (2008). Beta-arrestin-mediated localization of smoothened to the primary cilium. *Science* **320**, 1777-1781.

Kozminski, K. G. (1995). High-resolution imaging of flagella. *Methods Cell Biol.* **47**, 263-271.

Kozminski, K. G., Beech P. L. and Rosenbaum J. L. (1995). The Chlamydomonas kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J.Cell Biol.* **131**, 1517-1527.

Kozminski, K. G., Johnson K. A., Forscher P. and Rosenbaum J. L. (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 5519-5523.

Larsen William J. (1993). Human Embryology. *Churchill Livingstone*.

Lee, J. D., Kraus P., Gaiano N., Nery S., Kohtz J., Fishell G., Loomis C. A. and Treisman J. E. (2001). An acylatable residue of Hedgehog is differentially required in and mouse limb development. *Dev.Biol.* **233**, 122-136.

Lefkowitz, R. J. (1993). G protein-coupled receptor kinases. *Cell* **74**, 409-412.

Lehman, J. M., Michaud E. J., Schoeb T. R., Aydin-Son Y., Miller M. and Yoder B. K. (2008). The Oak Ridge Polycystic Kidney

mouse: modeling ciliopathies of mice and men. *Dev.Dyn.* **237**, 1960-1971.

Li, J. Y. and Joyner A. L. (2001). Otx2 and Gbx2 are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development* **128**, 4979-4991.

Li, W., Ohlmeyer J. T., Lane M. E. and Kalderon D. (1995a). Function of protein kinase A in hedgehog signal transduction and imaginal disc development. *Cell* **80**, 553-562.

Li, Y. and Rubin C. S. (1995b). Mutagenesis of the regulatory subunit (RII beta) of cAMP-dependent protein kinase II beta reveals hydrophobic amino acids that are essential for RII beta dimerization and/or anchoring RII beta to the cytoskeleton. *J.Biol.Chem*. **270**, 1935-1944.

Liem, K. F., Jr., He M., Ocbina P. J. and Anderson K. V. (2009). Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* **106**, 13377-13382.

Linder, J. U. (2006). Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell Mol.Life Sci.* **63**, 1736-1751.

Liu, A., Wang B. and Niswander L. A. (2005). Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development* **132**, 3103-3111.

Low, W. C., Wang C., Pan Y., Huang X. Y., Chen J. K. and Wang B. (2008). The decoupling of Smoothened from Galphai proteins has little effect on Gli3 protein processing and Hedgehog-regulated chick neural tube patterning. *Dev.Biol.* **321**, 188-196.

Lum, L., Yao S., Mozer B., Rovescalli A., Von Kessler D., Nirenberg M. and Beachy P. A. (2003). Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in cultured cells. Science 299, 2039-2045.

Lynn, M. and Heather I.McKhann O. L. (1992). Illustrated Glossary of Protoctista: Vocabulary of the Algae, Apicomplexa, Ciliates, Foraminifera, Microspora, Water Molds, Slime Molds, and the Other Protoctists. *John & Bartlett Publishers, Boston*.

Ma, Y., Erkner A., Gong R., Yao S., Taipale J., Basler K. and Beachy P. A. (2002). Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell* **111**, 63-75.

Malbon, C. C. (2005). G proteins in development. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **6**, 689-701.

Malbon, C. C., Tao J., Shumay E. and Wang H. Y. (2004). AKAP (A-kinase anchoring protein) domains: beads of structure-function on the necklace of G-protein signalling. *Biochem.Soc.Trans*. **32**, 861-864.

Marigo, V., Davey R. A., Zuo Y., Cunningham J. M. and Tabin C. J. (1996a). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* **384**, 176-179.

Marigo, V., Scott M. P., Johnson R. L., Goodrich L. V. and Tabin C. J. (1996b). Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. *Development* **122**, 1225-1233.

Marshall, W. F. (2009). Centriole evolution. *Curr.Opin.Cell Biol*. **21**, 14-19.

