



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Comportamiento de la Cadena Intermedia del Complejo Molecular
Dineina Citoplasmática mediado por el Factor Neurotrófico Derivado
del Cerebro (BDNF).

Tesinista:

Gabriel Cataldi

Firma:

Director:

Dr. Gustavo Pigino

Firma:

Lugar de trabajo: Instituto Ferreyra,
INIMEC-CONICET,
Universidad Nacional de Córdoba.

Comportamiento de la Cadena Intermedia del Complejo Molecular
Dineina Citoplasmática mediado por el Factor Neurotrófico Derivado
del Cerebro (BDNF).

Tribunal Examinador

Dra. Mariela Sánchez-Borzzone

Firma:

Dra. Andrea Cragolini

Firma:

Dra. Laura Vivas

Firma:

Calificación:.....

Fecha:.....

INDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCION	1
HIPÓTESIS Y RACIONAL	12
OBEJTIVO GENERAL Y ESPECIFICOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS	25
DISCUSION.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	52

RESUMEN

La unión de la neurotrofina BDNF a su receptor TrkB provoca una serie de eventos moleculares cruciales para la supervivencia neuronal. Estos eventos involucran la estimulación del receptor específico TrkB, y la consecuente activación de una cascada de señalización intracelular que resulta en la internalización de endosomas de membrana mediados por el complejo molecular dineína, y la activación del transporte axonal (TA) retrógrado de los mismos. La unión de BDNF al receptor TrkB induce la activación enzimática de miembros de la familia de proteínas tirosina quinasa Src. Src promueve la activación aguas abajo de la proteína quinasa C (PKC), la cual resulta en la fosforilación de la cadena intermedia del complejo motor dineína, y la concomitante activación del TA retrógrado de organelas de membrana. Nuestro trabajo experimental fue diseñado para determinar los posibles eventos moleculares que expliquen la activación del transporte retrógrado inducido por BDNF. Diferentes protocolos de fijación celular nos permitieron determinar, que la cadena intermedia del complejo motor dineína (DIC) cambia de distribución subcelular cuando las neuronas son estimuladas con BDNF. Este cambio en distribución subcelular fue también evidenciado por técnicas bioquímicas. Protocolos farmacológicos en combinación con técnicas bioquímicas determinaron que la estimulación del TA retrógrado, estaría mediado por la activación de diferentes proteínas quinasa y la asociación de DIC a los endosomas de señalización los cuales son transportados retrógradamente desde los terminales presinápticos al cuerpo celular.

TABLA DE ABREVIATURAS

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro	MEM: Medio esencial mínimo
CK1: Caseína Quinasa 1	NGF: Factor de crecimiento neural
CK2: Caseína Quinasa 2	NT-3 y NT-4: Neurotrofina 3 y Neurotrofina 4
DHC: Cadena Pesada de Dineina	PBS: Buffer fosfato salino
DIC: Cadena Intermedia de Dineina	PFS: Paraformaldehido Sucrosa
DLC: Cadena Liviana de Dineina	PKC: Proteína Quinasa C
DLIC: Cadena Liviana Intermedia de Dineina	ROI: Región de interés
EA: Enfermedad de Alzheimer	RPTK: Proteínas receptoras tirosina quinasa
EH: Enfermedad de Huntington	SFB: Suero fetal bovino
EP: Enfermedad de Parkinson	SDS: dodecil sulfato de sodio
EPr: Enfermedades Priónicas	SH: Suero de caballo
Fyn: Proteína tirosina quinasa proto- oncogénica Fyn	SFKs: Quinasas de la familia de las Proteína tirosina quinasa proto-oncogénica Src
GSK3 β : Quinasa Sintetizadora de Glucógeno	Src: Proteína tirosina quinasa proto-oncogénica Src
HB: Buffer de Homogenización	TA: Transporte axonal
JNK3: Proteína Amigo Terminal c-Jun 3	TBS: Tris Buffer Salino
KHC: Cadena Pesada de kinesina	TIRF: Fluorescencia de reflexión interna total
KLC: Cadena Liviana de Kinesina	Trk: Receptor tirosina quinasa
LANR: Receptor de Neurotrofinas de Baja Afinidad	
Lyn: Proteina tirosina quinasa proto- oncogénica Lyn	

INTRODUCCION

Las neurotrofinas son una familia de proteínas vitales para el desarrollo, funcionamiento y supervivencia neuronal (Hefti 1997, Binder and Scharfman 2004). El factor de crecimiento neural (NGF, por Nerve growth factor en inglés) fue la primera neurotrofina identificada. La misma se descubrió en la década de los cincuenta debido a sus efectos tróficos, es decir, que promueve el crecimiento y la supervivencia de neuronas sensoriales y simpáticas (Levi-Montalcini and Hamburger 1951).

En 1982, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF por Brain-derived neurotrophic factor en inglés), segundo miembro de la familia de neurotrofinas, fue descubierto por promover la supervivencia de una sub-población de neuronas del ganglio dorsal, y subsecuentemente fue aislado de cerebro de cerdo (Barde, Edgar et al. 1982). Luego, otras neurotrofinas fueron descubiertas como NT-3 y NT-4/5 (Hallbook, Ibanez et al. 1991, Ibanez et al. 199), cada una de ellas con un perfil diferente respecto al efecto trófico sobre una sub-población de neuronas del sistema nervioso central y periférico.

Las neurotrofinas son sintetizadas en el soma como pre-pro-neurotrofinas (pre-proBDNF, pre-proNGF, etc.). Una vez que estos precursores son clivados, se convierten en pro-neurotrofinas (proBDNF, proNGF, etc.), las cuales son clivadas nuevamente para obtener la neurotrofina madura (BDNF, NGF, etc.).

Las neurotrofinas maduras son normalmente liberadas desde la membrana post sináptica hacia el espacio peri-sináptico, donde posteriormente encontraran su receptor en la membrana pre-sináptica de la célula receptora. Dichas neurotrofinas, son los ligandos de las proteínas receptoras tirosina quinasa (RPTK). Estos receptores son proteínas de transmembrana que, a diferencia de los receptores acoplados a proteínas G, atraviesan la membrana una sola vez. Se activan por unión de sus ligandos específicos y transducen las señales extracelulares al citoplasma. La unión del ligando al receptor activa su dominio quinasa que agrega grupos fosfato a los residuos de tirosina propios y a los de otras proteínas tirosina quinasas no receptoras asociadas como las proteínas tirosina quinasa Src, Fyn, Lyn, etc.

Los RPTKs regulan procesos celulares tales como proliferación, diferenciación, migración celular, cambios metabólicos y apoptosis, también juegan un rol clave en diversos procesos patológicos como el cáncer y la arterioesclerosis (Taleisnik

2006). Asimismo, su activación se ve alterada en patologías como la enfermedad de Parkinson, las enfermedades priónicas y la enfermedad de Alzheimer.

Cada neurotrofina se une y activa un receptor tirosina quinasa específico. Hay dos clases de receptores de neurotrofinas: el receptor p75, también conocido como receptor de neurotrofinas de baja afinidad (LANR), común a todos los miembros de las neurotrofinas, y los receptores de alta afinidad que incluye a los receptores proteína quinasa TrkA, TrkB y TrkC. TrkA es el receptor de NGF, TrkB es el receptor de BDNF y NT-4, y TrkC es el receptor de NT-3, aunque NT-3 puede unirse también a los otros receptores Trk aunque con menor afinidad que a TrkC.

El receptor p75 pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. Une a las neurotrofinas pero no tiene el dominio citoplasmático de quinasa. Su papel es controvertido, puede disminuir la respuesta a neurotrofinas, puede aumentar la afinidad de los receptores Trk por sus respectivas neurotrofinas, y puede unirse a las neurotrofinas y prevenir su unión a los receptores de alta afinidad (Taleisnik 2006). Dicha descripción se ilustra en la **Figura 1**.

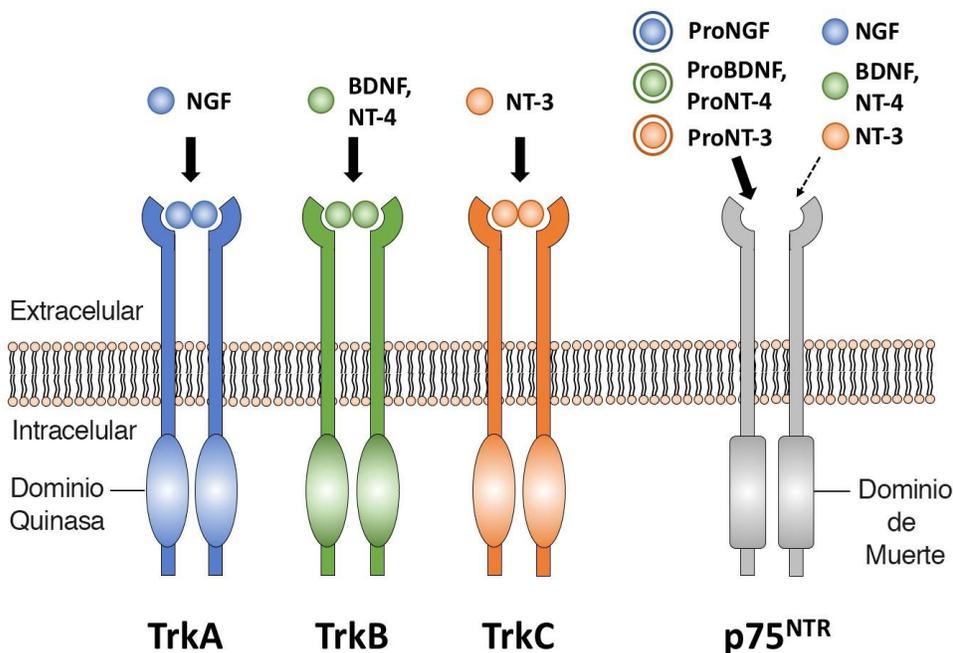


Figura 1. Receptores específicos de la familia de las neurotrofinas. NGF es ligando de TrkA, BDNF y NT-4 son ligandos del TrkB, y NT-3 es ligando de TrkC. Las pro-neurotrofinas (Pro-NGF, Pro-BDNF y Pro-NT-3 y 4) y las neurotrofinas también son ligandos de p75 (Extraído y modificado de la Tesis Doctoral del Dr. Minsu Kang).

Vías de señalización del BDNF

Al unirse las neurotrofinas a sus receptores, los receptores Trk se transfosforilan en varios residuos de tirosina (Tyr705, Tyr706 y Tyr707 en el caso de TrkB) y también alrededor del dominio quinasa (Tyr515 y Tyr816) mediando así su activación. Los receptores Trk activos tienen cascadas de señalización aguas abajo similares, aunque existen diferencias en el grado de activación de vías de señalización específicas dependiendo del tipo de célula neuronal y del tipo de neurotrofina dominante.

La fosforilación de diferentes residuos de tirosina en los receptores Trk conduce a la activación de diferentes vías. Por ejemplo, la fosforilación de Tyr515 en TrkB, que se encuentra justo fuera del dominio quinasa en el extremo N-terminal, recluta Shc (Proteína que contiene homología a Src) que actúa como una proteína adaptadora para el complejo de proteínas Grb2-Sos. Sos es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que promueve el intercambio de difosfato de guanosina (GDP) a trifosfato de guanosina (GTP) y activa una proteína pequeña, la proteína GTPasa Ras, esto lleva a la activación de la vía Ras-Raf-MEK6-ERK7, así como a PI3K8 -PDK19 -Akt10.

Por otro lado, la fosforilación de Tyr816 en el receptor TrkB, que se encuentra adyacente al dominio quinasa en el extremo C-terminal, induce el reclutamiento de la fosfolipasa C gamma, lo que lleva a la activación posterior de la vía PLCY-IP3-CAMKy PLCg-DAG-PKC (Duman and Voleti 2012). Las proteínas tirosina quinasa proto-oncogénicas de la familia de Src (SFK), que son quinasas que no se activan por receptores tirosina quinasas, también se activan con la unión del ligando BDNF al receptor TrkB.

Curiosamente, las SFK activas también pueden fosforilar y activar los receptores TrkB, lo que sugiere la existencia de una regulación mutua entre las SFK y TrkB (Huang and McNamara 2010, Boltaev, Meyer et al. 2017) (Ver **Figura 2**).

La activación de varias cascadas de señalización, promueven la supervivencia y el crecimiento de las neuronas, así como la plasticidad sináptica. Algunos de estos efectos están mediados localmente por la interacción directa e indirecta entre los receptores Trk y los canales iónicos en la sinapsis (Balkowiec, Kunze et al. 2000, Takasu, Dalva et al. 2002, Nagano, Yanagawa et al. 2003). Otros efectos son mediados por la activación de la transcripción de genes que promueven la supervivencia en el núcleo celular a través de la activación de factores de transcripción como la proteína que se une a cAMP (CREB) (Cunha, Brambilla et al. 2010, Duman and Voleti 2012, and Enomoto 2016)

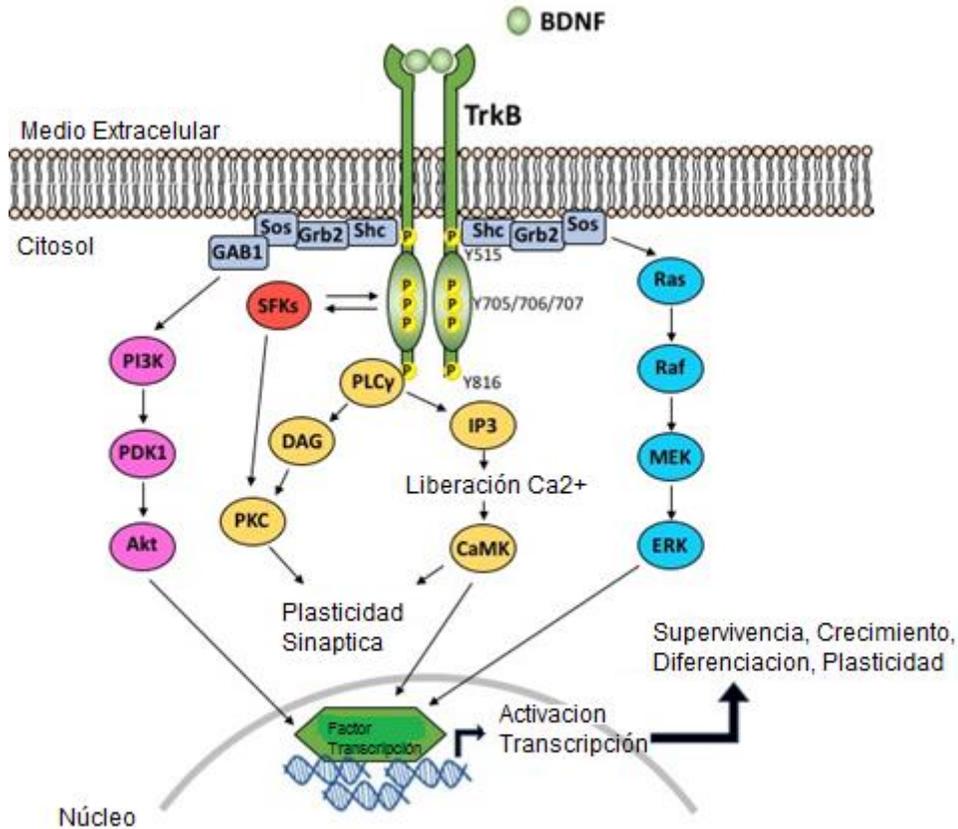


Figura 2. Cascada de señalización luego de la unión de BDNF al receptor TrkB. Tras la unión de BDNF, los receptores TrkB se autofosforilan en los residuos Tyr705 / 706/707 dentro de su dominio de quinasa, así como en Tyr515 y Tyr816 también. La fosforilación de estos residuos conduce a la activación de varias cascadas de señalización de quinasas que pueden incluir SFK (rojo), Ras-Raf-MEK-ERK (azul), PI3K-PKD1-Akt (rosa), PLC-IP3 / DAG-PKC / CaMK (amarillo). PKC y CaMK pueden fosforilar AMPA y Receptores de NMDA para modular sus funciones. Otras vías pueden activar la transcripción de genes pro-supervivencia por fosforilación de factores de transcripción tales como CREB. Extraído y Modificado de la Tesis Doctoral del Dr. Minsu Kang.

Luego de la activación de los receptores por parte de la neurotrofinas, el complejo receptor-neurotrofina es internalizado mediante endocitosis dependiente de clatrina (Zheng, Shen et al. 2008) o por pinocitosis independiente de clatrina (Shao, Akmentin et al. 2002, Valdez, Akmentin et al. 2005). Una vez endocitado, el complejo es transportado hacia el soma neuronal mediante el complejo motor dineina citoplasmática en una organela de membrana llamada

endosoma de señalización que contiene el complejo neurotrofina-receptor. El extremo N terminal del complejo queda de manera interna en el lumen de esta organela mientras que el extremo C terminal (quinasa) apunta hacia el citoplasma (Zweifel, Kuruvilla et al. 2005).

Uno de los efectos tróficos más estudiados de las neurotrofinas incluye la activación transcripcional que promueven la supervivencia neuronal. Para tal efecto se requiere que el receptor Trk este activado (unido a su neurotrofina específica) y que sea transportado a lo largo del axón de manera retrógrada, mediada por el complejo motor dineína citoplasmática, desde el terminal presináptico hasta el soma neuronal en donde se activará la transcripción de genes responsables de la supervivencia neuronal (Ye, Kuruvilla et al. 2003, Heerssen, Pazyra et al. 2004). Estas evidencias sugieren que un defecto en el transporte retrogrado de neurotrofinas podría resultar en una enfermedad neurodegenerativa causada por la falta de soporte trófico como resultado de una deficiencia en la transcripción de factores que promuevan la supervivencia neuronal.

Transporte axonal

¿Por qué es tan importante el transporte axonal para las neuronas? Para poder responder esa pregunta tendríamos que entender cuál es el tremendo desafío biológico que experimentan las neuronas con respecto a las restantes células del organismo. Los axones presentan una longitud que puede ser de 1.000 a 10.000 veces la longitud del cuerpo celular lo cual representa aproximadamente el 99% del volumen de una neurona, y en algunos casos puede tener hasta 1m de longitud (ej., neuronas motoras). Una característica distintiva es que el compartimiento axonal carece de la maquinaria necesaria para sintetizar proteínas de manera efectiva, por ende todas o al menos más del 99 % de las proteínas se sintetizan en el cuerpo celular, se empaquetan en una vesícula de membrana, se asocian a un motor molecular y son transportadas tanto a los axones como a las dendritas (Morfini 2006). Este suministro es mantenido a lo largo de toda la vida de las neuronas para proveer materiales estructurales, funcionales y regulatorios a dichos sub-dominios, incluyendo a los terminales sinápticos. Otra característica única de las neuronas es la extrema polaridad funcional y estructural del compartimiento axonal. El axón presenta un citoesqueleto de microtúbulos que posee una polaridad uniforme, con sus extremos menos (-) localizados próximos al núcleo, y los extremos más (+) que se disponen hacia el terminal presináptico. Esta polaridad estructural le permite al

motor molecular kinesina-1 movilizarse únicamente en sentido anterógrado, desde el cuerpo celular al terminal axonal presináptico, y al motor dineína citoplasmática movilizarse en sentido retrogrado desde la sinapsis al cuerpo neuronal.

