

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Doctorado en Neurociencias



“Rol de la Proteína Quinasa D1 (PKD1) y sus activadores en el tráfico y la distribución de proteínas de membrana en células de mamífero”



Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

Licenciada Andrea Soledad Coria

Director: Dr. Alberto Marcelo Díaz Añel

Córdoba, 9 de mayo de 2016

Indice

Capítulo 1: “Estudio de la participación de Gαq en la regulación del tráfico intracelular dependiente de PKD1 en células no polarizadas HeLa”.

Resumen	8
Abstract	8
Glosario	8
Objetivo General	9
Introducción	9
Materiales y Métodos	24
<i>Cultivo Celular</i>	24
<i>Constructos y Transfección Celular</i>	25
<i>Inmunofluorescencia y Western Blot</i>	26
<i>Inhibidores frente a PKC y PLC</i>	28
<i>Ensayos de Transporte con VSVG-ts045</i>	28
Resultados	30
<i>Definiendo el rol de las subunidades α de proteínas G en la fisión de vesículas mediada por PKD1</i>	30
<i>GαqQL y su relación con el citoesqueleto de las células HeLa</i>	32
<i>Rol del dominio de palmitoilación en los efectos de GαqQL</i>	33
<i>Rol de PKD1 en la fragmentación del Golgi inducida por Gαq</i>	33
<i>Definiendo el rol de las PKC en la vía iniciada por Gαq</i>	35
<i>Las PI-PLCs como efectoras de la vía mediada por PKD1 y Gαq</i>	37
<i>Regulación del transporte desde el Golgi hacia la membrana plasmática por Gαq</i>	38
Discusión	42
Bibliografía	49

Capítulo 2: “Rol de la Proteína Quinasa D1 (PKD1) y sus activadores en la distribución y funcionalidad de los receptores neurotróficos del tipo Trk”

Resumen	60
Abstract	60
Introducción	61
<i>Factores de Crecimiento: descubrimiento de NGF y BDNF</i>	67
<i>Estructura de las Neurotrofinas</i>	68
<i>Procesamiento y secreción de las Neurotrofinas</i>	71
<i>Síntesis y Secreción de las Neurotrofinas</i>	75
<i>Internalización y transporte retrógrado de las Neurotrofinas</i>	78
<i>Transporte anterógrado de las Neurotrofinas</i>	81
<i>Estructura de los receptores para las Neurotrofinas</i>	84
<i>Señalización de los receptores Tropicomiosina (Trk)</i>	87
<i>Alternativas a la unión del ligando: transactivación de los receptores Trk</i>	88
<i>Efectos de la señalización Trk en el Sistema Nervioso Central</i>	91
<i>Supervivencia neuronal</i>	93
<i>Efectos morfológicos</i>	94
<i>Plasticidad sináptica</i>	95
<i>Receptores TrkB truncados</i>	97
<i>La señalización de Trk en la enfermedad</i>	99
<i>Rol del tráfico de TrkB</i>	101
Objetivo General	103
Objetivos específicos	104
Materiales y métodos	104
<i>Cultivos celulares</i>	104
<i>Preparación de vidrios</i>	106
<i>Medios de cultivo</i>	106
<i>Disección y cultivo de neuronas hipocámpicas</i>	108
<i>Transfección con lipofectamina 2000</i>	108
<i>Ensayos de inmunofluorescencia (IF)</i>	109
<i>Ensayos con Inhibidores de PKCs y PLCs</i>	111