Marszalek, J. R., Ruiz-Lozano P., Roberts E., Chien K. R. and Goldstein L. S. (1999). Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. Proc. *Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 5043-5048.

Martin J.H. (2003). Neuroanatomy text and atlas. *McGraw-Hill, New York, N.Y.*

Masyuk, A. I., Gradilone S. A., Banales J. M., Huang B. Q., Masyuk T. V., Lee S. O., Splinter P. L., Stroope A. J. and Larusso N. F. (2008). Cholangiocyte primary cilia are chemosensory organelles that detect biliary nucleotides via P2Y12 purinergic receptors. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **295**, G725-G734.

May, S. R., Ashique A. M., Karlen M., Wang B., Shen Y., Zarbalis K., Reiter J., Ericson J. and Peterson A. S. (2005). Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev.Biol.* **287**, 378-389.

McConnachie, G., Langeberg L. K. and Scott J. D. (2006). AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol.Med*. **12**, 317-323.

Meloni, A. R., Fralish G. B., Kelly P., Salahpour A., Chen J. K., Wechsler-Reya R. J., Lefkowitz R. J. and Caron M. G. (2006). Smoothened signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol. Cell Biol.* **26**, 7550-7560.

Merchant, M., Vajdos F. F., Ultsch M., Maun H. R., Wendt U., Cannon J., Desmarais W., Lazarus R. A., de Vos A. M. and de Sauvage F. J. (2004). Suppressor of fused regulates Gli activity through a dual binding mechanism. *Mol.Cell Biol.* **24**, 8627-8641.

Meyer-Franke, A., Kaplan M. R., Pfrieger F. W. and Barres B. A. (1995). Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* **15**, 805-819.

Milenkovic, L. and Scott M. P. (2010). Not lost in space: trafficking in the hedgehog signaling pathway. *Sci.Signal.* **3**, e14

Milenkovic, L., Scott M. P. and Rohatgi R. (2009). Lateral transport of Smoothened from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J.Cell Biol.* 187, 365-374.

Mill, P., Mo R., Hu M. C., Dagnino L., Rosenblum N. D. and Hui C. C. (2005). Shh controls epithelial proliferation via independent pathways that converge on N-Myc. *Dev.Cell* **9**, 293-303.

Milligan, G. and Kostenis E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. Br.J.Pharmacol. 147 Suppl 1, S46-S55.

Miyazawa, K., Himi T., Garcia V., Yamagishi H., Sato S. and Ishizaki Y. (2000). A role for p27/Kip1 in the control of cerebellar granule cell precursor proliferation. *J.Neurosci*. **20**, 5756-5763.

Molnar, C., Holguin H., Mayor F., Jr., Ruiz-Gomez A. and de Celis J. F. (2007). The G protein-coupled receptor regulatory kinase GPRK2 participates in Hedgehog signaling in Hedgehog signaling in *Drosophila Proc.Natl*.

Acad.Sci.U.S.A **104**, 7963-7968.

Morris, R. L., English C. N., Lou J. E., Dufort F. J., Nordberg J., Terasaki M. and Hinkle B. (2004). Redistribution of the kinesin-II subunit KAP from cilia to nuclei during the mitotic and ciliogenic cycles in sea urchin embryos. *Dev.Biol.* **274**, 56-69.

Moxham, C. M., Hod Y. and Malbon C. C. (1993). Induction of G alpha i2-specific antisense RNA in vivo inhibits neonatal growth. *Science* **260**, 991-995.

Muniz, M., Alonso M., Hidalgo J. and Velasco A. (1996). A regulatory role for cAMP-dependent protein kinase in protein traffic along the exocytic route. J.Biol.Chem. **271**, 30935-30941.

Muniz, M., Martin M. E., Hidalgo J. and Velasco A. (1997). Protein kinase A activity is required for the budding of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 14461-14466.

Murcia, N. S., Richards W. G., Yoder B. K., Mucenski M. L., Dunlap J. R. and Woychik R. P. (2000). The Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk) disease gene is required for left-right axis determination. *Development* **127**, 2347-2355.