Las tres características únicas de los axones: falta de expresión efectiva de proteínas, su extendida longitud, y la extrema polaridad estructural y funcional, juegan un rol clave en la unidireccionalidad del flujo de información, desde el compartimiento somatodendrítico al terminal axonal presináptico. Sin embargo estas propiedades por otro lado deja a las neuronas extremadamente dependientes del sistema de transporte axonal. Esto sugiere que una falla en el sistema de transporte axonal podría causar defectos tanto estructurales como funcionales potencialmente letal para las neuronas. Evidencias genéticas determinaron que mutaciones puntuales tanto en kinesina-1 como dineína citoplasmática inducen enfermedades neurodegenerativas como la paraplejía espástica y la enfermedad de neuronas motoras (Reid, Kloos et al. 2002, Hafezparast, Klocke et al. 2003). Estos datos genéticos claramente sugieren que defectos funcionales en motores moleculares, tanto anterógrado como retrógrado responsables del transporte axonal rápido resultan en enfermedades neurodegenerativas progresivas.

Motores moleculares encargados del transporte axonal: Kinesina-1 y Dineína

De acuerdo con las velocidades de transporte existen dos variantes del TA, el TA rápido que involucra el transporte de organelas de membrana y proteínas asociadas que se mueven a una velocidad de 200-400 mm/día, y el TA lento que transporta proteínas solubles y de citoesqueleto que se mueve a una velocidad de 1-2 mm/día. Interesantemente, los motores moleculares que median ambas variantes del TA son los mismos, lo que determina que el TA sea lento o rápido es el mayor tiempo de permanencia estática que experimentan los motores cuando movilizan cargos correspondientes al TA lento. El TA anterógrado es llevado a cabo por una familia de motores, siendo el motor molecular kinesina-1 el principal motor anterógrado, mientras que el TA retrógrado es llevado a cabo por el complejo molecular dineína citoplasmática (Hirokawa and Takemura 2005, Morfini 2005).

Kinesina-1 (Ver **Figura 3**) es el miembro más abundante, y mejor caracterizado de la superfamilia de kinesinas en neuronas maduras (Wagner, Pfister et al. 1991), y es la responsable del TA anterógrado de una gran variedad de organelas de membrana como mitocondrias, y vesículas sinápticas, como también de

proteínas del citoplasma y precursores de vesículas sinápticas (Leopold, McDowall et al. 1992).

Kinesina-1 es una mecanoenzima compuesta por un heterotetrámero de dos cadenas pesadas denominadas cadenas pesadas de la kinesina (KHCs), y dos cadenas livianas denominadas cadenas livianas de la kinesina (KLCs) (DeBoer, You et al. 2008). La KHC (En azul y gris, **Figura 3**) tiene dos funciones principales, una función enzimática que comprende la hidrólisis de ATP que induce un cambio conformacional del complejo motor haciendo que el mismo se desplace, y una función no enzimática que le permite asociarse a microtúbulos, asociación que le permite a estos motores moleculares desplazarse a lo largo de toda la célula mediante la hidrólisis regulada de ATP (Wagner, Pfister et al. 1991). Las KLCs (En verde, **Figura 3**) contienen dominios repetitivos en tándem que juegan un rol importante en la unión del motor a las membranas de los cargos específicos a ser transportados por el complejo motor kinesina-1 (Stenoien and Brady 1997).

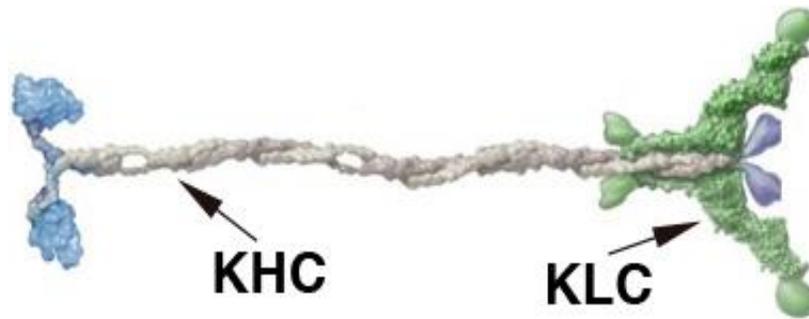


Figura 3. Esquema que representa al motor molecular Kinesina-1. Extraído y modificado de R. D. Vale 2003(Vale 2003). Referencias: KHC: Kinesin Heavy Chain (Cadena Pesada de Kinesina) y KLC: Kinesin Light Chain (Cadena Liviana de la Kinesina).

Por otro lado, el complejo motor Dineina citoplasmática (**Figura 4**), está conformada por dos cadenas pesadas, denominadas cadenas pesadas de la dineina (DHCs), y múltiples otras subunidades: cadenas Intermedias de la dineina (DICs), cadenas livianas de la dineina (DLCs) y cadenas intermedias livianas de la dineina (DLICs), entre otras proteínas accesorias (Hirokawa, Niwa et al. 2010). Los roles de cada una de las subunidades son parcialmente conocidos, con excepción de la DHC y de la DIC. La DHC es responsable de la hidrólisis de ATP y de la unión a microtúbulos (Carter 2013), y la subunidad DIC media la interacción

entre el complejo motor dineina y los cargos específicos a ser transportados (Vaughan, Leszyk et al. 2001, Pfister and Wolf 2015).

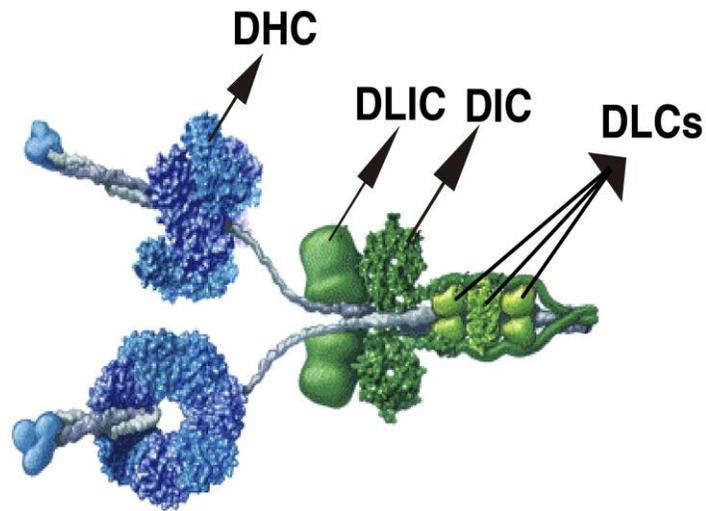


Figura 4. Esquema que representa al motor molecular dineina citoplasmática. Extraído y modificado de Vale (2003). Referencias: DHC: Dynein Heavy Chain (Cadena Pesada de Dineina); DLIC: Dynein Light Intermediate Chain (Cadena Liviana Intermedia de Dineina); DIC: Dynein Intermediate Chain (Cadena Intermedia de Dineina) y DLCs: Dynein Light Chains (Cadenas Livianas de Dineina).

Mecanismos Regulatorios del Transporte Axonal: La actividad enzimática como reguladora del TA

Debido a que la mayoría de los componentes presentes en un axón no se sintetizan en él, existe una necesidad de transportar dichos componentes desde el soma neuronal donde son sintetizados hacia los distintos compartimientos del axón. Esto implica la existencia de un mecanismo que regule dicho transporte. Por ejemplo, las vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores deben ser ensambladas en el cuerpo celular y transportadas hacia el terminal presináptico, mientras que vesículas portadoras de canales de sodio deben ser transportadas hacia los nodos de Ranvier (Morfini, Szebenyi et al. 2001, DeBoer, You et al. 2008) en neuronas con axones mielinizados. Como nos podemos imaginar, este complejo transporte vesicular debe ser altamente regulado tanto en el espacio como en el tiempo, por un sistema sensible a las necesidades funcionales de las

diferentes neuronas que componen el sistema nervioso. Décadas de investigación han demostrado que las neuronas dependen en gran medida de mecanismos de señalización intracelular dependientes de fosfotransferasas, que aportan orden y coordinación espacio-temporal para la regulación de muchos procesos axonales, incluidos el TA (Morfini, Szebenyi et al. 2001). Información previa de nuestro laboratorio y de otros grupos indica que la fosforilación de aminoácidos específicos en motores moleculares representa un mecanismo muy eficiente de regulación del TA in vivo (Hollenbeck 1990, Morfini, Szebenyi et al. 2001, Donelan, Morfini et al. 2002, Morfini, Szebenyi et al. 2002, Morfini, Szebenyi et al. 2004). El descubrimiento que los motores moleculares kinesina-1 se fosforilan in vivo, sugirió la posibilidad de que tal vez eventos de fosforilación/desfosforilación podría regular el envío de organelas de membrana en neuronas (Morfini, Szebenyi et al. 2001, Morfini, Szebenyi et al. 2002, Morfini, Szebenyi et al. 2004). El desafío es determinar cuáles actividades quinasas y fosfatasa son relevantes para dicha regulación (Gibbs, Greensmith et al. 2015).

El sistema experimental ex vivo de axoplasma aislado de calamar de nuestro grupo de investigación representa tal vez el modelo más apropiado para estudiar estas vías regulatorias por diferentes razones, primero se puede evaluar el efecto de quinasas individuales sobre el TA en un segmento de axón aislado del cuerpo celular y de su sinapsis, por ende los resultados obtenidos no dependerían ni de la actividad sináptica (por ejemplo bloqueo o activación sináptica, etc.), ni de la actividad nuclear (por ejemplo alteración en la síntesis diferencial de proteínas, etc.) y segundo, se puede evaluar el rol de quinasas específicas sobre el TA agregando dichas quinasas de manera directa en concentraciones específicas. Por otro lado, se puede agregar inhibidores tanto farmacológicos como peptídicos también a concentraciones específicas para evaluar si las quinasas estudiadas regulan el transporte de manera enzimática o alostérica en tiempo real. Este modelo fue instrumental tanto para el descubrimiento de kinesina-1, como para determinar un número importante de proteínas quinasas responsable de la regulación del TA rápido (Brady et al, 1990; Morfini et al., 2009; Morfini et al., 2009; Morfini et al., 2001).

Sabemos que el TA posee diversos niveles de regulación, pero quizás el más estudiado hasta la fecha sea el mecanismo regulatorio ejercido por actividades enzimáticas denominadas fosfotransferasas, las cuales incluyen tanto a proteínas serina/treonina/tirosina quinasas, como a proteínas fosfatasa (**Figura 5**) (Gibbs, Greensmith et al. 2015, Brady and Morfini 2017). Estas fosfotransferasas pueden regular las distintas funciones de los motores moleculares como su asociación a microtúbulos, la actividad ATPasa o la asociación con las membranas a ser transportadas (Gibbs, Greensmith et al. 2015, Brady and Morfini 2017). Sea por

fosforilación directa o indirecta de residuos aminoacídicos específicos en cada proteína motora, al momento se han determinado diferentes quinasas que pueden modificar actividades no enzimáticas de kinesina-1. Por ejemplo GSK3 β inhibe selectiva y específicamente el TA anterógrado mediado por kinesina-1, pero no el TA retrógrado mediado por dineína citoplasmática (Morfini, 2002). Experimentos bioquímicos posteriores determinaron que GSK3 β fosforila a las cadenas livianas de kinesina-1 (KLCs) induciendo la liberación del cargo transportado y de esta manera inhibiendo el TA anterógrado. Interesantemente, otra quinasa que ejerce un efecto inhibitorio similar es CK2 (Zamponi, Buratti et al. 2017). La principal diferencia es que CK2 inhibe ambas direcciones del TA, tanto anterógrado como retrógrado. Sin embargo, experimentos bioquímicos determinaron que al igual que GSK3 β , CK2 fosforila a las cadenas livianas de kinesina-1 (KLCs), en diferentes sitios a los fosforilados por GSK3 β , y dicho evento induce la liberación de kinesina-1 de la vesícula transportada (Morfini, Szebenyi et al. 2002, Zamponi, Buratti et al. 2017). Otra proteína quinasa axonal y neurona específica que puede regular el transporte axonal es la quinasa JNK3 (del inglés c-Jun amino terminal kinase 3), esta quinasa fosforila a las cadenas pesadas de kinesina-1 en el sitio de unión a microtúbulos e induce una reducción de la asociación de kinesina-1 a los mismos y de esta manera es afectando el TA anterógrado de organelas de membrana (Morfini, Burns et al. 2009, Morfini, You et al. 2009).

Resultados previos de nuestro laboratorio han determinado que la activación del transporte axonal retrógrado normal inducida por el factor trófico BDNF, luego de su unión al receptor específico TrkB, involucra la activación de al menos dos proteínas tirosina quinasa proto-oncogénicas de la familia de Src incluidas Src y Fyn, las cuales median la activación de la proteína quinasa C (PKC). PKC fosforila a las cadenas intermedias del complejo motor dineína activando el complejo motor dineína y por lo tanto la activación del TA retrógrado (manuscrito en Materiales y métodos).

La lista de quinasas que regulan el transporte axonal rápido está en una fase crecimiento exponencial. Para un conocimiento más amplio de proteínas quinasas que posean actividad regulatoria sobre el TA rápido, dirigimos la atención de los lectores a los artículos publicados por los Dres. Scott Brady, Gerardo Morfini, Gustavo Pigino, Giampietro Schiavo y sus grupos de trabajo.

(Morfini, Burns et al. 2009, Pigino, Morfini et al. 2009, Gibbs, Greensmith et al. 2015, Brady and Morfini 2017, Zamponi, Buratti et al. 2017).

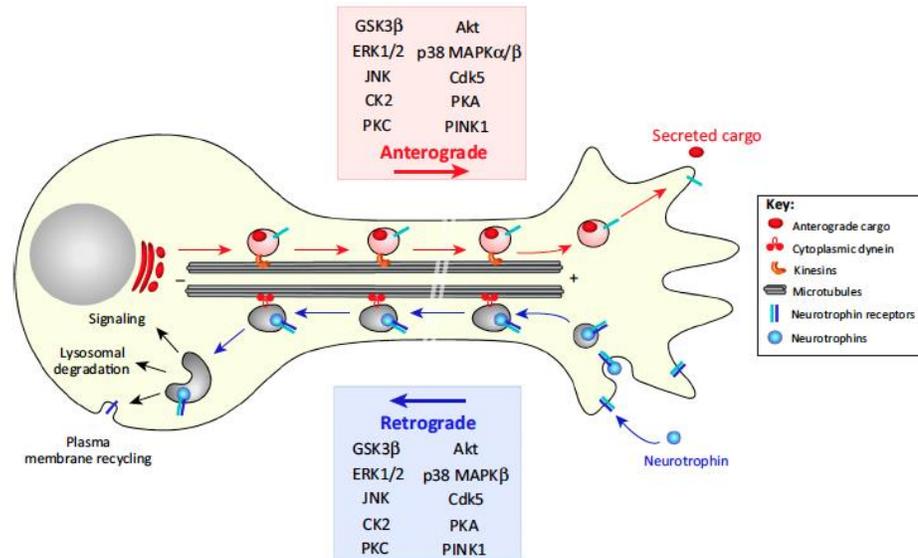


Figure 5. Regulación del TA por fosfotransferasas. Extraído y modificado de Katherine L. Gibbs et al 2015. (Gibbs, Greensmith et al. 2015)

Transporte retrógrado de BDNF en enfermedades neurodegenerativas

Evidencias experimentales en las últimas dos décadas han demostrado que la neurotrofina derivada del cerebro BDNF y su vía de señalización son responsables y promueven el desarrollo, la supervivencia y la función apropiada de las neuronas que pueden responder a dicho factor trófico (Capsoni, Ugolini et al. 2000, Zuccato and Cattaneo 2009). Deficiencias en vías de señalización asociadas a factores tróficos han sido descritas en numerosas enfermedades neurodegenerativas progresivas incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA) (Phillips, Hains et al. 1991), la enfermedad de Parkinson (EP) (Murer, Yan et al. 2001), la enfermedad de Huntington (EH) (Ferrer, Goutan et al. 2000). De una manera similar, defectos o alteraciones en el transporte de BDNF representa un evento temprano en la enfermedad de Alzheimer (Schindowski, Belarbi et al. 2008, Ye, Tai et al. 2012). Interesantemente, evidencias experimentales han determinado que la proteína patológica beta amiloide asociada a la EA es capaz

de inhibir el transporte retrógrado de BDNF (Poon, Blurton-Jones et al. 2009). De una manera similar, la proteína patogénica alfa sinucleína induce una deficiencia en el transporte de BDNF y reduce también por añadidura su vía de señalización (Fang, Yang et al. 2017). Estas evidencias claramente sugieren que tanto el transporte de BDNF como sus vías de señalización juegan un rol crucial en el desarrollo de la EA y la EP (Siegel and Chauhan 2000) lo cual nos permite inferir que el entendimiento de los eventos moleculares que llevan al defecto en el transporte de BDNF puede contribuir a la hora de desarrollar estrategias terapéuticas para enfermedades asociadas a defectos en transporte de factores tróficos.

HIPÓTESIS Y RACIONAL

Las evidencias experimentales que ligan la supervivencia neuronal a la señalización por parte de neurotrofinas sumado al hecho que la falta de señalización neurotrófica conlleva a neurodegeneración, instó a los investigadores a proponer la utilización de las neurotrofinas como posibles agentes terapéuticos. Desafortunadamente, la utilización de las mismas no solo no fueron eficientes para enlentecer o frenar el progreso de las enfermedades neurodegenerativas, las neurotrofinas causaron efectos secundarios serios en un número significativo de ensayos clínicos (Thoenen and Sendtner 2002). Estas evidencias sugieren que todavía se requiere un conocimiento más amplio del funcionamiento como de las vías de señalización asociadas a las diferentes neurotrofinas, tanto en condiciones normales como bajo contextos patológicos. Uno de los aspectos moleculares que todavía no entendemos de las vías de señalización asociadas a neurotrofinas, es la regulación del transporte retrógrado de los endosomas de señalización conteniendo receptores activos de neurotrofinas específicos responsables en última instancia de la transcripción de factores de supervivencia neuronales. Aunque se conocen numerosos eventos moleculares sobre las vías de señalización cascadas abajo de la mayoría de los receptores de neurotrofinas, todavía no conocemos en detalle los eventos moleculares asociados a la activación del transporte retrógrado de los endosomas de señalización luego de la activación de los receptores de membrana por parte de las diferentes neurotrofinas, en particular de la neurotrofina BDNF y su receptor específico Trk B.