<i>Captura y procesamiento de imágenes por microscopía confocal</i>	112
<i>cLTP en neuronas hipocampales en cultivo</i>	113
<i>Status epilepticus (SE) en cultivo</i>	114
Resultados	116
Objetivo Específico I: “Estudiar el papel de PKD1 en la regulación de la distribución de receptores de neurotrofinas, TrkA y TrkB”	116
Resultados Receptor TrkA	116
<i>Silenciamiento y Dominante Negativa de PKD1 en presencia o ausencia de Factor de Crecimiento Neural (NGF)</i>	116
<i>Silenciamiento de PKD1 y co-transfección con la mutante constitutivamente activa, (Ha-TrkAca)</i>	122
Resultados Receptor TrkB	124
<i>Silenciamiento y Dominante Negativa de PKD1 en presencia o ausencia de Factor de Crecimiento derivado de cerebro (BDNF)</i>	124
<i>Silenciamiento de PKD1 y co-transfección con la mutante kinasa inactiva, (Ha-TrkBkd)</i>	130
Conclusiones Objetivo Específico I	133
Objetivo Específico II: “Determinar si en células polarizadas otros componentes de la vía de señalización que estudiamos, como PKCs y PLCs se encuentran involucrados en a regulación mediada por PKD1 del transporte de TrkA y TrkB”	134
Resultados Receptor TrkA	135
<i>Evaluación de la participación de las proteínas de la vía de activación de PKD1 utilizando inhibidores farmacológicos (Gö6983, Gö6976 y U73122) y mutantes de las PKCα (PKCawt y PKCakd)</i>	135
Resultados Receptor TrkB	144
<i>Evaluación de la participación de las proteínas de la vía de activación de PKD1 utilizando inhibidores farmacológicos (Gö6983, Gö6976 y U73122) y mutantes de las PKCϵ (PKCϵwt, PKCϵkd y PKCϵca)</i>	145
Conclusiones Objetivo Específico II	150
Objetivo Específico III: “Evaluar la funcionalidad y la respuesta a ligandos específicos de TrkA y trkB, en condiciones de una potencial	

deslocalización inducida por el bloqueo de la vía regulatoria del transporte mediada por PKD1”

Resultados Objetivo Específico III	151
<i>Analizar la respuesta de los receptores Trk a sus neurotrofinas específica cuando la distribución de los mismos se ve alterada por la ausencia de actividad PKD1</i>	152
<i>Investigar la funcionalidad del receptor TrkB en ausencia de actividad de PKD1 mediante la medición de su reclutamiento luego de la inducción de cLTP (chemical Long Term Potentiation)</i>	157
<i>Estudiar el comportamiento de los receptores TrkB frente al Status Epiléptico inducido por un medio con ausencia de Mg²⁺</i>	165
Conclusiones Objetivo Específico III	169
Discusión	171
Bibliografía	186

COMISIÓN ASESORA

Dr Alberto M. Díaz Añel, INIMEC-CONICET-UNC

Dr Javier Valdez, CIQUIBIC- CONICET-UNC-

Dr Santiago Quiroga, CIQUIBIC- CONICET-UNC-

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

CAPITULO 1

Estudio de la participación de G α q en la regulación del tráfico intracelular dependiente de PKD1 en células no polarizadas HeLa

Resumen

Las proteínas G heterotriméricas juegan un rol central en la regulación del tráfico intracelular. Particularmente, las subunidades G $\beta\gamma$ se han develado como componentes centrales de la vía de traducción de señales que también involucra a las fosfolipasas C beta (PLC β), proteínas quinasa C (PKC) y a la proteína quinasa D1 (PKD1), cuya función principal sería regular el transporte entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática. Fue a raíz de la participación de las PLC β que se nos decidimos a estudiar el rol de los otros miembros de la familia de proteínas G, las subunidades α , encontrando que la G α q juega un papel esencial en la regulación de la fisión de membranas en el aparato de Golgi.

Abstract

Heterotrimeric G proteins play a central role in the regulation of intracellular trafficking. G $\beta\gamma$ subunits have been shown as central components of the signal traduction pathway that involves phospholipase C beta, (PLC β), protein kinase C (PKC) and protein kinase D1 (PKD1), whose main function is to regulate transport between Golgi and plasma membrane. Based on the participation of the PLC β , we had decided to study the role of the other members of the G protein family, alpha (α) subunits, finding that G α q has a essential role in the regulation of membrane fision in Golgi apparatus.