Murone, M., Rosenthal A. and de Sauvage F. J. (1999). Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothened receptor complex. *Curr. Biol.* **9**, 76-84.

Neer, E. J. (1994). G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.* **3**, 3-14.

Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-257.

Newlon, M. G., Roy M., Morikis D., Carr D. W., Westphal R., Scott J. D. and Jennings P. A. (2001). A novel mechanism of PKA anchoring revealed by solution structures of anchoring complexes. *EMBO J.* **20**, 1651-1662.

Nicot, A., Lelievre V., Tam J., Waschek J. A. and DiCicco-Bloom E. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and sonic hedgehog interact to control cerebellar granule precursor cell proliferation. *J.Neurosci.* **22**, 9244-9254.

Nigg, E. A. and Raff J. W. (2009). Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* **139**, 663-678.

Nigg, E. A., Schafer G., Hilz H. and Eppenberger H. M. (1985). Cyclic-AMP-dependent protein kinase type II is associated with the Golgi complex and with centrosomes. *Cell* **41**, 1039-1051.

Nonaka, S., Tanaka Y., Okada Y., Takeda S., Harada A., Kanai Y., Kido M. and Hirokawa N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**, 829-837.

Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in . *Nature* **287**, 795-801.

Ocbina, P. J. and Anderson K. V. (2008). Intraflagellar transport, cilia, and mammalian Hedgehog signaling: analysis in mouse

embryonic fibroblasts. *Dev.Dyn.* **237**, 2030-2038.

Ogden, S. K., Fei D. L., Schilling N. S., Ahmed Y. F., Hwa J. and Robbins D. J. (2008). G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothened in Hedgehog signalling. *Nature* **456**, 967-970.

Oldham, W. M. and Hamm H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat.Rev.Mol. Cell Biol.* **9**, 60-71.

Oliver, T. G., Grasfeder L. L., Carroll A. L., Kaiser C., Gillingham C. L., Lin S. M., Wickramasinghe R., Scott M. P. and Wechsler-Reya R. J. (2003). Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 7331-7336.

Ou, Y., Ruan Y., Cheng M., Moser J. J., Rattner J. B. and van der Hoorn F. A. (2009). Adenylate cyclase regulates elongation of mammalian primary cilia. *Exp.Cell Res.* **315**, 2802-2817.

Overington, J. P., Al Lazikani B. and Hopkins A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nat.Rev.Drug Discov.* **5**, 993-996.

Pazour, G. J. and Bloodgood R. A. (2008). Targeting proteins to the ciliary membrane. *Curr.Top.Dev.Biol.* **85**, 115-149.

Pedersen, L. B. and Rosenbaum J. L. (2008a). Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr.Top.Dev.Biol*. **85**, 23-61.

Pedersen, L. B., Veland I. R., Schroder J. M. and Christensen S. T. (2008b). Assembly of primary cilia. *Dev.Dyn.* **237**, 1993-2006.

Pepinsky, R. B., Zeng C., Wen D., Rayhorn P., Baker D. P., Williams K. P., Bixler S. A., Ambrose C. M., Garber E. A., Miatkowski K. et al. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J.Biol.Chem*. **273**, 14037-14045.

Philipp, M., Fralish G. B., Meloni A. R., Chen W., MacInnes A. W., Barak L. S. and Caron M. G. (2008). Smoothened signaling in vertebrates is facilitated by a G protein-coupled receptor kinase. *Mol.Biol.Cell* **19**, 5478-5489.

Pidoux, G. and Tasken K. (2010). Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J.Mol.Endocrinol.* **44**, 271-284.

Piggott, L. A., Bauman A. L., Scott J. D. and Dessauer C. W. (2008). The A-kinase anchoring protein Yotiao binds and regulates adenylyl cyclase in brain. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* **105**, 13835-13840.

Porter, J. A., Young K. E. and Beachy P. A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* **274**, 255-259.