Basados en la evidencia molecular sobre la regulación del TA que involucra a la fosforilación de los diferentes motores moleculares responsables del TA, y las evidencias experimentales de nuestro laboratorio hipotetizamos que la activación del TA retrógrado de los endosomas de señalización portadores del receptor TrkB y su

neurotrofina BDNF involucran la fosforilación del motor molecular dineina citoplásmica. De las distintas subunidades del complejo motor dineina, nos focalizamos en la cadena intermedia puesto que evidencias experimentales demostraron que una función de dicha subunidad es asociarse con las organelas de membrana y por otro lado las DIC se fosforilan diferencialmente in vivo (Dillman and Pfister 1994). Datos preliminares de nuestro laboratorio muestran que las DIC se fosforilan cuando neuronas corticales primarias de embriones de ratas en cultivo por 3 días son estimuladas con BDNF (Manuscrito en Materiales y Métodos) luego de una estimulación. Basados en datos preliminares de nuestro grupo de trabajo, y en mecanismos de regulación del TA retrógrado mediados por eventos de fosforilación sobre motores moleculares previamente identificados, proponemos la siguiente hipótesis de trabajo:

“El factor trófico BDNF induce la asociación de la cadena intermedia de la proteína Dineina Citoplásmica a los endosomas de membranas a ser transportados, promoviendo así la activación del TA retrógrado de los mismos”

OBEJTIVO GENERAL Y ESPECIFICOS

El objetivo a largo plazo del laboratorio es entender el mecanismo molecular de activación del transporte axonal retrógrado en condiciones normales y patológicas. En esta tesina pretendemos entender cuál es el rol que cumple la cadena intermedia del complejo motor dineína citoplasmática durante la activación del transporte axonal retrógrado mediado por el factor neurotrófico derivado de cerebro. Datos previos sugieren que DIC es responsable de la unión del motor al cargo para ser transportado. Datos de nuestro laboratorio han determinado que el motor dineína es regulado por eventos postranscripcionales, siendo la fosforilación de DIC inducida por factores tróficos uno de los eventos más relevantes para la activación del complejo motor y por consiguiente de la activación del TA retrógrado. Basados en datos experimentales previos y nuestros datos preliminares proponemos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo Específico 1

Determinar el método de fijación más eficiente para preservar la integridad de la asociación de la cadena intermedia de dineína citoplasmática a sus cargos específicos.

Objetivo Específico 2

Evaluar la distribución subcelular de la cadena intermedia del motor dineína bajo un protocolo fisiológico normal de activación del transporte axonal retrógrado.

Objetivo Específico 3

Cuantificar el grado de asociación de la cadena intermedia del motor dineína luego de la activación fisiológica normal del transporte axonal retrógrado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental Objetivo 1

Con el objetivo de determinar un método de fijación eficiente para preservar la integridad de la DIC, células HEK y neuronas primarias corticales fueron expuestas a dos protocolos de fijación celular: fijación con Metanol y fijación con Paraformaldehido Sucrosa (PFS). Dichos protocolos se detallan a continuación, en Metodología General.

Una vez finalizado el proceso de fijación se procedió a inmunomarcarse la DIC siguiendo el protocolo de Inmunocitoquímica (Procedimientos de Inmunomarcación en Metodología General).

Posteriormente se observaron las muestras mediante Microscopía Confocal, se tomaron fotografías y se analizaron las mismas.

Diseño Experimental Objetivo 2

Para llevar a cabo el Objetivo 2, células HEK y neuronas primarias corticales e hipocámpales fueron expuestas a 10 ng/ml BDNF durante 10 minutos, bajo un protocolo fisiológico normal de activación de transporte axonal retrogrado.

Previamente a la incubación con BDNF, células HEK, pertenecientes a otros tratamientos, fueron expuestas 30 minutos a diferentes inhibidores: k252a; su6656 y un péptido sustrato de PKD1.

Luego las células fueron fijadas con Metanol y posteriormente sometidas a un protocolo de Inmunocitoquímica. En el caso de las células HEK, se realizó una inmunomarca simple (sólo se marcó DIC), mientras que en neuronas, se realizó una doble marcación (se marcó DIC y Tubulina). Para ello, se contó con los anticuerpos específicos, mencionados a continuación en Lista de Anticuerpos Primarios y Lista de Anticuerpos Secundarios.

Posteriormente las células fueron fotografiadas por Microscopía Confocal TIRF según el protocolo de Sistema de Adquisición de imágenes y analizadas según el protocolo de Sistema de Procesamiento de imágenes. Ambos protocolos se encuentran en Metodología general, a continuación.

Diseño Experimental Objetivo 3

Para cuantificar el grado de asociación de la cadena intermedia del moto dineina a sus cargos específicos, se purificaron sinaptosomas según el protocolo de Preparación de Sinaptosomas, detallado en Metodología general.

Una vez los sinaptosomas fueron aislados, se procedió a aplicar los diferentes tratamientos: algunos con 10 ng/ml BDNF y otros fueron tratados con Buffer control, durante 10 minutos. Luego, se reventaron los sinaptosomas con buffer hiposmotico con el objetivo de liberar las vesículas y fracciones endosomales allí presentes. Dicho procedimiento se detalla en Preparación de Sinaptosomas y Estimulación con BDNF en Metodología General.

Finalmente, para cuantificar la asociación de la DIC a las fracciones endosomales, se realizó un Western Blot y posterior análisis en FIJI-Image J, de las bandas obtenidas.

Metodología General

Cultivo de líneas celulares

Como línea celular se utilizaron células HEK-293, que son células embrionarias humanas de riñón. Las células fueron siempre cultivadas por 4 días arribando a una confluencia del 70/80% en medio de cultivo MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% más antibióticos (penicilina y estreptomycin). Contamos también con un clon de células HEK-293 que sobreexpresan establemente el receptor Trk-B.

Seguimos todas las recomendaciones para el mantenimiento y congelamiento de células stocks según las recomendaciones de la compañía (ATCC, American topoe Culture Collection) que nos proveyó las células.

Cultivo primario de neuronas

Tanto el cultivo de neuronas piramidales de hipocampo como el de corteza, han sido considerados como excelentes sistemas experimentales in vitro, ya que poseen la capacidad de desarrollar y diferenciar axones y dendritas con características morfológicas y bioquímicas equivalentes a neuronas que se desarrollan in situ (Kaech and Banker 2006). El motivo por el cual estos cultivos son ampliamente utilizados, radica en que pueden ser cultivados a baja densidad,

lo cual permite en combinación con técnicas de videomicroscopía, caracterizar la secuencia de eventos por los cuales una célula nerviosa indiferenciada (neuroblasto apolar) se transforma en una célula polarizada con un procesos axonal y varios procesos dendríticos que se diferencian tanto estructural como funcionalmente.

La preparación y mantenimiento de cultivos primarios de corteza se llevó a cabo como los prepara el laboratorio del Dr. Banker (Kaech and Banker 2006) con algunas modificaciones. Para la realización del cultivo de neuronas de corteza se emplearon embriones de 18 días de gestación. Ratas preñadas fueron sacrificadas mediante eutanasia por inhalación de CO₂ y posteriormente se removieron los embriones y fueron colocados en cápsulas de Petri con solución buffer de fosfato estéril (Hanks, pH 7.2). Este paso fue realizado en una pieza de cultivo fuera de la mesa de flujo laminar. Los pasos siguientes fueron todos realizados dentro de una meza de flujo laminar en condiciones de estricta esterilidad. Primero se decapitaron los embriones y sus cabezas fueron colocadas en una cápsula de Petri conteniendo Hanks estéril. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se disecaron y separaron las cortezas. Debido al reducido tamaño de las muestras, esta parte de la disección se realizó bajo una lupa a un aumento de 20X iluminado por un dispositivo de fibras ópticas. Todo el material de microcirugía es de alta precisión y rigurosamente esterilizado por medio de calor seco (estufa a 270°C). Las cortezas una vez obtenidas fueron liberadas de sus meninges y fueron colocados en un tubo de 15 mililitros utilizando una pipeta Pasteur de vidrio. Luego fueron incubadas por 17 minutos a 37° C en una solución Hanks conteniendo tripsina a una concentración de 0.25% en un baño termostatzado. Luego, extrajimos la solución de tripsina y se efectuaron 3 lavados con Hanks durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Luego del último lavado, extrajimos el medio Hanks en su totalidad y le agregamos 5 ml de MEM con 10% de SFB. El tejido tripsinizado se disoció con suma precaución para no dañar las células, mediante una disgregación mecánica pipeteando para arriba y abajo con una pipeta Pasteur de vidrio de calibre estándar y luego con una pipeta de menor calibre. Ambas pipetas tienen los extremos pulidos al fuego. Las células disociadas fueron luego contadas y sembradas en cápsulas de Petri (350.000 por cápsula de 60mm de diámetro, de plástico y debidamente tratadas para cultivo celular) conteniendo discos de vidrio de 12mm de diámetro previamente incubadas con una solución de buffer borato conteniendo polilisina a una concentración de 0.3 mg/ml.

Las células fueron cultivadas en MEM más suero por 2-3 horas a 37° C y 5% de CO₂ en un incubador. Luego los vidrios conteniendo las células adheridas fueron transferidos a una cápsula de Petri conteniendo un medio químicamente definido (Neurobasal de Gibco) libre de suero.

Tratamiento en axoplasma aislado de calamar con inhibidores

Debido a las diferencias intrínsecas entre los diferentes calamares, dos axones "hermanos" deben ser diseccionados del mismo calamar, extruidos y colocados sobre los cubreobjetos de vidrio. Un axoplasma es perfundido con la mezcla de control de perfusión y sus axoplasmas "hermanos" con mezcla de perfusión experimental.

Los experimentos de marcaje metabólico requieren mezclas de perfusión que contengan trifosfato de adenosina radiomarcado con P32. Después de 50 minutos de incubación, los axoplasmas se lisan y se procesan para inmunotransferencia. Para los experimentos de estimulación con BDNF, una vez extraído y aislado el axoplasma de calamar, se lo coloca sobre un portaobjeto y allí es estimulado directamente con 10 ng/ml de BDNF durante 10 minutos. Además, otros tratamientos adicionan inhibidores peptídicos de isoformas de PKC como el su6976 y su6983. Gö6983 inhibe PKC α , PKC β , PKC γ , PKC δ y PKC ζ (IC50= 7nM, 7nM, 6nM, 10nM, 60nM, respectivamente medidos por ensayos de quinasas in vitro con 35 μ M de ATP), pero no inhiben a PKC μ también denominada PKD1 (IC50 > 20 μ M) ((Gschwendt, Dieterich et al. 1996). El inhibidor Gö6976 inhibe PKC α , PKC β y PKC μ /PKD1 (IC50= 2nM, 6nM, 20nM, respectivamente) (Martiny-Baron, Kazanietz et al. 1993, Gschwendt, Dieterich et al. 1996).

Estimulación de Neuronas Primarias y Células HEK con BDNF

Las neuronas primarias fueron cultivadas en un incubador a 37⁰ C y 5% de CO₂ durante 3 días y luego fueron incubadas con una solución conteniendo BDNF a una concentración final de 10ng/ml durante 10 minutos y las células control fueron incubadas con el vehículo utilizado para diluir el BDNF. Luego de las incubaciones, las neuronas primarias, tanto hipocampales como corticales, fueron fijadas mediante diferentes protocolos de fijación y luego se efectuaron las diferentes inmunomarcaciones de simple o doble marca utilizando diferentes anticuerpos primarios y secundarios.

Células HEK fueron cultivadas en un incubador a 37⁰ C y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 60% y luego fueron incubadas con una solución conteniendo BDNF a una concentración final de 10ng/ml durante 10 minutos y las células control fueron incubadas con el vehículo utilizado para diluir el BDNF. Según el experimento, algunas células fueron incubadas con BDNF más inhibidores de los receptores Trk (K252a) o inhibidores de la quinasa PKC μ /PKD1. Se encontró que el inhibidor de PKD1/PKC μ utilizado en el axoplasma aislado de calamar, Gö6976, también inhibe la actividad de la quinasa de TrkB en concentraciones nanomolares (Behrens et al. 1999). Esta inhibición, fuera del objetivo, hizo que Gö6976 no fuera adecuado para el uso en células de mamífero, aunque

aún se puede usar en axoplasmas de calamar aislados donde la membrana plasmática, que contiene TrkB, se elimina. En su lugar, utilizamos una pequeña molécula inhibidora de la PKD llamada CRT 0066101 (Harikumar et al. 2010; Ni et al. 2013), así como el péptido de sustrato PKD1 fusionado con la secuencia de la proteína VIH-TAT modificada. (GRKKRRQRRRPP) en el extremo N, lo que permite que el péptido atraviese la membrana plasmática (Green y Loewenstein 1988; Frankel y Pabo 1988).

Luego de las incubaciones, las células HEK-293 fueron fijadas mediante diferentes protocolos de fijación y luego se efectuaron las diferentes inmunomarcaciones de simple marca utilizando diferentes anticuerpos primarios y secundarios.

Procedimientos de Inmunomarcación

Se emplearon técnicas de inmunofluorescencia de simple o doble marca para la detección y localización cualitativa y cuantitativa de la proteína dineina cadena intermedia, para tubulina, filamentos de actina y núcleo celular.

Para un detallado estudio de la localización y distribución, así también de la cuantificación de dichas proteínas se emplearon dos procedimientos diferentes de fijación celular. Estos protocolos de fijación fueron desarrollados con la finalidad de mantener o preservar los epitopes reconocidos por el anticuerpo monoclonal desarrollado para detectar la cadena intermedia del complejo motor dineina citoplasmática.

Luego de los protocolos de fijación se lavaron los discos 3 veces con PBS a temperatura ambiente. Luego de la fijación con PFS (Paraformaldehído Sucrosa), se permeabilizaron las células con una solución de PBS (Buffer Fosfato Salino) conteniendo 0,2% de Triton X-100 durante 7 minutos. Las células que fueron fijadas con metanol no fueron permeabilizadas ya que el protocolo de fijación también permeabiliza las membranas celulares. Luego las células fueron incubadas durante una hora con una solución de albúmina al 5% en PBS a temperatura ambiente e inmediatamente después incubadas con los diferentes anticuerpos primarios. En algunos casos se marcaron los núcleos celulares utilizando una solución conteniendo DAPI ó (4',6-diamidino-2-fenilindol) que se une al ADN celular. También, se utilizó junto con los anticuerpos primarios una solución con faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Molecular Probes) para visualizar filamentos de actina (F-actina). Posteriormente, las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios respectivos conjugados con Alexa Fluor 488 o 568. Finalmente, las células fueron lavadas durante 5 minutos 3 veces con PBS y montadas con Fluorosave (Calbiochem).

Procedimientos de Fijación Celular

A) Fijación con Paraformaldehido Sucrosa: El PFS fue preparado con Paraformaldehido al 4% conteniendo 0.12 M sucrosa y pH 7.2, en una solución de buffer fosfato salino. Se fijo las células adheridas a los discos de vidrio por 30 minutos a temperatura ambiente.

B) Fijación con metanol: Esta fijación se realizó con Metanol puro (pureza para biología molecular) a una temperatura de -20°C por 10 minutos. Luego de los 10 minutos de fijación en freezer a -20°C se realizó un protocolo de rehidratación con metanol al 70% y 50% en agua. La hidratación se realiza a temperatura ambiente, 1 minuto por solución. Luego los discos fueron de vidrio con sus células adheridas son transferidas a cápsulas de Petri conteniendo buffer PBS a pH 7.2

Lista de Anticuerpos Primarios

- Clon DM 1A (mAb contra alfa tubulina, IgG de ratón, Sigma Chemical Co.) Dilución 1/1000
- Clon YL1/2 (mAb contra alfa tubulina tirosinada, IgB de rata, Sigma Chemical Co.) Dilución 1/1000
- Clon 74.1 (mAb contra la cadena intermedia de dineina citoplasmática, IgG de ratón, Santa Cruz Biotechnology). Dilución 1/50
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), marcador fluorescente azul (405 nM) Invitrogen Alexa Fluor 488.
- Faloidina Invitrogen Molecular Probes Alexa flúor 488 phalloidin. Dilución 1/1000

Lista de Anticuerpos Secundarios

- Anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado con Alexa flúor 488, Dilución 1/100, 1/200

- Anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado con Alexa flúor 568, Dilución 1/100, 1/200
- Anti-IgG de rata hecho en cabra conjugado con Alexa flúor 488 y 568, Dilución 1/100, 1/200
- Anti-IgG de ratón y de conejo IRDye 800CW y IRDye 680. LI-COR. Dilucion 1/500

Microscopia Confocal y Procesamiento Digital de Imágenes

Sistema de adquisición de Imágenes

El sistema de adquisición de imágenes está compuesto por un microscopio invertido confocal de disco giratorio Olympus DSU y un módulo para hacer microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) con una resolución espacial de 100-200nm que permite obtener imágenes de eventos moleculares en la superficie de célula tales como la relocalización de receptores tipo Trk y sus moléculas asociadas como el factor trófico derivado de cerebro BDNF y el motor molecular dineína. Poseemos objetivos infinitamente corregidos (10X, 40X, 63X, y 100X) filtros estándar para fluorescencia a 488 y 658nm. El sistema de adquisición de imágenes incluye videocámaras de alta resolución y sensibilidad para observaciones en campo claro y óptica DIC. Cámara (EMCCD) Andor iXona3 súper veloz con capacidad de 35 cuadros por segundo y altísima sensibilidad. También utilizamos un microscopio invertido Zeiss Axio Observer LSM 800 con cámara Zeiss Colibrí 2 (CCD) de alta resolución y rango dinámico.

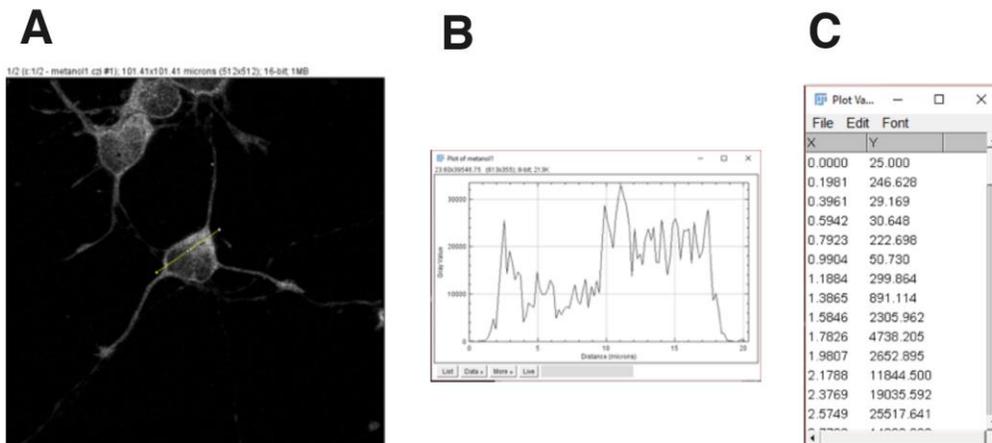


Figura 6. Proceso para obtención de valores de intensidad de fluorescencia. **A.** Trazo del ROI. **B.** Plot profile. **C.** Valores del Plot profile.