Glosario

Significado en contexto de palabras tomadas del inglés:

Carrier: representa un intermediario de transporte (por ej. una vesícula).

Clusters: se refiere a un arreglo de receptores en la superficie celular formando un grupo o conjunto.

Sorting: implica la clasificación de una proteína de membrana, proceso que involucra la inclusión de la misma en un intermediario de transporte (por ej. una vesícula). Tal clasificación asegura el transporte hacia el destino final correcto en la célula.

Missorting: proceso que involucra la inclusión incorrecta de una proteína en un intermediario de transporte (por ej. una vesícula). Tal clasificación realizada de modo inadecuado produce el transporte de dicha proteína hacia un destino final incorrecto.

Targeting: implica el direccionamiento apropiado de por ejemplo una proteína de membrana hacia su destino final correcto.

Objetivo General

Estudiar la participación de las subunidades α de proteínas G heterotriméricas en la regulación de la fisión de las vesículas que se transportan entre el Golgi y la superficie celular, y determinar si son capaces de activar una vía de señalización equivalente a la iniciada por $\beta_1\gamma_2$ y $\beta_3\gamma_2$ para inducir la traslocación y activación de PKD1.

Introducción

En los organismos multicelulares desde *Caenorhabditis elegans* al *Homo sapiens*, el mantenimiento de la homeostasis es dependiente del flujo y procesamiento continuo de la información a través de una red compleja de células. Sin embargo, para que el organismo responda a un medio ambiente siempre cambiante, las señales inter e intracelulares deben ser transducidas, amplificadas y finalmente convertidas en la respuesta fisiológica apropiada.

La resolución de los eventos moleculares que subyacen la respuesta e integración a las señales

forman la base del campo de investigación de la transducción de señales.

Un grupo altamente conservado de moléculas conocido como las proteínas de unión a nucleótidos de guanina (*G proteins*= *guanine nucleotide binding proteins*) son los determinantes claves de las características de especificidad y temporalidad de muchos procesos de señalización.

Numerosas hormonas, neurotransmisores, quimoquinas, mediadores locales, lípidos, estímulos ambientales y sensoriales, como la luz, olores y sabores, ejercen sus efectos en las células a través de la unión con receptores de membrana heptahelicoidales acoplados a proteínas G (*GPCRs*= *G Protein Coupled Receptors*). Estos transductores altamente especializados pueden modular la actividad de múltiples vías de señalización que llevan a las diversas respuestas biológicas. Más de cien de los mencionados receptores son conocidos, y muchos más están siendo descubiertos continuamente.

Las proteínas G heterotriméricas transducen la unión de los ligandos extracelulares a estos receptores, los cuales generan las respuestas intracelulares que desencadenan a su vez respuestas fisiológicas en los tejidos y organismos. (Cabrera-Vera *et al.*, 2003), por lo cual estas proteínas G son mediadoras de un gran número de respuestas fisiológicas. La desregulación de estas vías contribuye a muchas enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades del corazón, hipertensión, desórdenes endocrinos y ceguera. (Marrari *et al.*, 2007).

En vivo, la combinación específica de subunidades de proteínas G es requerida para la conexión de receptores individuales a las vías de señalización. Los determinantes estructurales de los complejos receptores/proteínas G/efectores no son completamente entendidos aún, porque además de la interacción de los dominios de estas proteínas de acción primarias también se requiere la participación de proteínas reguladoras de anclaje, además de cambios conformacionales en sus estructuras (Cabrera-Vera *et al.*, 2003).

Las proteínas G están formadas por subunidades α , β y γ , las cuales poseen gran diversidad génica, conociéndose actualmente veinte variantes para las α , seis para las β y doce para las γ . Existe una expresión y localización subcelular específica de los complejos formados por las subunidades α ,

β y γ , que según el tipo celular juegan roles importantes en la especificidad de la señal.