Praetorius, H. A. and Spring K. R. (2005). A physiological view of the primary cilium. *Annu.Rev.Physiol* **67**, 515-529.

Price, M. A. and Kalderon D. (1999). Proteolysis of cubitus interruptus in requires phosphorylation by protein kinase A. *Development* **126**, 4331-4339.

Qanbar, R. and Bouvier M. (2003). Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol.Ther.* **97**, 1-33.

Qin, H., Diener D. R., Geimer S., Cole D. G. and Rosenbaum J. L. (2004). Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *J.Cell Biol*. **164**, 255-266.

Raffel, C., Jenkins R. B., Frederick L., Hebrink D., Alderete B., Fults D. W. and James C. D. (1997). Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res.* **57**, 842-845.

Rana, A. A., Barbera J. P., Rodriguez T. A., Lynch D., Hirst E., Smith J. C. and Beddington R. S. (2004). Targeted deletion of the novel cytoplasmic dynein mD2LIC disrupts the embryonic organiser, formation of the body axes and specification of ventral cell fates. *Development* **131**, 4999-5007.

Riobo, N. A., Lu K., Ai X., Haines G. M. and Emerson C. P., Jr. (2006a). Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* **103**, 4505-4510.

Riobo, N. A. and Manning D. R. (2007). Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem.J.* **403**, 369-379.

Riobo, N. A., Saucy B., Dilizio C. and Manning D. R. (2006b). Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothened. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**, 12607-12612.

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

Robbins, D. J., Nybakken K. E., Kobayashi R., Sisson J. C., Bishop J. M. and Therond P. P. (1997). Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2. *Cell* **90**, 225-234.

Rogers, G. C., Rusan N. M., Roberts D. M., Peifer M. and Rogers S. L. (2009). The SCF Slimb ubiquitin ligase regulates Plk4/Sak levels to block centriole reduplication. **J.Cell Biol. 184**, 225-239.

Rohatgi, R., Milenkovic L., Corcoran R. B. and Scott M. P. (2009). Hedgehog signal transduction by Smoothened: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**, 3196-3201.

Rohatgi, R., Milenkovic L. and Scott M. P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**, 372-376.

Rohatgi, R. and Snell W. J. (2010). The ciliary membrane. *Curr.Opin.Cell Biol.* **22**, 541-546.

Rosenbaum, J. L. and Witman G. B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 813-825.

Rowitch, D. H., Jacques B., Lee S. M., Flax J. D., Snyder E. Y. and McMahon A. P. (1999). Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J.Neurosci.* **19**, 8954-8965.

Ruiz-Gomez, A., Molnar C., Holguin H., Mayor F., Jr. and de Celis J. F. (2007). The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs. *Biochim.Biophys. Acta* **1768**, 901-912.

San Agustin, J. T. and Witman G. B. (1994). Role of cAMP in the reactivation of demembranated ram spermatozoa. *Cell Motil. Cytoskeleton* **27**, 206-218.

Sarpal, R., Todi S. V., Sivan-Loukianova E., Shirolikar S., Subramanian N., Raff E. C., Erickson J. W., Ray K. and Eberl D. F. (2003). *Drosophila* KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails. *Curr.Biol.* **13**, 1687-1696.

Satir, P., Guerra C. and Bell A. J. (2007). Evolution and persistence of the cilium. *Cell Motil.Cytoskeleton* **64**, 906-913.

Satir, P., Pedersen L. B. and Christensen S. T. (2010). The primary cilium at a glance. *J.Cell Sci.* **123**, 499-503.

Schmidt, P. H., Dransfield D. T., Claudio J. O., Hawley R. G., Trotter K. W., Milgram S. L. and Goldenring J. R. (1999). AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. *J.Biol. Chem.* **274**, 3055-3066.

Schuller, U., Heine V. M., Mao J., Kho A. T., Dillon A. K., Han Y. G., Huillard E., Sun T., Ligon A. H., Qian Y. et al. (2008). Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. Cancer *Cell* **14**, 123-134.