Sistema de Procesamiento de Imágenes

El sistema de procesamiento de imágenes utilizado está conformado por una computadora personal Macintosh (tipo iMac) con un monitor de 21.5 pulgadas, un programa de procesamiento digital de imágenes Image J FIJI. Se utilizaron perfiles de intensidad de la siguiente manera:

Se trazó una región de interés (ROI) con forma de línea (ver línea de puntos amarillos en **Fig. 6**), sobre el eje de mayor longitud de la célula atravesando el núcleo.

Una vez realizado el ROI, se obtuvo un Plot profile, que es un gráfico de intensidad de fluorescencia versus distancia recorrida por el ROI realizado. De ese gráfico se puede obtener un listado de puntos x, y que representan un determinado valor "y" de fluorescencia en un determinado punto "x" del recorrido del ROI. El listado del Plot profile de cada célula se copió en un Excel y se realizó un promedio de valores de intensidad de fluorescencia de las diferentes células. Posteriormente, se realizaron gráficos de intensidad de fluorescencia promedio versus distancia, que son los que se muestran en la sección resultados.

Preparación de Sinaptosomas y Estimulación con BDNF

Para la obtención de sinaptosomas, se decapitaron 2 ratas adultas y se extrajeron los cerebros. Se disecó la corteza de los dos cerebros y se cortaron en pedacitos con la tijera y se los colocó en el homogenizador de vidrio en hielo. Se agregaron 20 ml de Buffer de homogenización (HB) con inhibidores de proteasas y fosfatasas a 4°C. Se homogenizó el tejido 10 veces con el pistillo más grande (A) y 10 veces más con el pistillo más chico (B), con cuidado de no realizar burbujas que pudiesen dañar las membranas de los sinaptosomas. Este proceso se realizó siempre en hielo. Se centrifugó por 10 minutos a 4°C a 1000g en centrífuga de mesa refrigerada. Entonces, se obtuvo un pellet 1+ un sobrenadante 1 (P1+S1). Luego se centrifugó el sobrenadante 1 por 15 minutos a 9.200 g en centrífuga de mesa refrigerada. Obtuvimos un Pellet 2 más un Sobrenadante 2. (P2+S2) (Estos son los sinaptosomas crudos). Se resuspendió el Pellet 2 en 5 ml de HB con inhibidores, suavemente (siempre en hielo). Luego se agregaron 10 ml de HB con inhibidores y se mezcló suavemente. La solución formada se centrifugó a 10.500 g por 15 minutos a 4°C en centrífuga de mesa refrigerada. Se obtiene entonces un pellet 2' (P2') (Estos son los sinaptosomas crudos lavados) y un sobrenadante. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el P2' en 5 ml de HB suavemente con inhibidores, a 4°C.

Una vez obtenidos los sinaptosomas, se procedió a realizar dos tratamientos: tratado con BDNF 10ng/ml por 10 minutos a 37°C y el control con el vehículo solo (solución con que se prepara el BDNF que es medio de cultivo MEM).

Posteriormente, se agregó, a ambos tratamientos, Buffer hiposmótico con inhibidores de proteasas y fosfatasas a 4°C y se dejó durante 10 minutos en hielo. Este buffer tiene la función de lisar los sinaptosomas y así liberar al medio las vesículas sinápticas. Luego se centrifugaron los tubos control y tratados con BDNF a 25.000 g en ultracentrífuga a 4°C. Es entonces cuando se obtuvo un Pellet y un Sobrenadante. Se pasaron los sobrenadantes a otros tubos y se guardaron los pellets. Centrifugamos el sobrenadante a 100.000g por 5 minutos en ultracentrífuga a 4°C y nuevamente se obtuvo un sobrenadante y un pellet. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellets en buffer de homogenización. Posteriormente se analizaron los pellets por Western Blot.

Western Blot

Las fracciones de sinaptosomas fueron diluidas en un buffer de siembra conteniendo β -mercaptoetanol y dodecil sulfato de sodio (SDS) que permite la desnaturalización de las proteínas de las muestras y además les provee cargas negativas que luego les permitirán migrar a lo largo de los geles de poliacrilamida al 10% con un ancho de 1mm (SDS-PAGE, por Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) debido a la corriente que atraviesa el gel. Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, las mismas fueron transferidas a una membrana de PVDF a 400mA por 2 horas en un tanque de transferencia conteniendo buffer de transferencia. Una vez terminada la transferencia, las membranas fueron incubadas con una solución de Tris salino conteniendo 5% de leche en polvo para bloquear la pegada inespecífica de los anticuerpos específicos utilizados. Los anticuerpos fueron incubados en cámara fría a 4°C durante toda la noche. Luego las membranas fueron lavadas 3 veces con Tris salino conteniendo 0.02 % de Triton X-100 y posteriormente fueron incubadas por 45 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios pertinentes. Los anticuerpos secundarios están conjugados con peroxidasa para la detección por agentes quimioluminocentes o con compuestos que fluorescente cerca del infrarrojo (LI-COR) para ser detectados por un sistema de cuantitativo adquisición de imágenes (Osyssey-LI-COR).

Western Blot Sistema Phos-tag

La fosforilación de proteínas se ha detectado tradicionalmente mediante el uso de isótopos radiactivos (^{32}P ATP). Sin embargo, en ensayos no radioactivos con anticuerpos fosfo-específicos para el sitio de fosforilación, no se ha podido detectar sitios de fosforilación no identificados. Recientemente, la tecnología Phos-tag ha sido desarrollada para superar las desventajas y limitaciones de los anticuerpos fosfo-específicos. Phos-tag y sus derivados conjugados con biotina, acrilamida o agarosa, forman complejos de metal dinucleares con puentes de alcóxido, que pueden capturar dianiones monoestero de fosfato unidos a serina, treonina y tirosina, de una manera independiente de la secuencia de aminoácidos (Horinouchi, Terada et al. 2016). Por ende, el sistema Phos-tag está diseñado para el análisis de proteínas fosforiladas. La acrilamida Phos-tag se añade cuando se está preparando el gel SDS-PAGE para separar las proteínas fosforiladas. La velocidad de migración de las proteínas fosforiladas disminuye, al estar atrapadas por la acrilamida Phos-tag, permitiendo la separación de las mismas de las proteínas no fosforiladas. Este reactivo permite incluso la separación de isoformas fosforiladas en diferentes posiciones, pudiéndose reconocer todas las formas fosforiladas de serina, treonina y tirosina.

Marcado Metabólico

El proceso de marcado metabólico consiste en incorporar ATP marcado con ^{32}P al medio de cultivo. Cuando se estimulan las células en cultivo con BDNF, numerosas proteínas que forman parte de esta cascada de señalización, entre ellas las quinasas, son activadas. Cuando las quinasas fosforilan a sus moléculas blanco, incorporan el fosfato del ATP marcado con ^{32}P , de tal manera, que las moléculas fosforiladas con este isótopo, luego podrán ser detectadas mediante una placa radiográfica. Para el marcado metabólico de neuronas primarias de embriones de rata con ^{32}P , las neuronas fueron cultivadas como se explicó más arriba. Al día 2, $\frac{3}{4}$ del medio de cultivo fue reemplazado con DMEM sin fosfato (Gibco cat. 11971-025) para promover la incorporación de ^{32}P . Al día 3 en cultivo le agregamos ^{32}P (PerkinElmer cat. NEX053H001NC) al medio de cultivo, y las células fueron estimuladas con BDNF por 20 minutos como se describió anteriormente.

Análisis Estadístico

Se realizó mediante el software Infostat. Para determinar si existían diferencias significativas en el grado de asociación de DIC a las fracciones endosomales, entre los diferentes tratamientos, se utilizó la prueba T Studet. Las diferencias fueron consideradas significativas con un $p < 0,05$.

RESULTADOS

Fosforilación de DIC Mediada por la Estimulación Neuronal con BDNF

Datos previos han demostrado que la estimulación neuronal por neurotrofinas, en particular BDNF, estimulan el TA retrógrado de sinaptosomas de señalización mediados por el complejo motor molecular dineína (Howe and Mobley 2004). Datos previos de nuestro y otros laboratorios determinaron que DIC es una proteína que se fosforila *in vivo* e *in vitro*, en particular luego de la estimulación del TA retrógrado mediado por factores tróficos (Whyte, Bader et al. 2008, Mitchell, Blasier et al. 2012). La estimulación de neuronas primarias de corteza cultivadas *in vitro* por 3 días, neuronas proveniente de embriones de rata de 18 días de gestación, con 10ng/ml de BDNF induce la fosforilación de DIC. Análisis cuantitativo por autoradiograma del complejo motor dineína inmunoprecipitado de neuronas corticales de embriones de ratas cultivadas por 3 días marcadas metabólicamente con fósforo radioactivo (^{32}P), muestra un incremento selectivo del estado de fosforilación de DIC, luego de la estimulación de las neuronas con el factor trófico derivado de cerebro BDNF (**Figura 7**). El complejo motor dineína fue inmunoprecipitado de homogenatos de dichas células utilizando el anticuerpo monoclonal 74.1 (mAb 74.1, Santa Cruz Biothech.). El anticuerpo 74.1 inmunoprecipita todas las cadenas que componen el complejo motor (Brill and Pfister 2000).

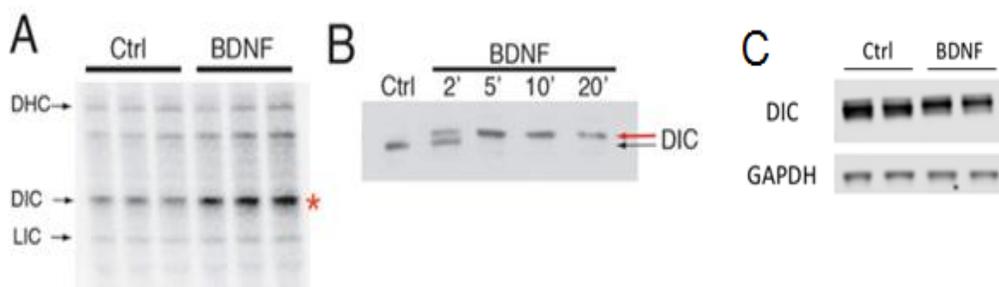


Figura 7. Fosforilación de DIC luego de la estimulación con BDNF. **A.**

Autorradiograma de complejo molecular dineína inmunoprecipitado de neuronas corticales primarias de rata 3DIV, ya sea sin tratamiento (control) o tratado con BDNF (10 ng / ml) en presencia de ^{32}P . El tratamiento con BDNF incrementa selectivamente la fosforilación de la subunidad DIC, no así de DHC ni LIC. **B.** Por inmunotransferencia, el anticuerpo 74.1 reveló un aumento dependiente del tiempo (2' a 20'). Entre los 5 y 10 minutos se observa mayor cantidad de DIC. **C.** El nivel total de DIC no cambia con la estimulación BDNF. GAPDH se utilizó como un control de carga.

Utilizando el analizador Phosphoimager, que permite cuantificar el contenido de ^{32}P de proteínas radioactivas en geles, observamos que la estimulación con BDNF induce un substancial incremento en la fosforilación de DIC (asterisco rojo *), pero no de las subunidades pesadas y livianas del complejo motor dineína (DHC o LIC) (**Fig. 7 A**). Del análisis por Western Blot del inmunoprecipitado obtenido con el mAb 74.1 observamos un incremento en la movilidad electroforética de DIC dependiente del tiempo (2' a 20') (**Fig. 7 B**, flecha rojas) inducido por BDNF. El tratamiento con fosfatasa alcalina revirtió el incremento en movilidad lo cual sugiere que dicho incremento fue debido a un evento de fosforilación (no mostrado). Cabe mencionar que los niveles totales de DIC no presentaron cambios significativos luego de la estimulación con BDNF (**Figura 7C**).

La Fosforilación de DIC Inducida por BDNF depende de la actividad de TrkB y de las proteínas Tirosina Quinasas de la Familia de Src

Luego de confirmada la fosforilación de DIC, decidimos utilizar diferentes inhibidores farmacológicos para determinar cuál quinasa era responsable de dicha fosforilación, teniendo en cuenta los sitios de consenso que posee la secuencia de DIC, y a su vez teniendo en cuenta que la posible quinasa debería ser activada luego de la asociación de BDNF al receptor específico TrkB. Para ello, pre-incubamos los cultivos de neuronas de rata cultivados por 3 días in vitro con los siguientes inhibidores 20 minutos antes de la incubación con BDNF: 200nM k252a, un inhibidor farmacológico de los receptores Trk (Tapley 1992), 50 μM SU6656 y 30 μM A419529, dos inhibidores con diferente acción para la familia de las proteínas tirosina quinasa proto-oncogénicas de la familia de Src incluidas Src y Fyn (Wilson 2002, Blake 2000). La inhibición de la actividad de los receptores Trk por K252a previene la activación de quinasas aguas abajo de los receptores Trk, y como era de esperar, también previno la fosforilación de DIC luego de la estimulación neuronal con BDNF (**Figura 8**). De una manera interesante, los

inhibidores de la familia de las Src, que se activan aguas abajo de la activación de los receptores Trk, SU6656 y A419529, también previenen la fosforilación de DIC luego de la activación por BDNF. Ninguno de los inhibidores ni la incubación con BDNF alteraron los niveles de expresión de DIC (**Figura 9**). Tomados en conjunto estos datos bioquímicos y farmacológicos sugieren que la fosforilación de DIC inducida por BDNF requiere de la activación tanto del receptor TrkB y de las proteínas tirosina quinasa proto-oncogénicas de la familia de Src incluidas Src y Fyn.

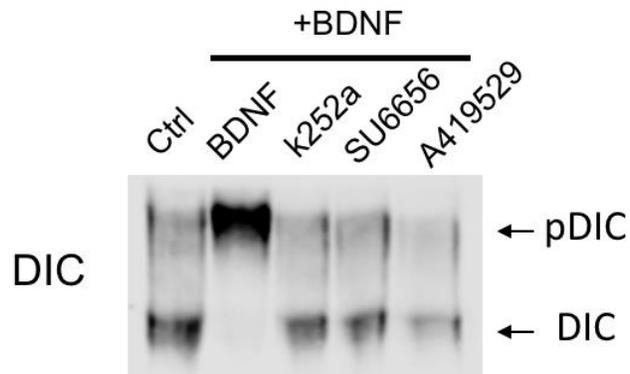


Figura 8. BDNF induce la fosforilación de DIC a través de la activación del TrkB y SFKs. Tratamiento previo con inhibidores farmacológicos de TrkB (k252a) y SFK impidió la fosforilación de DIC tras la estimulación con BDNF.

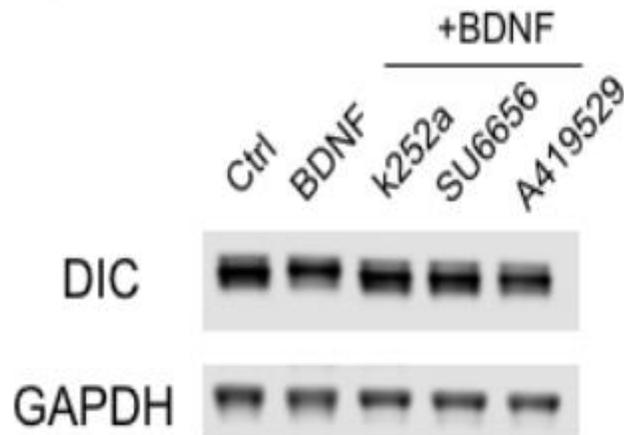


Figura 9. Los niveles totales de DIC no cambiaron bajo ningún tratamiento (con BDNF o tratamientos con inhibidores). GAPDH se proporciona como un control de carga.

Las Proteínas tirosina quinasa proto-oncogénicas Src y Fyn Activan TA Retrógado

Sabiendo que la activación de proteína quinasa de la familia de Src es necesario para la fosforilación de DIC mediada por BDNF, examinamos si las proteínas quinasas de la familia de Src (Src y Fyn) podrían afectar el transporte axonal. Con ese fin, empleamos el modelo de axón aislado de calamar y analizamos el transporte axonal de vesículas de membrana en ambas direcciones (anterógrado y retrógado). Teniendo en cuenta que estas preparaciones axonales carecen de membrana axoplásmica, el efecto directo de BDNF, el cual requiere la presencia del receptor específico de membrana TrkB, no puede ser efectuado. Sin embargo, pudimos estudiar el efecto directo de las quinasas aguas abajo de la activación de TrkB sobre la motilidad vesicular en tiempo real.

La familia de las proteínas quinasas Src pertenecen a una familia de proteínas tirosina quinasas con numerosos miembros que incluyen entre otros a Src, Fyn, Lyn, Hck y Lck (Filippakopoulos, Muller et al. 2009). Perfundimos las quinasas Src (70nM) y Fyn (70nM) en axones aislados de calamares y observamos que ambas tirosina quinasas activan el TA retrógado (**Figura 10**). Estos resultados sugieren que la activación de Src y Fyn mediado por la estimulación neuronal con BDNF, requerida para la fosforilación de DIC, podría resultar en la activación del TA retrógado de endosomas de señalización.

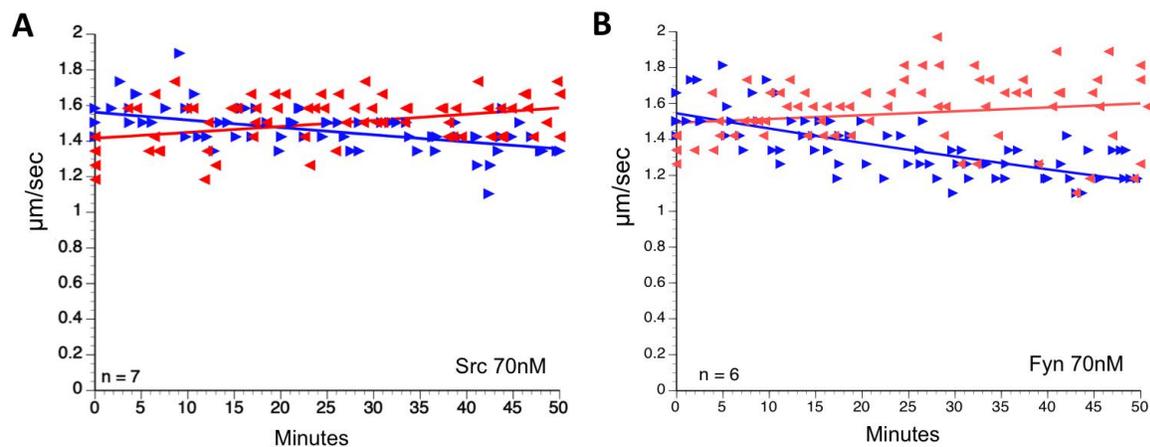


Figura 10. Las proteínas tirosina quinasas de la familia de Src activan el TA retrógado en axoplasmas aislados de calamar. Perfusión de las quinasas recombinantes Src (**A**) y Fyn (**B**) en axoplasma activan el transporte axonal retrógado (líneas y flechas rojas), mientras que también inhiben el transporte axonal anterógrado (líneas y flechas azules).