Existen cuatro clases principales de proteínas G que pueden ser distinguidas como: G_s (estimuladora) que es responsable de la activación de Adenil Ciclasa; G_i (inhibidora), que inhibe a la Adenil Ciclasa, participando además de señales mitogénicas y de la regulación positiva de la acción de insulina; $G_{q/11}$, la cual activa a la fosfolipasa C (PLC), principalmente a la isoforma β (PLC β), estimulando también a la tirosina quinasa de Bruton (*Btk*= *Bruton's tyrosine kinase*), lo cual afecta las respuestas migratorias de los fibroblastos a la trombina, observándose además un bloqueo en la función plaquetaria en ratones que no expresan este tipo de subunidades α (ratones KO para $G_{\alpha q}$ -/-); y por último las G_{12} y G_{13} , las cuales comprenden la clase α_{12} de G_{α} que regula un gran número de vías involucradas en el crecimiento celular y la diferenciación. (Dhanasekaran *et al.*, 1998). Las actividades celulares reguladas por α_{13} incluyen la transformación oncogénica de los fibroblastos, el intercambio Na^+/H^+ , las vías de la quinasa N-terminal de c-Jun (JUNK) y de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), la fosforilación por tirosina, la apoptosis, la formación de las fibras de estrés de actina, la retracción neurítica, el ensamblaje de las adhesiones focales y la expresión génica mediada por los elementos de respuesta a AMPc. Algunas de estas vías requieren de las pequeñas GTPasas Rho, pudiendo además α_{12} y α_{13} estimular la formación de las formas activas de Rho A unida a GTP en las células en cultivo. (Kranenburg *et al.*, 1999).

En cuanto al mecanismo de activación/inactivación de las proteínas G, se las considera inactivas cuando la subunidad α permanece unida al nucleótido GDP, preservándose el estado heterotrimérico ($G_{\alpha,\beta,\gamma}$ -GDP), siendo activadas por la unión de los ligandos a sus GPCRs asociados, que a su vez les causan un cambio conformacional por el cual se libera el GDP unido, produciéndose un intercambio de nucleótidos de guanina, lo que genera la unión de GTP a la subunidad α y la separación de dicha subunidad de las $\beta\gamma$ (G_{α} -GTP + $\beta\gamma$). (Hamm 1998). Con excepción de β_5 , las subunidades G_{β} y G_{γ} parecen estar asociadas irreversiblemente y existir como dímeros $\beta\gamma$, ya sea como subunidades $G_{\beta\gamma}$ libres o unidas a G_{α} . (Sondek y Siderovski 2001).

Generalmente, las proteínas G se encuentran unidas a la membrana plasmática desde dónde

interactúan con los GPCRs, pero también existen reportes que indican que su localización puede variar según si se encuentran en estado basal o activado. La localización subcelular de las mismas juega un rol importante en la regulación de la especificidad de señalización por proteínas G.

Para ser activadas por receptores GPCR de superficie celular, las proteínas G deben estar localizadas en la superficie interna de la membrana plasmática de las células. Como proteínas periféricas asociadas a membrana, las proteínas G requieren mecanismos que les permitan una fuerte unión a membrana, para lo cual deben pasar por numerosas modificaciones post-traduccionales, entre las que se incluyen la miristoilación y/o palmitoilación para las $G\alpha$, y la isoprenilación para las $G\gamma$. La unión a estos lípidos juega un rol esencial para el anclaje hidrofóbico que localiza a las subunidades de las proteínas G en la membrana. Sin embargo, la localización de las proteínas G es dinámica, y su activación puede producir una distribución reversible de $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ en subdominios discretos de membrana o en diferentes regiones de la célula. (Sondek y Siderovski 2001).