Seeger, R. C., Brodeur G. M., Sather H., Dalton A., Siegel S. E., Wong K. Y. and Hammond D. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N.Engl.J.Med.* **313**, 1111-1116.

Shanks, R. A., Steadman B. T., Schmidt P. H. and Goldenring J. R. (2002). AKAP350 at the Golgi apparatus. I. Identification of a distinct Golgi apparatus targeting motif in AKAP350. *J.Biol.Chem.* **277**, 40967-40972.

Sillibourne, J. E., Milne D. M., Takahashi M., Ono Y. and Meek D. W. (2002). Centrosomal anchoring of the protein kinase CK1delta mediated by attachment to the large, coiled-coil scaffolding protein CG-NAP/ AKAP450. *J.Mol.Biol*. **322**, 785-797.

Simon, M. I., Strathmann M. P. and Gautam N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-808.

Singla, V. and Reiter J. F. (2006). The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* **313**, 629-633.

Smotrys, J. E. and Linder M. E. (2004). Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu.Rev. Biochem.* **73**, 559-587.

Sorokin, S. P. (1968a). Centriole formation and ciliogenesis. *Aspen.Emphysema.Conf.* **11**, 213-216.

Sorokin, S. P. (1968b). Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. **J.Cell Sci**. 3, 207-230.

Spassky, N., Han Y. G., Aguilar A., Strehl L., Besse L., Laclef C., Ros M. R., Garcia-Verdugo J. M. and Alvarez-Buylla A. (2008). Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Dev.Biol.* **317**, 246-259.

Stone, D. M., Hynes M., Armanini M., Swanson T. A., Gu Q., Johnson R. L., Scott M. P., Pennica D., Goddard A., Phillips H. *et al*. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* **384**, 129-134.

Stone, D. M., Murone M., Luoh S., Ye W., Armanini M. P., Gurney A., Phillips H., Brush J., Goddard A., de Sauvage F. J. *et al.* (1999). Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J.Cell Sci.* 112 (Pt 23), 4437-4448.

Sunahara, R. K., Dessauer C. W. and Gilman A. G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **36**, 461-480.

Takeda, S., Yonekawa Y., Tanaka Y., Okada Y., Nonaka S. and Hirokawa N. (1999). Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by kif3A-/- mice analysis. *J.Cell Biol.* **145**, 825-836.

Taylor, M. D., Liu L., Raffel C., Hui C. C., Mainprize T. G., Zhang X., Agatep R., Chiappa S., Gao L., Lowrance A. *et al.* (2002). Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat.Genet.* **31**, 306-310.

Taylor, S. S., Kim C., Cheng C. Y., Brown S. H., Wu J. and Kannan N. (2008). Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. Biochim.*Biophys.Acta* **1784**, 16-26.

Tempe, D., Casas M., Karaz S., Blanchet-Tournier M. F. and Concordet J. P. (2006). Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCFbetaTrCP. *Mol. Cell Biol.* **26**, 4316-4326.

Theurkauf, W. E. and Vallee R. B. (1982). Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. *J.Biol. Chem*. **257**, 3284-3290.

Tiecke, E., Turner R., Sanz-Ezquerro J. J., Warner A. and Tickle C. (2007). Manipulations of PKA in chick limb development reveal roles in digit patterning including a positive role in Sonic Hedgehog signaling. *Dev.Biol.* 305, 312-324.

Tolkovsky, A. M. and Levitzki A. (1978). Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes. *Biochemistry* **17**, 3795.

Tran, P. V., Haycraft C. J., Besschetnova T. Y., Turbe-Doan A., Stottmann R. W., Herron B. J., Chesebro A. L., Qiu H., Scherz P. J., Shah J. V. et al. (2008). THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat.Genet.* **40**, 403-410.

Trousse, F., Marti E., Gruss P., Torres M. and Bovolenta P. (2001). Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* **128**, 3927-3936.

Tukachinsky, H., Lopez L. V. and Salic A. (2010). A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *J.Cell Biol.* **191**, 415-428.