La Activación del Transporte Axonal Retrógrado Inducido por BDNF es Mediado por la Activación de la Quinasa PKC

La fosforilación de DIC mediada por la estimulación neuronal por BDNF requiere de la activación de proteínas tirosina quinasa no receptoras de la familia de Src, eventos que resultan en la activación del transporte retrógrado (Ver **Figura 10**). Sin embargo, datos previos de nuestro laboratorio demostraron que DIC se fosforila solo en residuos serina/treonina y no en tirosinas, por lo que pensamos que debería haber una quinasa intermediaria entre la activación de las proteínas tirosina quinasa de la familia de Src y la fosforilación de DIC. Experimentos previos de nuestro laboratorio reportaron que miembros de la familia de la proteína quinasa C (PKC) pueden activar el transporte axonal retrógrado en axones aislados de calamar (Morfini, Pigo et al. 2007). Primeros indicios de que PKC podría activar el transporte retrógrado surgieron de experimentos de nuestro laboratorio que muestran que la subunidad catalítica de PKC activa el transporte retrógrado con un patrón similar al inducido por Src y Fyn (**Figura 11-c**). Más aun, experimentos de co-perfusión de Src y un sustrato específico de PKCs denominado MARCKS previene totalmente la activación del TA retrógrado (**Figura 11-b**), sugiriendo de esta manera que la activación del TA retrógrado inducido por Src y Fyn involucra la activación de una quinasa intermediaria de la familia de las PKC.

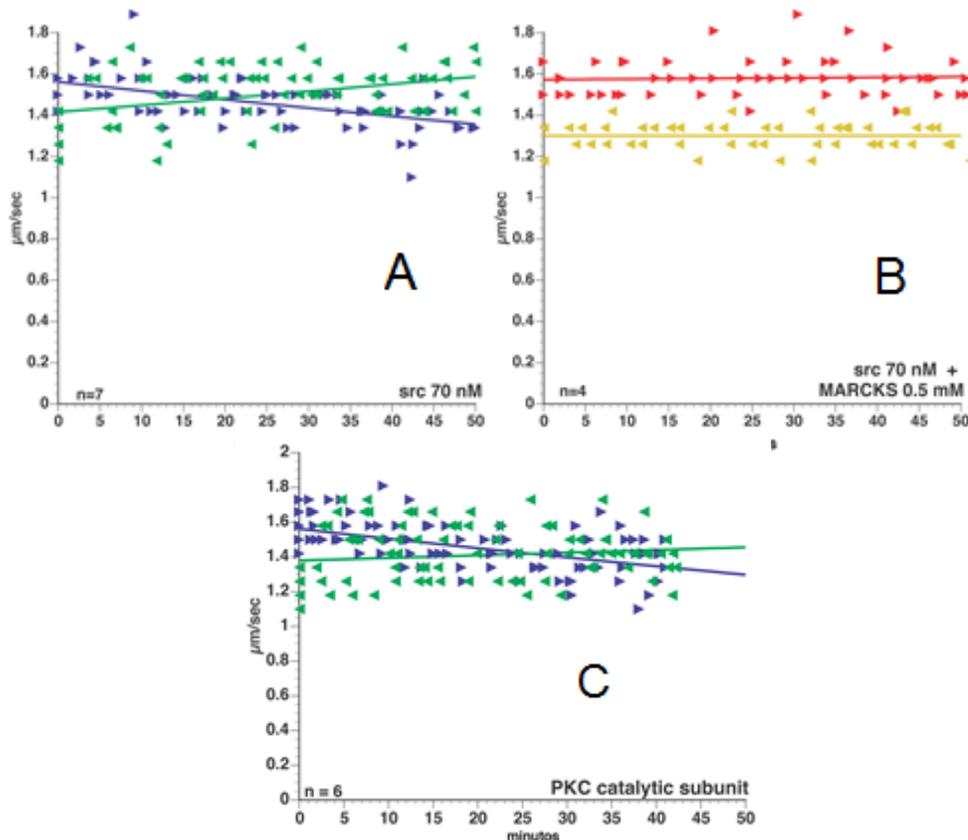


Figura 11. La activación del transporte retrógrado es mediada por la activación de la Subunidad catalítica de la PKC. **A.** Tratamiento con 70 nM src activa el transporte retrogrado. **B.** Tratamiento de 70 nM src más 0,5 mM MARCKS (sustrato específico PKC) modifica tanto el transporte retrogrado como anterógrado. **C.** Tratamiento con la subunidad catalítica de la PKC muestra un transporte axonal normal, similar al tratamiento con src.

Reportes previos han determinado que proteínas tirosina quinasas de la familia de Src pueden activar a distintos miembros de la familia de proteínas quinasas C (Murugappan, Chari et al. 2009, Senis, Mazharian et al. 2014). Por lo tanto decidimos determinar cuál de estas isoformas actúan aguas debajo de Src en el contexto de la activación del transporte axonal retrogrado. Basado en sus dominios regulatorios la familia de las PKC pueden categorizarse en: convencionales (cPKCs), novedosas (nPKCs) y atípicas (aPKCs) (**Tabla 1**).

Subfamilia	Isoformas	Requiere DAG para activarse	Requiere Ca ²⁺ para activarse
Convencionales	PKC α , PKC β , PKC γ	SI	SI
Nuevas	PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ ,	SI	NO
Atípicas	PKC ζ , PKC λ , PKC μ	NO	NO

Tabla 1. Clasificación de isoformas de PKC.

Para ello, se co-perfundieron axoplasmas con Fyn, uno de los miembros de la familia de Src proteínas tirosina quinasas, junto con dos inhibidores farmacológicos de la familia de las PKCs. Utilizamos los inhibidores Gö6983 y Gö6976. Ambos compuestos son inhibidores de PKC, los cuales inhiben distintos miembros de la familia de PKCs, Gö6983 inhibe PKC α , PKC β , PKC γ , PKC δ y PKC ζ (IC50= 7nM, 7nM, 6nM, 10nM, 60nM, respectivamente medidos por ensayos de quinasas in vitro con 35 μ M de ATP), pero no inhiben a PKC μ también

denominada PKD1 ($IC_{50} > 20\mu M$) ((Gschwendt, Dieterich et al. 1996). El inhibidor Gö6976 inhibe $PKC\alpha$, $PKC\beta$ y $PKC\mu/PKD1$ ($IC_{50}= 2nM, 6nM, 20nM$, respectivamente) (Martiny-Baron, Kazanietz et al. 1993, Gschwendt, Dieterich et al. 1996) (Ver **Figura 12-A**). Co-perfusión de Fyn junto con Gö6983 no previnieron la activación del TA retrógrado inducido por Fyn (**Figura 12-B**), mientras que la co-perfusión de Fyn con Gö6976 bloqueó el efecto tanto en el TA anterógrado como retrógrado (**Figura 12-C**), sugiriendo que $PKC\mu$ o PKD1, pero no $PKC\alpha$, $PKC\beta$, $PKC\gamma$, $PKC\delta$ o $PKC\zeta$ podrían mediar la activación del TA retrógrado inducido por proteínas tirosina quinasas de la familia de Src.

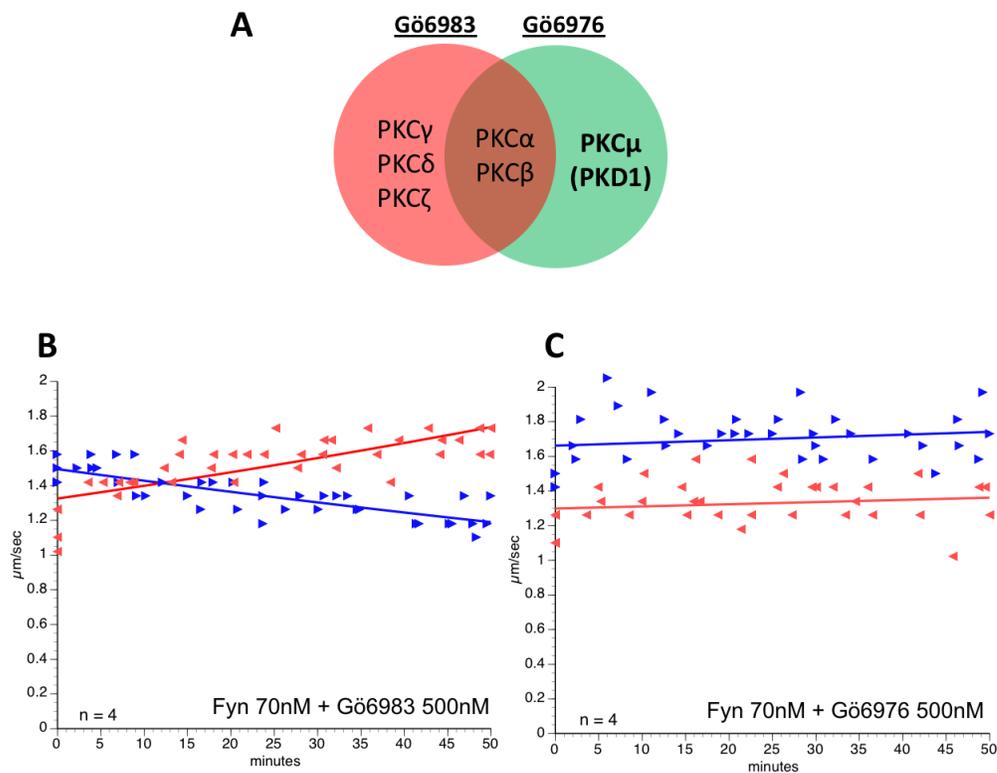


Figura 12. Los SFK activan el transporte axonal retrógrado mediante la activación de PKD1. **A.** Selectividad de los inhibidores de PKC Gö6983 y Gö6976. **B.** Gö6983 no impide la activación del transporte axonal retrógrado por Fyn, un miembro de SFK, en axoplasma; Mientras que **C.** Gö6976 lo hace. Estos datos sugieren que PKD1 o $PKC\mu$, que está inhibida por Gö6976 pero no por Gö6983, se requiere para la activación del transporte axonal rápido retrógrado por SFKs. En azul, TA anterógrado; en rojo, TA retrógrado.

La quinasa PKD1 induce la fosforilación de la DIC y activa el transporte axonal retrógrado.

Resultados farmacológicos indican que la perfusión de PKC μ o PKD1 en axoplasmas aislados de calamar activan el TA retrógrado con un perfil de inducción cualitativamente casi idéntico al inducido por Src y Fyn (**Figura 13-A**). Estos datos en conjunto nos sugieren que PKD1/ PKC μ puede mediar la activación del TA retrógrado aguas abajo de las proteínas tirosina quinasas de la familia de Src. Además, el análisis de la fosforilación de DIC en las mismas muestras utilizando Phos-Tag SDS-PAGE reveló que la inhibición de la PKD1 por el péptido de sustrato CRT 0066101 o PKD1, pero no el péptido de sustrato PKC δ , evita la fosforilación de DIC inducida por el BDNF (**Figura 13-B**). Estos resultados indican que la activación de PKD1, pero no otra isoforma de PKC, es necesaria para la fosforilación de DIC inducida por BDNF.

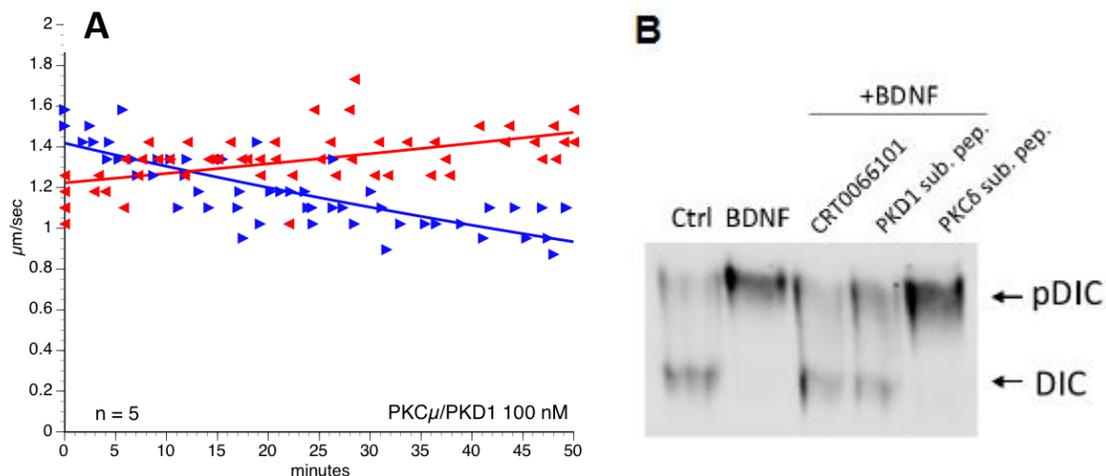


Figura 13. PKD1/ PKC μ activa el TA retrogrado en axoplasmas aislados de calamar.

A. La perfusión de formas activas de la proteína quinasa PKD1/ PKC μ en axoplasmas aislados de calamar activan el TA retrógrado (rojo) e inhibe el TA anterógrado (azul). El efecto de PKD1/ PKC μ sobre el TA es cualitativamente similar al efecto de las proteínas tirosina quinasas de la familia de Src (Src y Fyn).

B. Phos-Tag SDS-PAGE muestra la inhibición de la fosforilación de DIC inducida por BDNF por CRT 0066101 y péptido de sustrato PKD1, pero no por péptido de sustrato PKC δ , lo que indica que se requiere PKD1 para la fosforilación de DIC sobre la estimulación con BDNF.

En conjunto estos experimentos sugieren que la activación del transporte axonal retrógrado inducido por BDNF es mediado por la activación de su receptor específico TrkB, la activación de proteínas tirosina quinasa no receptoras de la familia de Src, la posterior activación de PKC, más específicamente PKD1 o PKC μ que resultan en la fosforilación de la DIC.

Las preguntas que todavía faltan resolver a nivel molecular es ¿cuál es el mecanismo de activación del transporte axonal retrógrado? Cuál es la consecuencia funcional de la fosforilación de DIC inducida por BDNF? ¿Induce la fosforilación de DIC su asociación a la membrana de endosomas de señalización? ¿Es la asociación de DIC a las membranas de los endosomas lo que causa la activación de su transporte axonal de manera retrógrada?

Para responder estos interrogantes planteamos tres objetivos específicos, mencionados anteriormente. Con la premisa de responder estos objetivos específicos tuvimos que:

- 1) determinar cuál es el sistema de fijación más apropiado para el anticuerpo monoclonal 74.1 que reconoce la DIC.
- 2) determinar mediante diferentes técnicas de microscopía la distribución subcelular de DIC. E
- 3) evaluar la asociación de DIC a una fracción enriquecida en endosomas de membranas de neuronas estimuladas con BDNF o con buffer control.

Diferentes tipos de fijación posibilitan visualizar la distribución subcelular de la DIC.

Para determinar que protocolo de fijación permite evidenciar mejor el comportamiento subcelular de DIC frente a la estimulación con BDNF, neuronas primarias derivadas de embriones de rata cultivadas por 3 días y células embrionarias de riñón humano 293 (HEK-293) fueron sometidas a dos protocolos diferentes de fijación y luego efectuamos un detallado análisis por inmunocitoquímica de doble marca con el anticuerpo monoclonal contra DIC (mAb 74.1) y el un monoclonal contra tubulina tirosinada.

Tanto neuronas primarias como células HEK-293 fueron expuestas a dos protocolos de fijación: Fijación con Paraformaldehído Sucrosa (PFS) durante 30

minutos a temperatura ambiente, o fijación con metanol puro durante 10 minutos a -20°C , seguido de un protocolo de rehidratación con metanol 70% y 50% como se explica en Materiales y Métodos.

Tanto en neuronas como en línea celular ambos tipos de fijación permitieron la observación de DIC, sin embargo, la inmunomarca es más intensa y mejor definida cuando las células son fijadas con metanol. Cabe mencionar que se observa en ambos métodos de fijación una distribución membranosa/vesicular. (**Figura 15 y 16**).

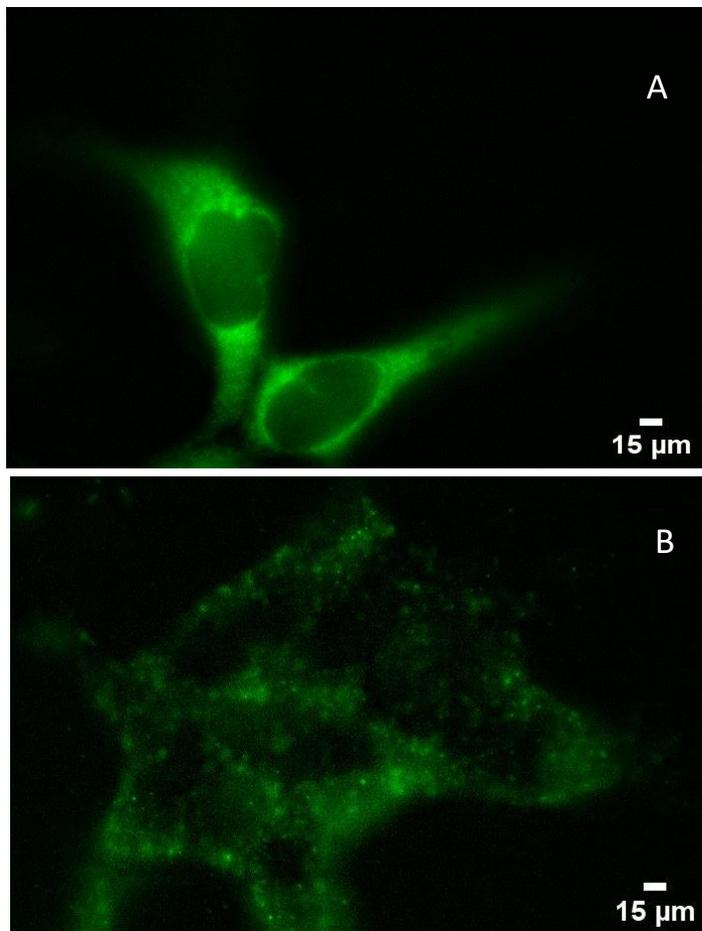


Figura 15. La fijación con Metanol permite una observación de la DIC más clara y definida, en células HEK. **A.** Fijación con metanol. **B.** Fijación con PFS.

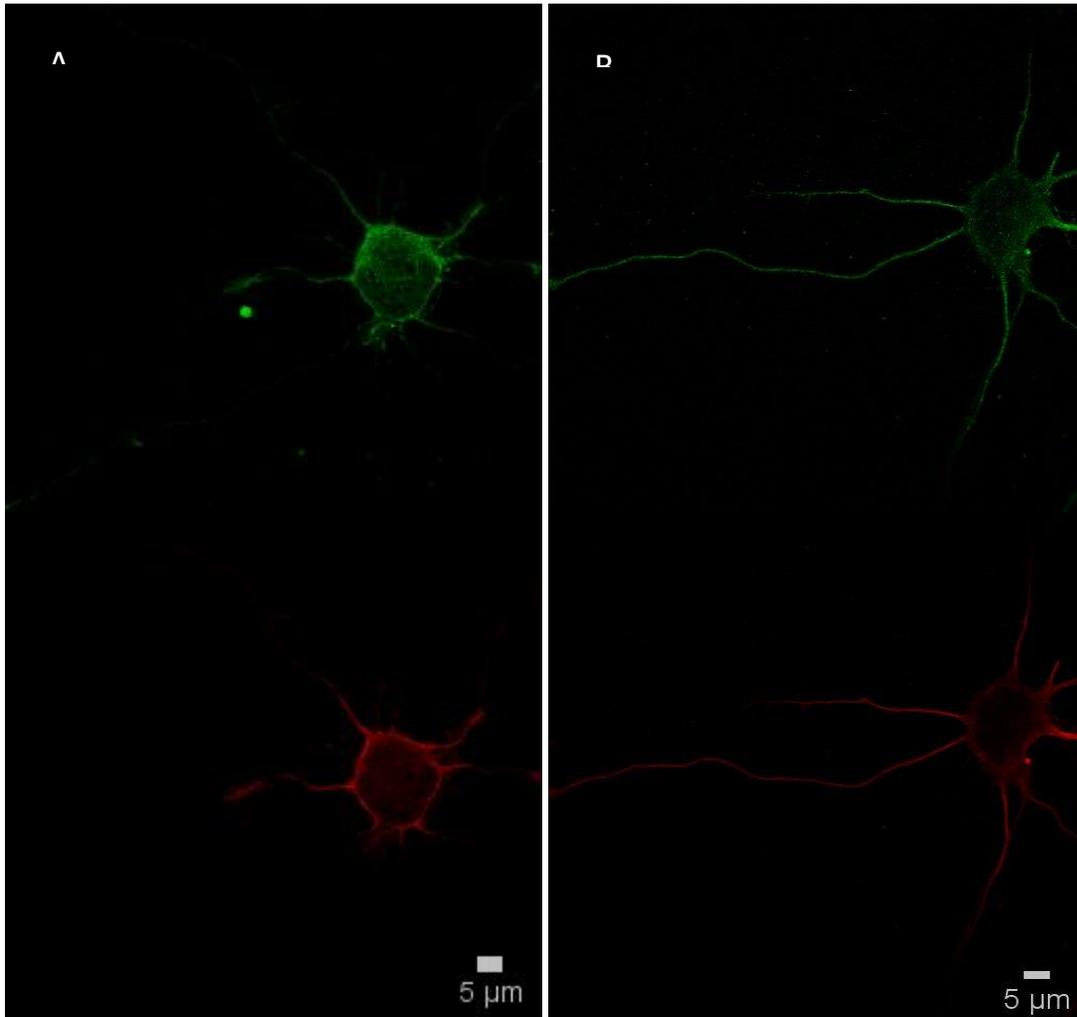


Figura 16. La fijación con Metanol permitió una mayor observación de la DIC (mAb 74.1) en neuronas corticales. **A.** Fijación con metanol. **B.** Fijación con PFS. En verde: DIC, en rojo: tubulina tirosinada, clon YL1-2.

BDNF induce una distribución homogénea de la DIC tanto en Neuronas primarias como en Células HEK-293

Datos previos han demostrado que la estimulación neuronal por neurotrofinas, en particular BDNF, estimulan el TA retrógrado de sinaptosomas de señalización

mediados por el complejo motor molecular dineína (Howe and Mobley 2004). En nuestro laboratorio, hipotetizamos que la DIC debería de encontrarse en un estado de “vacante”, en la periferia de la célula, esperando transportar dichos endosomas tras la estimulación con 10 ng/ml BDNF durante 10 minutos. Tiempo transcurrido luego de la estimulación con BDNF, la distribución de la DIC sería diferente, a la situación inicial, puesto que la misma se pone en movimiento y transporta sus cargas a diferentes lugares de la célula.

Las células sin tratar con BDNF, situación control, presentan una mayor intensidad de fluorescencia de DIC en los bordes de las mismas, en la periferia (**Figura 17-A**). Este patrón se evidencia en el gráfico correspondiente (**Figura 17-B**), donde se evidencian dos grandes picos de intensidad respectivos a los bordes de la célula.

La estimulación con 10 ng/ml BDNF durante 10 minutos, en la línea celular HEK-TrkB, evidenció que la DIC presenta una distribución uniforme en todo el cuerpo celular (**Figura 18-A**). El gráfico de intensidad de fluorescencia, revelo que toda la población, en promedio, presenta el mismo patrón, es decir, no hay grandes picos de intensidad de fluorescencia que se diferencien de otros menores (**Figura 18-B**).

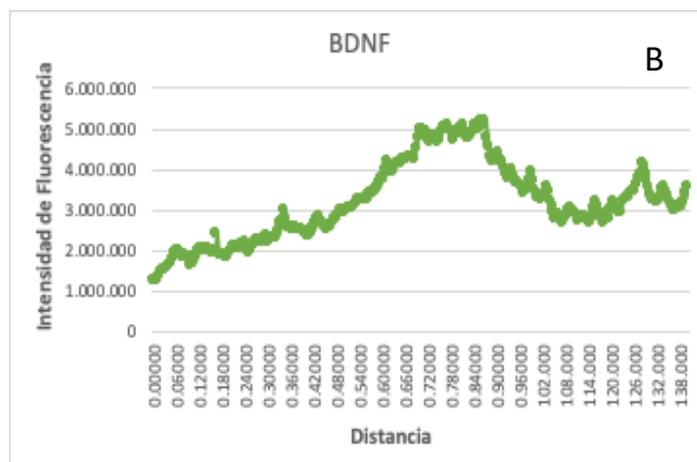
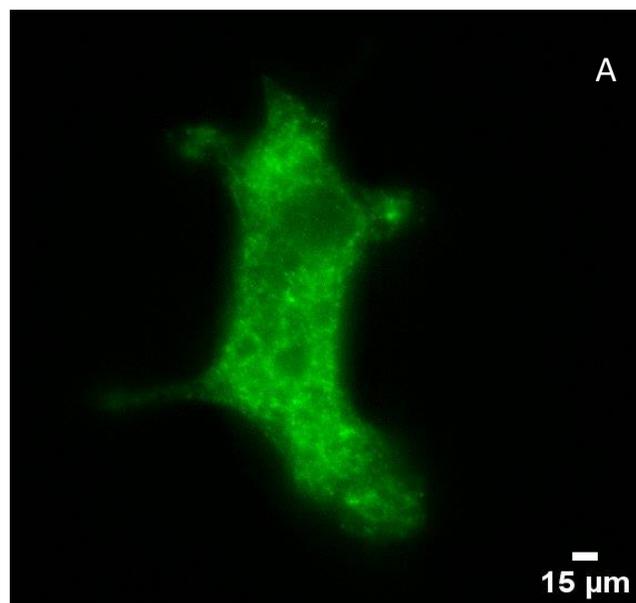


Figura 18. Células HEK-TrkB expuesta a BDNF evidencia un patrón de distribución de la DIC homogéneo. **A.** Fotografía obtenida del Microscopio de Epifluorescencia de dos células. En verde se observa la DIC (mAb 74.1). **B.** Gráfico de intensidad de fluorescencia de DIC promedio de la población celular (n=5).

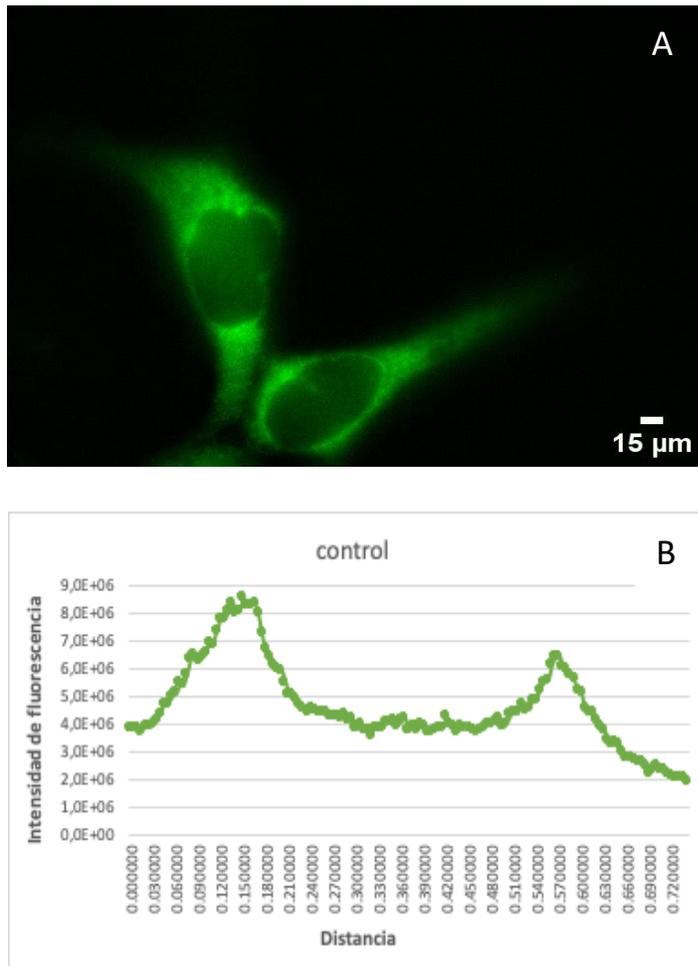


Figura 17. Células HEK-TrkB sin tratar con BDNF evidencian un patrón de distribución de la DIC periférico. **A.** Fotografía obtenida del Microscopio de Epifluorescencia de dos células tratadas con buffer control. En verde se observa la DIC (mAb74.1). **B.** Gráfico de intensidad de fluorescencia promedio de DIC de la población celular analizada (n=5).

Evidencias experimentales en las últimas dos décadas han demostrado que la neurotrofina derivada del cerebro BDNF y su vía de señalización son responsables y promueven el desarrollo, la supervivencia y la función apropiada de las neuronas que pueden responder a dicho factor trófico (Capsoni, Ugolini et al. 2000, Zuccato and Cattaneo 2009). Anticuerpos contra BDNF (que bloquean la

señalización intracelular de BDNF) reducen la supervivencia de neuronas corticales (Gosh 1994).

Neuronas corticales de 3 DIV fueron expuestas a 10 ng/ml BDNF durante 10 minutos, y al igual que en la línea celular (mostrado anteriormente), se produjo un cambio de distribución de la DIC, respecto la situación control (sin BDNF). Las neuronas tratadas con BDNF presentaron un patrón de distribución de la DIC bastante homogéneo en todo el cuerpo celular, tal como se muestra en la **Figura 19-B**. Sin embargo, las células pertenecientes al tratamiento control evidenciaron un patrón de distribución de la DIC bastante periférico, como si fuese un “anillo” (**Figura 19-A**).

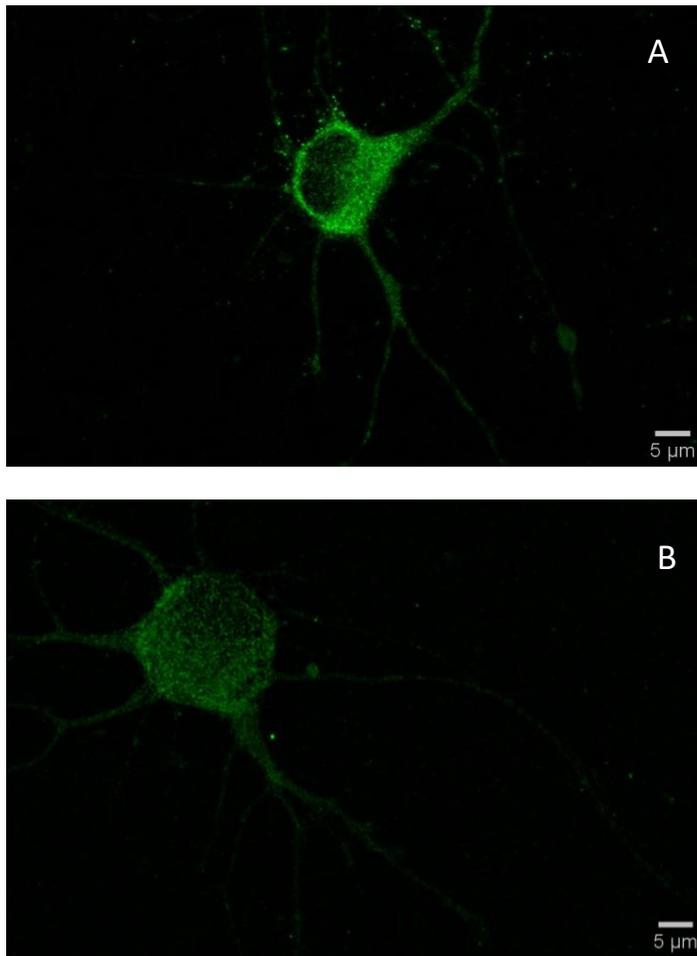


Figura 19 A y B. La estimulación de neuronas corticales con BDNF provoca un cambio de distribución de la DIC respecto el tratamiento control. **A.** Fotografía obtenida del Microscopio de Epifluorescencia de una neurona cortical de 3 días tratada con buffer control. **B.** Fotografía obtenida del Microscopio de Epifluorescencia de una neurona cortical de 3 días en cultivo estimulada con BDNF. En verde se observa la DIC (mAb 74.1).

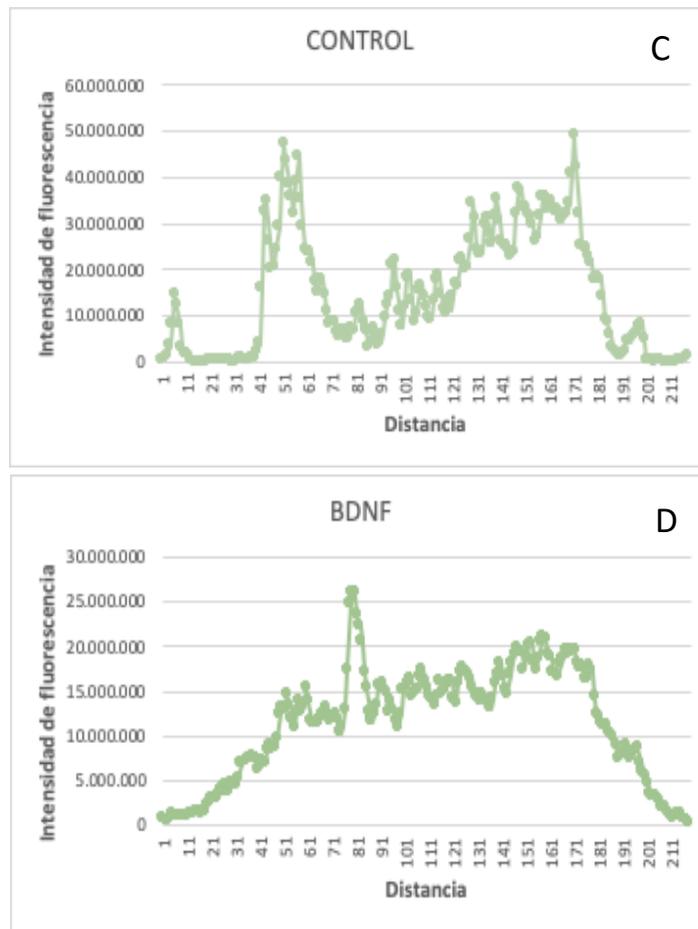


Figura 19 C y D. La estimulación de neuronas corticales con BDNF provoca un cambio de distribución de la DIC respecto el tratamiento control. **C.** Gráfico de intensidad de fluorescencia de DIC promedio de la población celular del tratamiento control (n=17). **D.** Gráfico de intensidad de fluorescencia de DIC promedio de la población celular del tratamiento BDNF (n=20).

Para determinar si el efecto del BDNF sobre la distribución de DIC es el mismo en las diferentes zonas del cerebro, neuronas hipocámpales cultivadas por 3 fueron tratadas con 10 ng/ml BDNF durante 10 minutos y luego fueron analizadas por inmunocitoquímica con el anticuerpo monoclonal para DIC (mAb 74.1). Del análisis pudimos observar un cambio de patrón de distribución de la DIC en el soma de estas neuronas, respecto a la situación control. Las neuronas tratadas con BDNF evidenciaron un patrón de distribución de la DIC homogéneo (**Figura 20-B**). Pero las neuronas pertenecientes al tratamiento control, sin BDNF, presentaron un patrón de distribución de DIC más bien periférico, tal como se puede observar en la **Figura 20-A**.

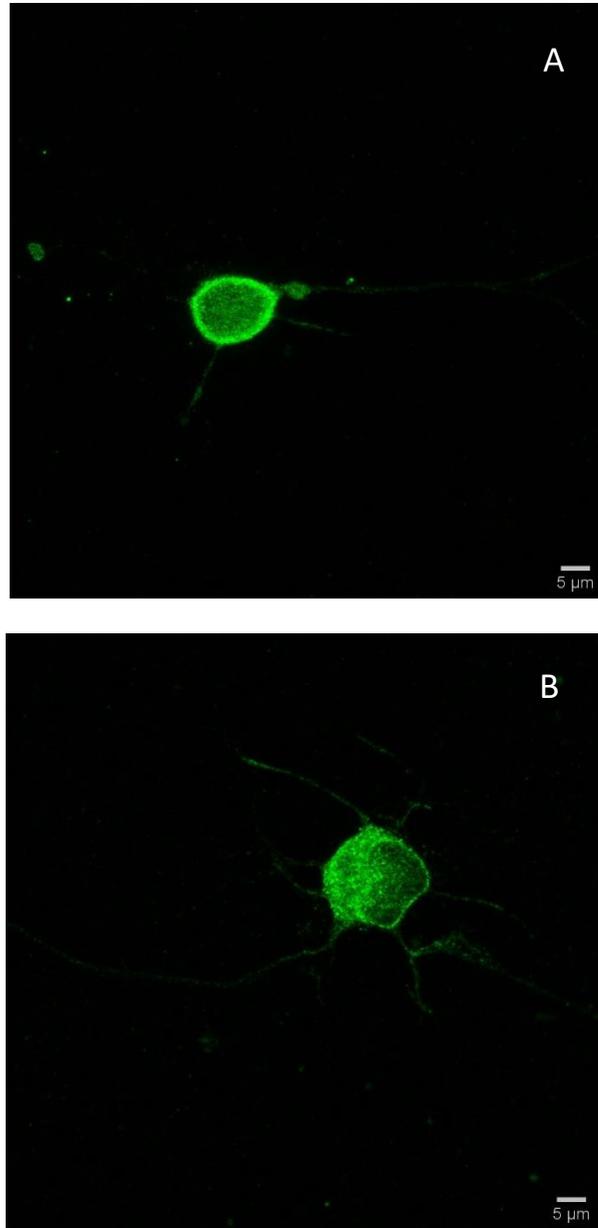


Figura 20 A y B. Neuronas hipocámpales tratadas con BDNF evidencian cambio de patrón de distribución de la DIC respecto la situación control. **A.** Fotografía obtenida del Microscopio de Epifluorescencia de una neurona hipocámpal cultivada por 3 días con buffer control. **B.** Fotografía obtenida del Microscopio de Epifluorescencia de una neurona hipocámpal de 3 días en cultivo estimulada con BDNF. En verde se observa la DIC (mAb 74.1).