Tyler, K. M., Fridberg A., Toriello K. M., Olson C. L., Cieslak J. A., Hazlett T. L. and Engman D. M. (2009). Flagellar membrane localization via association with lipid rafts. *J.Cell Sci*. **122**, 859-866.

Ui, M. and Katada T. (1990). Bacterial toxins as probe for receptor-Gi coupling. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* **24**, 63-69.

Van den Heuvel, M. and Ingham P. W. (1996). Smoothened encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature* **382**, 547-551.

Varjosalo, M., Li S. P. and Taipale J. (2006). Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals. *Dev.Cell* **10**, 177-186.

Vilardaga, J. P., Agnati L. F., Fuxe K. and Ciruela F. (2010). G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J.Cell Sci*. **123**, 4215-4220.

Wang, B., Fallon J. F. and Beachy P. A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**, 423-434.

Wang, B. and Li Y. (2006a). Evidence for the direct involvement of {beta}TrCP in Gli3 protein processing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**, 33-38.

Wang, G., Wang B. and Jiang J. (1999). Protein kinase A antagonizes Hedgehog signaling by regulating both the activator and repressor forms of Cubitus interruptus. *Genes Dev.* **13**, 2828-2837.

Wang, H. Y., Tao J., Shumay E. and Malbon C. C. (2006b). G-Protein-coupled receptor-associated A-kinase anchoring proteins: AKAP79 and AKAP250 (gravin). *Eur.J.Cell Biol.* **85**, 643-650.

Wang, V. Y. and Zoghbi H. Y. (2001). Genetic regulation of cerebellar development. *Nat.Rev.Neurosci.* **2**, 484-491.

Wang, Y., Zhou Z., Walsh C. T. and McMahon A. P. (2009). Selective translocation of intracellular Smoothened to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**, 2623-2628.

Watkins, P. A., Moss J., Burns D. L., Hewlett E. L. and Vaughan M. (1984). Inhibition of bovine rod outer segment GTPase by Bordetella pertussis toxin. *J.Biol.Chem.* **259**, 1378-1381.

Wechsler-Reya, R. J. and Scott M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* **22**, 103-114.

Wen, X., Lai C. K., Evangelista M., Hongo J. A., de Sauvage F. J. and Scales S. J. (2010). Kinetics of hedgehog-dependent full-length Gli3 accumulation in primary cilia and subsequent degradation. *Mol.Cell Biol.* **30**, 1910-1922.

Wettschureck, N., Moers A. and Offermanns S. (2004). Mouse models to study G-protein-mediated signaling. *Pharmacol.Ther.* **101**, 75-89.

Wettschureck, N. and Offermanns S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* **85**, 1159-1204.

Wilson, C. W., Chen M. H. and Chuang P. T. (2009). Smoothened adopts multiple active and inactive conformations capable of trafficking to the primary cilium. *PLoS.One.* **4**, e5182

Wilson, C. W. and Chuang P. T. (2010). Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction. *Development* **137**, 2079-2094.

Witman, G. B. (1975). The site of in vivo assembly of flagellar microtubules. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **253**, 178-191.