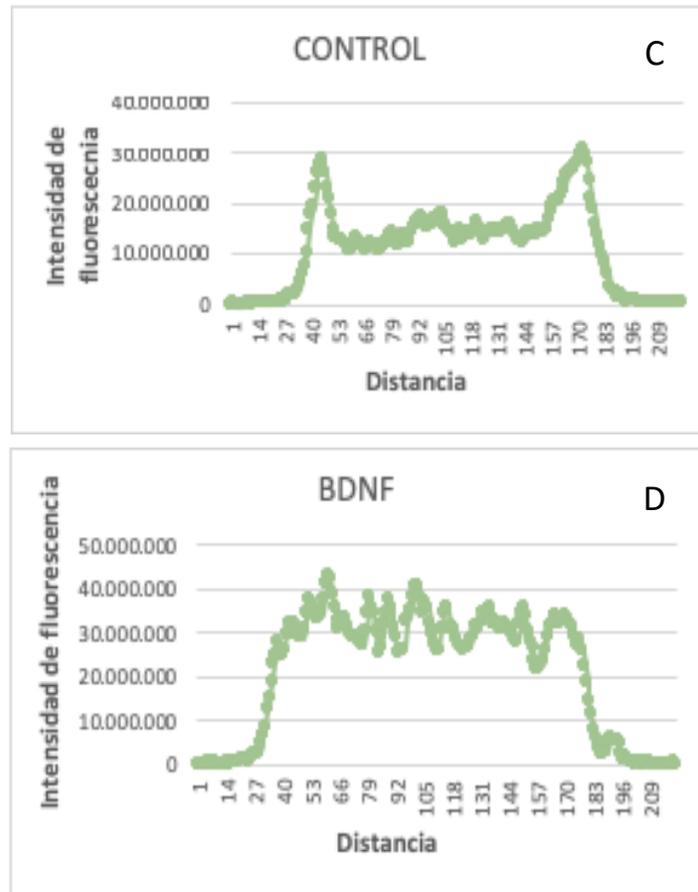


Figura 20 C y D. Neuronas hipocampales tratadas con BDNF evidencian cambio de patrón de distribución de la DIC respecto la situación control **C**. Gráfico de intensidad de fluorescencia de DIC promedio de la población celular perteneciente al tratamiento control (n=2). **D**. Gráfico de intensidad de fluorescencia de DIC promedio de la población celular perteneciente al tratamiento BDNF(n=2).

La inhibición de Trk-B impidió el cambio de distribución de la DIC frente a la estimulación con BDNF

Al unirse las neurotrofinas a sus receptores, los receptores Trk se transfosforilan en varios residuos de tirosina (Tyr705, Tyr706 y Tyr707 en el caso de TrkB) y también alrededor del dominio quinasa (Tyr515 y Tyr816) mediando así su activación.

Luego de la activación de los receptores por parte de la neurotrofinas, el

complejo receptor-neurotrofina es internalizado mediante endocitosis dependiente de clatrina (Zheng, Shen et al. 2008) o por pinocitosis independiente de clatrina (Shao, Akmentin et al. 2002, Valdez, Akmentin et al. 2005). Una vez endocitado, el complejo es transportado hacia el soma neuronal mediante el complejo motor dineina citoplasmática en una organela de membrana llamada endosoma de señalización que contiene el complejo neurotrofina-receptor. La línea celular HEK-TrkB fue tratada 30 minutos con 200 nM K252a, un potente inhibidor de proteínas tirosina-quinasa (Tapley et al 1992), entre los que nos importa, el receptor TrkB, previa estimulación con 10 ng/ml BDNF por 10 minutos. Debido a que el BDNF no pudo ingresar a la célula, por estar inhibido su receptor, el patrón de distribución que presentaron las células fue similar a un tratamiento control (**Figura 21**).

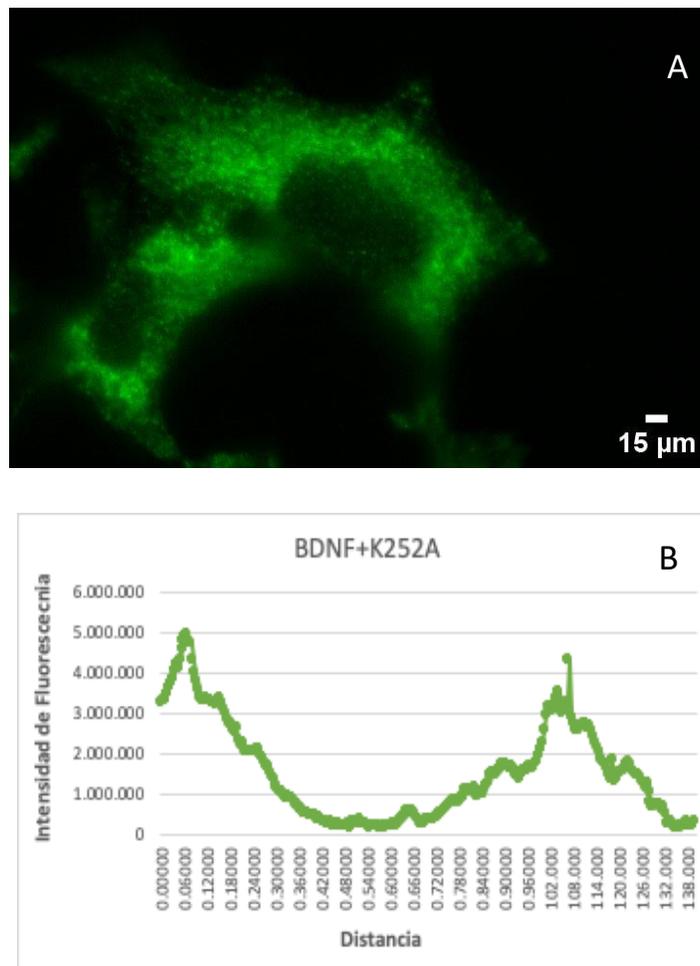


Figura 21. La inhibición del receptor TrkB impidió un cambio de distribución de la DIC. **A.** Fotografía obtenida del Microscopio de Epifluorescencia de células HEK

estimuladas con BDNF + k252a. En verde se observa la DIC (mAb74.1). **B.** Gráfico de intensidad de fluorescencia de la DIC promedio de la población celular (n=4).

La inhibición de las proteínas src no impidió el cambio de distribución de la DIC inducido por BDNF

La perfusión de axoplasma aislado de calamar con las quinasas Src (70nM) y Fyn (70nM) activa el TA retrógrado (Morfini Pigino et al 2007) (**Figura 10**). Por tanto, la DIC estaría sufriendo este cambio de distribución.

Cuando se trataron las células de la línea celular humana HEK-TrkB con 50 μ M su6656, un inhibidor de proteínas kinasas src (Blake et al 2000), el patrón de distribución de DIC que presentaron las células (**Figura 22**) fue similar a un tratamiento BDNF.

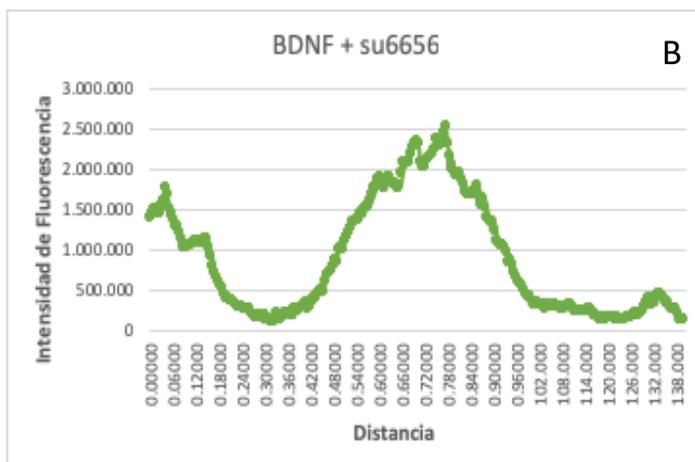
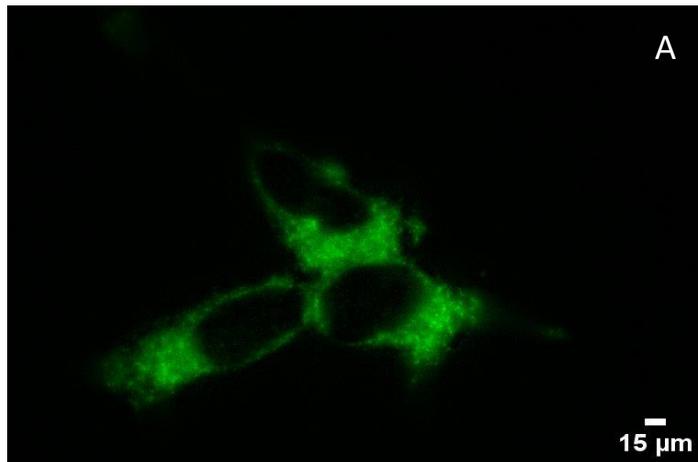
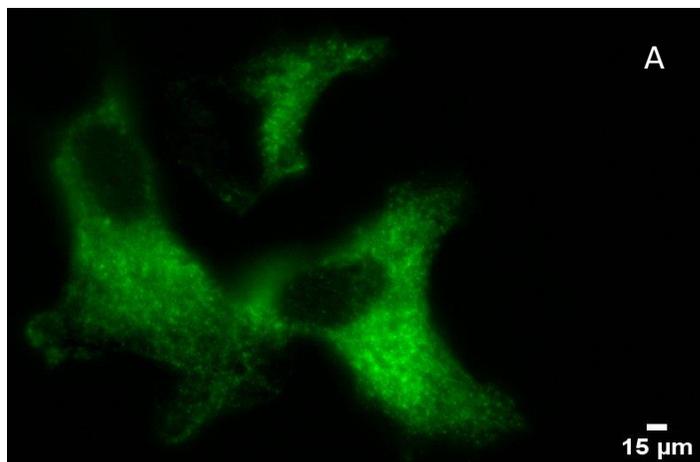


Figura 22. La inhibición de las proteínas quinasa src no impidió la re-distribución de la DIC. **A.** Fotografía obtenida del Microscopio de Epifluorescencia de una célula HEK-293 estimulada con BDNF + su6656. En verde se observa la DIC (mAb 74.1). **B.** Gráfico de intensidad de fluorescencia de la DIC promedio de la población celular (n=4).

La inhibición de la PKD no impidió el cambio de distribución de la DIC frente a la estimulación con BDNF.

Resultados farmacológicos de nuestro laboratorio indican que la perfusión de PKC μ o PKD1 en axoplasmas aislados de calamar activan el TA retrógrado con un perfil de inducción cualitativamente casi idéntico al inducido por Src y Fyn (**Figura 13**). Esto sugiere que PKC μ /PKD1 actúa aguas abajo de las proteínas quinasa src. En la línea celular humana HEK-TrkB, la incubación con 10 μ M de péptido sustrato de la proteína PKC μ (Green and Loewenstein 1988; Frankel and Pabo 1988) previa a la estimulación con 10 ng/ml BDNF, no impidió el cambio de distribución de la DIC, es decir, la misma se encontró distribuida por todo el cuerpo celular (**Figura 23**). Estos datos farmacológicos tomados en conjunto sugieren en principio que la distribución de DIC, en células HEK-293 no sería dependiente de la activación de PKD.



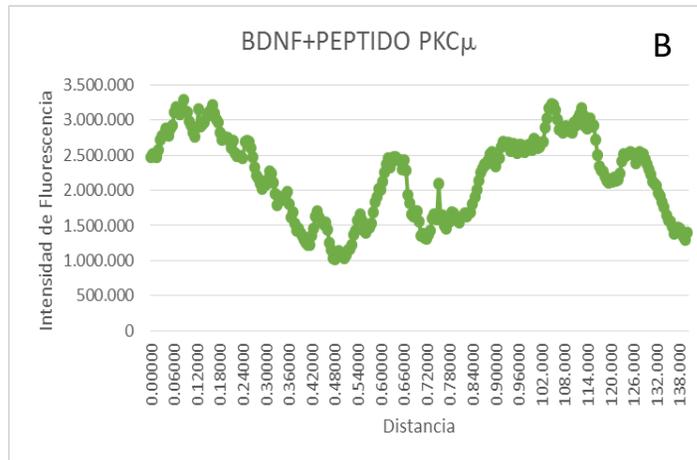


Figura 23. La inhibición de la proteína PKD no impidió un cambio de distribución de la DIC, tras la estimulación con BDNF. **A.** Fotografía obtenida del Microscopio de Epifluorescencia de una célula HEK-293 estimulada con BDNF + Péptido substrato PKC μ . En verde se observa la DIC (mAb 74.1). **B.** Gráfico de intensidad de fluorescencia de la DIC promedio de la población celular (n=5).

Incremento en la asociación de DIC a fracciones endosomales inducido por BDNF.

La activación del TA retrógrado de endosomas de señalización inducidos por BDNF muestra una marcada re-distribución de la inmunomarca de DIC de la membrana plasmática (**Figuras 18-A, 19-B y 20-B**) hacia el cuerpo celular. Con el fin de evaluar si ese cambio en distribución se debe a una mayor asociación del complejo motor molecular dineína a endosomas de señalización inducido por BDNF, decidimos evaluar la asociación de DIC a endosomas de membrana purificado de células tratadas con BDNF o buffer control. Con tal objetivo en mente, purificamos sinaptosomas de membrana de cerebros totales de rata adultas por centrifugación diferencial como lo describimos en materiales y métodos. Una vez purificados y fraccionados, incubamos dichas fracciones de sinaptosomas con 10 ng/ml de BDNF o buffer control durante 10 minutos a 37°C, para luego separar los endosomas de membrana de la fracción soluble por medio de un paso de centrifugación. Finalmente verificamos la asociación de DIC a la fracción

endosomal por un análisis de Western Blot. Del análisis pudimos observar que aunque la cantidad de DIC asociada a los endosomas tratados con BDNF es mayor comparado con los tratados con buffer control (**Figura 24-B**), la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,629$).

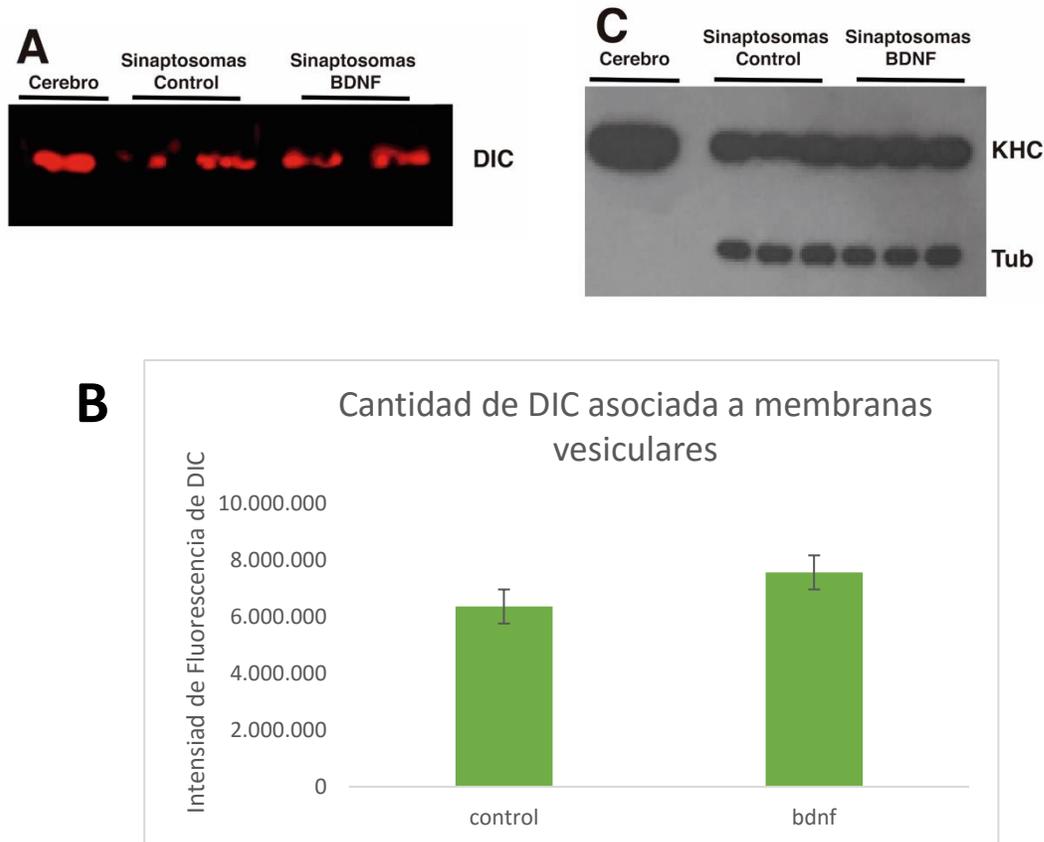


Figura 24. Asociación de DIC a fracciones de sinaptosomas tratados con BDNF y Buffer control. **A)** Análisis por Western Blot de fracciones de sinaptosomas estimulados con buffer control o BDNF (10 ng/ml) durante diez minutos (por duplicado). Inmunomarca para DIC (mAb 74.1). **B)** Cuantificación del Western Blot en A. Cabe destacar que aunque el análisis estadístico no presenta diferencias significativas, DIC presenta una mayor tendencia a asociarse a los sinaptosomas purificados de cerebros de ratas estimulados con BDNF en comparación con los sinaptosomas tratados con buffer control ($n=4$); **C)** Western Blot de las mismas fracciones de sinaptosomas en A (por triplicado). Observe que no hay diferencias

significativas en la asociación de kinesina-1 tanto para sinaptosomas control como los estimulados por BDNF. La inmunomarca para tubulina (mAb clon YL1-2) muestra igual carga de proteína total en todos los carriles del Western Blot.

DISCUSION

Los resultados experimentales de la presente tesina identificaron una nueva vía de señalización que resulta en la activación TA retrógrado. Esta activación es mediada por la fosforilación de la cadena intermedia del complejo motor dineína inducida por la estimulación celular con el factor neural derivado de cerebro. Observamos que BDNF promueve la fosforilación de DIC en neuronas primarias derivadas de embriones de rata (**Figura 7**). De las múltiples vías de señalización en las que participa BDNF (**Figura 2**), nosotros proporcionamos evidencias bioquímicas y farmacológicas que BDNF media la activación de la vía TrkB-SFK-PKD1. Esta vía específica resulta en la fosforilación de DIC (**Figura 8**). Además vimos que tanto Fyn como Src, miembros de una familia de SFK son capaces de activar el TA retrógrado (**Figura 10 y 11**). Asimismo, observamos que esta activación del TA retrógrado mediada por SFK es mediada por PKC ya que co-perfusión de Src con MARKS, a péptido sustrato para PKC, previene completamente la activación del TA retrógrado (**Figura 11B**). Estos resultados predicen que la perfusión de la subunidad catalítica de PKC debería tener un efecto similar al inducido por Src lo cual fue corroborado con axoplasmas de calamar perfundidos con la PKC (**Figura 11C**).

Para determinar cuál miembro de la familia de las PKC sería responsable de la activación del TA retrógrado, utilizamos dos inhibidores farmacológicos (**Figura 12A**) que cubre un amplio espectro de los miembros de PKC (Gö6983 y Gö6976). Estos experimentos determinaron que PKC μ sería el responsable de la activación del TA retrógrado (**Figura 12 B y C**). Con esta información farmacológica en mano, decidimos evaluar si la perfusión de PKC μ podía activar al TA retrógrado. Efectivamente, la perfusión de PKD1 activa el TA retrógrado de vesículas de membrana en axoplasmas extruidos y aislados de calamar (**Figura 13A**).

La activación del TA retrógrado de endosomas de membrana en neuronas requiere de la asociación del complejo motor dineína a dichos endosomas de señalización a ser transportados. Esta asociación debería evidenciarse como un cambio o redistribución del complejo motor dineína desde la membrana plasmática hacia el interior neuronal. Mediante el uso de diferentes técnicas de fijación y microscopía confocal de alta resolución (**Figura 15 y 16**) pudimos observar que luego de la estimulación con BDNF, la inmunomarca para DIC, la subunidad responsable de la unión del complejo motor dineína a endosomas de

membrana, sufre una redistribución desde la periferia celular hacia el interior, tanto en neuronas primarias derivadas de embriones de rata, como de células embrionarias humanas HEK-293 (**Figuras 18-A, 19-B y 20-B**). En una situación control, es decir sin estimulación con BDNF, la inmunomarca para DIC se encuentra mayoritariamente concentrada en la periferia celular a modo de anillo como lo muestran las microfotografías de las **Figuras 17-A, 19-A y 20-A** y los correspondientes análisis de distribución en las **Figuras 17-B, 19-C y 20-C**.

La estimulación celular por la neurotrofina BDNF activa al receptor tirosina quinasa específico TrkB, el cual genera una cascada de señalización interna que resulta en la activación del TA retrógrado. La inactivación de TrkB debería resultar en una inhibición del TA retrógrado de endosomas de señalización y por ende no evidenciar una redistribución de DIC. Nuestros resultados con inhibidores farmacológicos para proteínas tirosina quinasas (K252a) que inhibe a TrkB, revelaron una distribución periférica de la inmunomarca para DIC luego de que las células fueran estimuladas con BDNF. Esta inmunomarca es cualitativamente muy similar a la inmunomarca de células tratadas con buffer control, es decir sin BDNF, como lo muestra la **Figura 21-A** y su análisis de distribución **Figura 21-B**.

Como los miembros de la familia de proteínas tirosina quinasa Src y Fyn pueden ser activados por la asociación de BDNF a TrkB, y a su vez, la localización de DIC es regulada por la actividad de TrkB inducida por BDNF, decidimos evaluar si inhibidores farmacológicos de Src y Fyn podían prevenir la redistribución de la inmunomarca para DIC en células estimuladas por BDNF. En contra de lo esperado por los resultados previos, el potente inhibidor de Src y Fyn su6656 (50 μ M) no previno la redistribución de la inmunomarca para DIC inducido por BDNF (**Figura 22**) en células HEK-293. Esto podría sugerir que en neuronas de mamíferos, la distribución subcelular de DIC depende de la activación de TrkB por parte de BDNF, pero no directamente por la actividad de Src y Fyn como observamos en el modelo de axoplasma de calamar. De una manera muy similar, el inhibidor peptídico específico para PKC μ no impidió la redistribución de la inmunomarca para DIC en células co-tratadas con BDNF (**Figura 23**). Sin embargo, cabe mencionar que la línea celular HEK-293 podría no ser el mejor modelo para evaluar la distribución de DIC mediada por BDNF. En este sentido, resultados preliminares con cultivos de neuronas primarias derivadas de corteza de rata incubadas con BDNF y su6656 (50 μ M) o el péptido inhibidor de PKC μ pareciera que efectivamente previene la re-distribución de la inmunomarca para DIC. Más experimentos son necesarios para confirmar dichos resultados.

La activación del TA retrógrado de endosomas de membrana requiere de la asociación del complejo motor dineína a dichos endosomas de señalización a ser transportados. Esta asociación debería evidenciarse como un cambio en asociación del complejo motor dineína a las membranas de los mismos cuando las neuronas son estimuladas con el factor trófico BDNF. Del análisis cuantitativo por Western Blot se puede observar que DIC presentaría una mayor tendencia a asociarse a los sinaptosomas purificados de cerebros de ratas estimulados con BDNF en comparación con los sinaptosomas tratados con buffer control (**Figura 24-A**). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,629$) (**Figura 24-B**).

Las distintas vías de señalización inducidas por BDNF actualmente descritas, en términos generales describen la participación de la neurotrofina en la activación de la transcripción de genes importantes para la supervivencia neuronal, así como también en la regulación de eventos de plasticidad neuronal y sináptica (**Figura 2**). Tomados nuestros resultados experimentales en conjunto nos permite proponer que BDNF participa de una nueva vía de señalización la cual juega un rol clave en la activación del TA retrógrado de endosomas de membrana. Esta nueva cascada de señalización involucra la asociación de BDNF a su receptor específico TrkB y su activación, y la posterior activación aguas abajo de proteínas tirosina quinasas (SFKs) de la familia de Src. Estos eventos moleculares promueven la activación de PKD1 (BDNF-TrkB-Src/Fyn-PKD1). La activación de esta vía es responsable de la posterior fosforilación de DIC. La consecuencia funcional de la fosforilación de DIC es la de inducir la asociación del complejo motor dineína a los endosomas de membrana y posterior activación de su transporte axonal retrógrado (**Figura 25**).

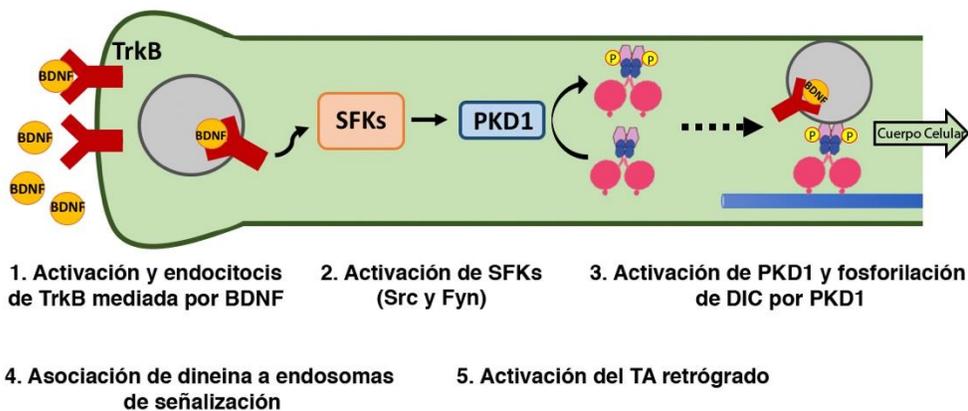


Figura 25. Modelo de activación del transporte axonal retrógrado inducido por BDNF. 1. BDNF se asocia a TrkB el cual activa una cascada de señalización que

resulta en la endocitosis del receptor activo. 2 TrkB activa SFKs (Src y Fyn), un subgrupo de proteínas tirosina quinasas no receptoras. 3 SFKs activan a PKD1. 4 Fosforilación de DIC por PKD1 induce la asociación del complejo motor dineína a endosomas de membrana. 5 La asociación de dineína a los endosomas de señalización activa su transporta axonal retrógrado.

BIBLIOGRAFIA

1. Hefti, F., *Pharmacology of neurotrophic factors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 239-67.
2. Binder, D.K. and H.E. Scharfman, *Brain-derived neurotrophic factor*. Growth Factors, 2004. **22**(3): p. 123-31.
3. Levi-Montalcini, R. and V. Hamburger, *Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo*. J Exp Zool, 1951. **116**(2): p. 321-61.
4. Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. EMBO J, 1982. **1**(5): p. 549-53.
5. Hallbook, F., C.F. Ibanez, and H. Persson, *Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary*. Neuron, 1991. **6**(5): p. 845-58.
6. Taleisnik, S., *Receptores Celulares y la Traducción de Señales*. 2006.
7. Duman, R.S. and B. Voleti, *Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents*. Trends Neurosci, 2012. **35**(1): p. 47-56.
8. Huang, Y.Z. and J.O. McNamara, *Mutual regulation of Src family kinases and the neurotrophin receptor TrkB*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8207-17.
9. Boltaev, U., et al., *Multiplex quantitative assays indicate a need for reevaluating reported small-molecule TrkB agonists*. Sci Signal, 2017. **10**(493).
10. Balkowiec, A., D.L. Kunze, and D.M. Katz, *Brain-derived neurotrophic factor acutely inhibits AMPA-mediated currents in developing sensory relay neurons*. J Neurosci, 2000. **20**(5): p. 1904-11.
11. Takasu, M.A., et al., *Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors*. Science, 2002. **295**(5554): p. 491-5.
12. Nagano, T., et al., *Brain-derived neurotrophic factor upregulates and maintains AMPA receptor currents in neocortical GABAergic neurons*. Mol Cell Neurosci, 2003. **24**(2): p. 340-56.
13. Cunha, C., R. Brambilla, and K.L. Thomas, *A simple role for BDNF in learning and memory?* Front Mol Neurosci, 2010. **3**: p. 1.
14. Ito, K. and H. Enomoto, *Retrograde transport of neurotrophic factor signaling: implications in neuronal development and pathogenesis*. J Biochem, 2016. **160**(2): p. 77-85.
15. Zheng, J., et al., *Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13280-8.
16. Shao, Y., et al., *Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes*. J Cell Biol, 2002. **157**(4): p. 679-91.
17. Valdez, G., et al., *Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors*. J Neurosci, 2005. **25**(21): p. 5236-47.

18. Zweifel, L.S., R. Kuruvilla, and D.D. Ginty, *Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling*. *Nat Rev Neurosci*, 2005. **6**(8): p. 615-25.
19. Ye, H., et al., *Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons*. *Neuron*, 2003. **39**(1): p. 57-68.
20. Heerssen, H.M., M.F. Pazyra, and R.A. Segal, *Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons*. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(6): p. 596-604.
21. Morfini, G., Stenoien, DL., Brady, ST., *Axonal Transport*, in *Basic Neurochemistry*, R.W.A. G. Siegel, S.T. Brady, and D. Price, Editor. 2006, Elsevier Academic Press: Boston, MA. p. 485-502.
22. Reid, E., et al., *A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10)*. *Am J Hum Genet*, 2002. **71**(5): p. 1189-94.
23. Hafezparast, M., et al., *Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport*. *Science*, 2003. **300**(5620): p. 808-12.
24. Hirokawa, N. and R. Takemura, *Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons*. *Nat Rev Neurosci*, 2005. **6**(3): p. 201-14.
25. Morfini, G., Stenoien, DL., Brady, ST., *Basic Neurochemistry*. 7th ed, ed. R.W.A. G. Siegel, S.T. Brady, and D. Price. 2005.
26. Wagner, M.C., et al., *Purification of kinesin from bovine brain and assay of microtubule-stimulated ATPase activity*. *Methods Enzymol.*, 1991. **196**: p. 157-175.
27. Leopold, P.L., et al., *Association of kinesin with characterized membrane-bounded organelles*. *Cell Motil.Cytoskeleton*, 1992. **23**: p. 19-33.
28. DeBoer, S.R., et al., *Conventional kinesin holoenzymes are composed of heavy and light chain homodimers*. *Biochemistry*, 2008. **47**(15): p. 4535-43.
29. Stenoien, D.L. and S.T. Brady, *Immunochemical analysis of kinesin light chain function*. *Mol Biol Cell*, 1997. **8**(4): p. 675-89.
30. Vale, R.D., *The molecular motor toolbox for intracellular transport*. *Cell*, 2003. **112**(4): p. 467-80.
31. Hirokawa, N., S. Niwa, and Y. Tanaka, *Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease*. *Neuron*, 2010. **68**(4): p. 610-38.
32. Carter, A.P., *Crystal clear insights into how the dynein motor moves*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 3): p. 705-13.
33. Vaughan, P.S., J.D. Leszyk, and K.T. Vaughan, *Cytoplasmic dynein intermediate chain phosphorylation regulates binding to dynactin*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 26171-9.
34. Pfister, C. and P. Wolf, *Dynamic monitoring of cellular metabolic activity in combination with live cell imaging*. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2015. **2015**: p. 7095-8.
35. Morfini, G., et al., *Regulation of kinesin: implications for neuronal development*. *Dev Neurosci*, 2001. **23**(4-5): p. 364-76.
36. Hollenbeck, P.J., *Kinesin heavy and light chains are phosphorylated in vivo in neurons*. *J. Cell Biol.*, 1990. **115**: p. 390a (abstract).

37. Donelan, M.J., et al., *Ca²⁺-dependent dephosphorylation of kinesin heavy chain on beta-granules in pancreatic beta-cells. Implications for regulated beta-granule transport and insulin exocytosis.* J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24232-42.
38. Morfini, G., et al., *Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility.* EMBO J, 2002. **21**(3): p. 281-93.
39. Morfini, G., et al., *A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons.* EMBO J, 2004. **23**(11): p. 2235-45.
40. Gibbs, K.L., L. Greensmith, and G. Schiavo, *Regulation of Axonal Transport by Protein Kinases.* Trends Biochem Sci, 2015. **40**(10): p. 597-610.
41. Brady, S.T., et al., *Fast Axonal Transport in Isolated Axoplasm.* Cell Motil. Cytosk., 1990. **17** (Video Supplement 2): p. 22.
42. Morfini, G.A., et al., *Axonal transport defects in neurodegenerative diseases.* J Neurosci, 2009. **29**(41): p. 12776-86.
43. Brady, S.T. and G.A. Morfini, *Regulation of motor proteins, axonal transport deficits and adult-onset neurodegenerative diseases.* Neurobiol Dis, 2017. **105**: p. 273-282.
44. Zamponi, E., et al., *Prion protein inhibits fast axonal transport through a mechanism involving casein kinase 2.* PLoS One, 2017. **12**(12): p. e0188340.
45. Morfini, G.A., et al., *Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin.* Nat Neurosci, 2009. **12**(7): p. 864-71.
46. Pigino, G., et al., *Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(14): p. 5907-12.
47. Capsoni, S., et al., *Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6826-31.
48. Zuccato, C. and E. Cattaneo, *Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases.* Nat Rev Neurol, 2009. **5**(6): p. 311-22.
49. Phillips, H.S., et al., *BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease.* Neuron, 1991. **7**(5): p. 695-702.
50. Murer, M.G., Q. Yan, and R. Raisman-Vozari, *Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease.* Prog Neurobiol, 2001. **63**(1): p. 71-124.
51. Ferrer, I., et al., *Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease.* Brain Res, 2000. **866**(1-2): p. 257-61.
52. Schindowski, K., K. Belarbi, and L. Buee, *Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport.* Genes Brain Behav, 2008. **7** Suppl 1: p. 43-56.
53. Ye, X., W. Tai, and D. Zhang, *The early events of Alzheimer's disease pathology: from mitochondrial dysfunction to BDNF axonal transport deficits.* Neurobiol Aging, 2012. **33**(6): p. 1122 e1-10.
54. Poon, W.W., et al., *beta-Amyloid impairs axonal BDNF retrograde trafficking.* Neurobiol Aging, 2009.
55. Fang, F., et al., *Synuclein impairs trafficking and signaling of BDNF in a mouse model of Parkinson's disease.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3868.
56. Siegel, G.J. and N.B. Chauhan, *Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain.* Brain Res Brain Res Rev, 2000. **33**(2-3): p. 199-227.

57. Thoenen, H. and M. Sendtner, *Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches*. Nat Neurosci, 2002. **5 Suppl**: p. 1046-50.
58. Dillman, J.F. and K.K. Pfister, *Differential phosphorylation in vivo of cytoplasmic dynein associated with anterogradely moving organelles*. J. Cell Biol., 1994. **127**: p. 1671-1681.
59. Kaech, S. and G. Banker, *Culturing hippocampal neurons*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2406-15.
60. Gschwendt, M., et al., *Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes*. FEBS Lett, 1996. **392**(2): p. 77-80.
61. Martiny-Baron, G., et al., *Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976*. J Biol Chem, 1993. **268**(13): p. 9194-7.
62. Behrens, M.M., U. Strasser, and D.W. Choi, *Go 6976 is a potent inhibitor of neurotrophin-receptor intrinsic tyrosine kinase*. J. Neurochem., 1999. **72**(3): p. 919-924.
63. Harikumar, K.B., et al., *A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(5): p. 1136-46.
64. Ni, Y., et al., *PKD1 mediates negative feedback of PI3K/Akt activation in response to G protein-coupled receptors*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73149.
65. Greenberg, S.G. and R.J. Lasek, *Neurofilament protein synthesis in DRG neurons decreases more after peripheral axotomy than after central axotomy*. J. Neurosci., 1988. **8**: p. 1739-1746.
66. Frankel, A.D. and C.O. Pabo, *Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus*. Cell, 1988. **55**(6): p. 1189-93.
67. Horinouchi, T., et al., *Using Phos-Tag in Western Blotting Analysis to Evaluate Protein Phosphorylation*. Methods Mol Biol, 2016. **1397**: p. 267-277.
68. Howe, C.L. and W.C. Mobley, *Signaling endosome hypothesis: A cellular mechanism for long distance communication*. J Neurobiol, 2004. **58**(2): p. 207-16.
69. Whyte, J., et al., *Phosphorylation regulates targeting of cytoplasmic dynein to kinetochores during mitosis*. J Cell Biol, 2008. **183**(5): p. 819-34.
70. Mitchell, D.J., et al., *Trk Activation of the ERK1/2 Kinase Pathway Stimulates Intermediate Chain Phosphorylation and Recruits Cytoplasmic Dynein to Signaling Endosomes for Retrograde Axonal Transport*. J Neurosci, 2012. **32**(44): p. 15495-510.
71. Brill, L.B., 2nd and K.K. Pfister, *Biochemical and molecular analysis of the mammalian cytoplasmic dynein intermediate chain*. Methods, 2000. **22**(4): p. 307-16.
72. Wilson, M.B., et al., *Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis*. Oncogene, 2002. **21**(53): p. 8075-88.
73. Filippakopoulos, P., S. Muller, and S. Knapp, *SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(6): p. 643-9.

74. Morfini, G., et al., *1-Methyl-4-phenylpyridinium affects fast axonal transport by activation of caspase and protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(7): p. 2442-7.
75. Murugappan, S., et al., *Differential regulation of threonine and tyrosine phosphorylations on protein kinase Cdelta by G-protein-mediated pathways in platelets*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 113-20.
76. Senis, Y.A., A. Mazharian, and J. Mori, *Src family kinases: at the forefront of platelet activation*. Blood, 2014. **124**(13): p. 2013-24.
77. Blake, R.A., et al., *SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(23): p. 9018-27.
78. Green, M. and P.M. Loewenstein, *Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein*. Cell, 1988. **55**(6): p. 1179-88.