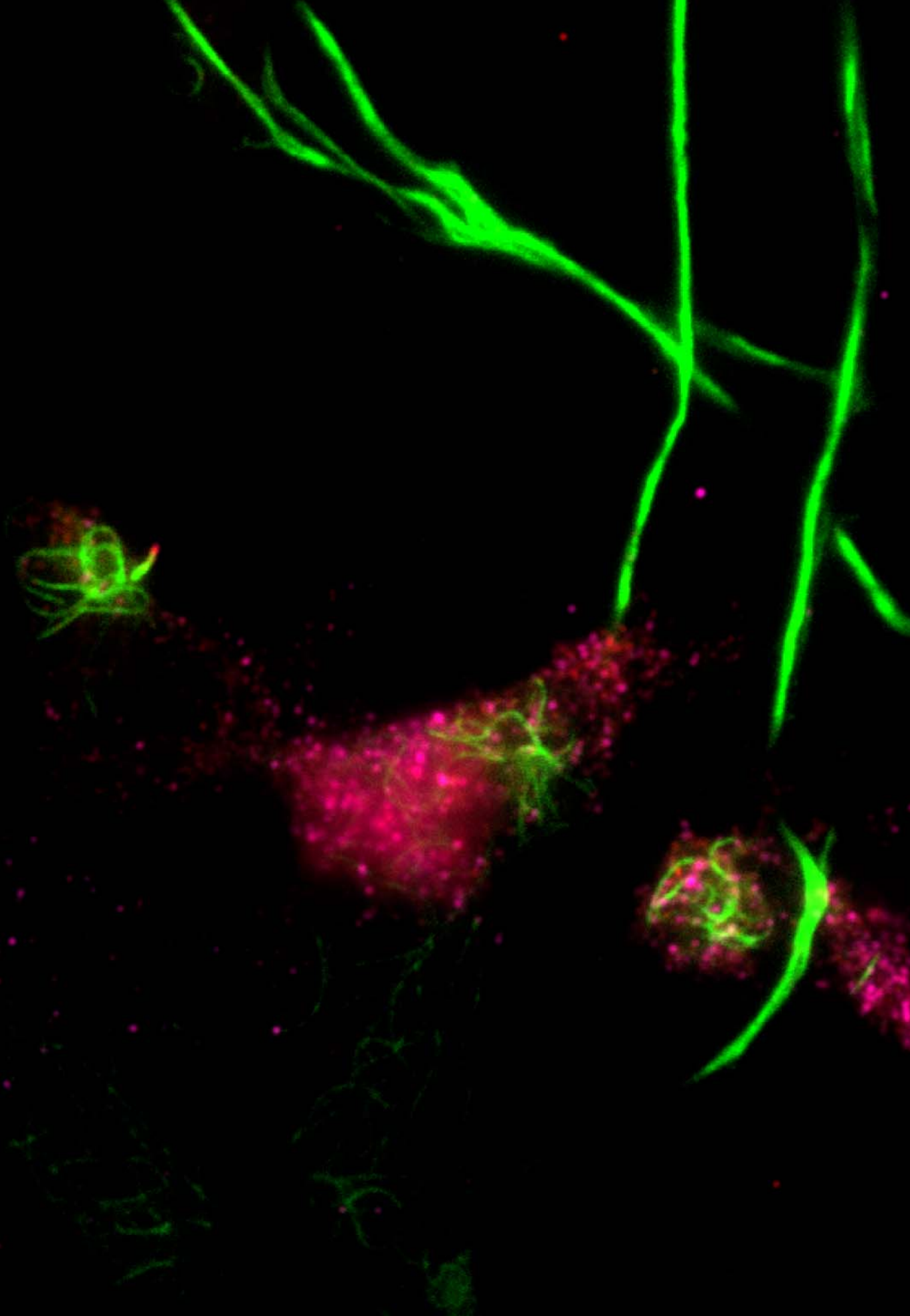
Wong, W. and Scott J. D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**, 959-970.

Yonemoto, W., McGlone M. L., Grant B. and Taylor S. S. (1997). Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in Escherichia coli. *Protein Eng* **10**, 915-925.

Zaccolo, M. and Pozzan T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* **295**, 1711-1715.

Zeng, X., Goetz J. A., Suber L. M., Scott W. J., Jr., Schreiner C. M. and Robbins D. J. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. Nature 411, 716-720.

Zhang, C., Williams E. H., Guo Y., Lum L. and Beachy P. A. (2004). Extensive phosphorylation of Smoothened in Hedgehog pathway activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 17900-17907.

Zhao, Y., Tong C. and Jiang J. (2007). Hedgehog regulates smoothened activity by inducing a conformational switch. *Nature* **450**, 252-258.

Zhu, A. J., Zheng L., Suyama K. and Scott M. P. (2003). Altered localization of *Drosophila* Smoothened protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes Dev*. **17**, 1240-1252.