El direccionamiento de las subunidades β en la membrana plasmática requiere de la asociación con subunidades γ isopreniladas en su región carboxilo terminal (CAAX box). Las subunidades α se unen a la membrana plasmática como resultado de una palmitoilación y/o miristoilación amino terminal y de la asociación con las subunidades $\beta\gamma$. Una subunidad γ que se localiza incorrectamente en la mitocondria puede causar que β y α también pierdan su posicionamiento celular normal. Por otro lado, se ha observado que cuando α_s es dirigida a la mitocondria, $\beta_1\gamma_2$ colocalizan en la misma región.

Se ha demostrado que las $G\beta\gamma$ son importantes para dirigir a las subunidades α hacia combinaciones $\beta\gamma$ específicas, exhibiendo diferentes habilidades para restablecer el direccionamiento hacia la membrana plasmática de las subunidades α_s y α_q mutantes con capacidades disminuidas en la interacción con $\beta\gamma$. Hasta hace pocos años no había sido reportado un rol para las subunidades β en la ubicación de las proteínas G, pero tiempo después se encontró que la subunidad β dirige a γ en aquellos complejos que contienen β_1 y γ_2 localizadas en la membrana plasmática, mientras que aquellas conteniendo β_5 se acumulan en el citosol o en las membranas intracelulares.

Los diferentes patrones de localización obtenidos con complejos $\beta\gamma$ indican que ambos β y γ juegan roles en determinar la localización subcelular. Aunque estos roles parecen ser diferentes, el papel de la subunidad β está en determinar dónde se localiza el dímero en la membrana plasmática o en las membranas intracelulares. En contraste, la subunidad γ generalmente determina el grado de asociación a membrana pero no especifica si el dímero se localiza en membrana plasmática o en membranas intracelulares.

Todos estos resultados indicarían que las subunidades α , β y γ de las proteínas G juegan roles muy importantes para su localización mutua en la membrana plasmática. (Hynes *et al.*, 2004).

En relación al tráfico intracelular de estas subunidades luego de ser sintetizadas en la célula, es importante destacar que la sobreexpresión de $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ permite una localización en membrana plasmática independiente del Golgi, pero sin embargo, cuando el GPCR es también sobreexpresado, el mecanismo se hace dependiente de esta organela.

Cuando una $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ se ensamblan dentro de un complejo intracelular con un GPCR, el complejo sigue la típica vía secretoria, como se esperaría para un GPCR transmembrana. Pero las proteínas G pueden utilizar diferentes vías de tráfico dependiendo de las proteínas adicionales que preforman los complejos de señalización. Una explicación alternativa para la necesidad de la participación de las organelas, como el retículo endoplásmico (RE) y potencialmente el Golgi, para la localización de estos complejos en la membrana plasmática, es que en ellas se encuentran las enzimas críticas necesarias para las modificaciones post-traduccionales de todas las subunidades de las proteínas G heterotriméricas (Hynes *et al.*, 2004).

El direccionamiento de las proteínas $G\alpha$, β y γ heterotriméricas a membrana ha sido investigado en células vivas utilizando subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ dirigidas con mutantes espectrales de la proteína fluorescente verde (GFP=*Green Fluorescent Protein*), la cual es una proteína hidrofílica que se localiza homogéneamente a lo largo del citosol y el nucleoplasma. Con el seguimiento del GFP unido a las distintas subunidades se concluyó que la formación del heterotrímero ocurre en el Golgi.

Se sabe actualmente que la localización en la membrana plasmática es mayormente una

consecuencia de la asociación con $G\alpha$. Esta observación sugiere que mientras la CAAX (la región carboxilo terminal que es prenilada en las subunidades $G\gamma$) es procesada, el tráfico de $G\beta\gamma$ se da desde el citosol hacia el RE y luego al Golgi y superficie celular, mientras que la asociación con $G\alpha$ toma lugar en el Golgi, un compartimiento en el cual reside la actividad palmitoiltransferasa (Apolloni *et al.* 2000). Si se expresa una $G\alpha$ que no puede ser palmitoilada en las cisteínas del amino terminal por una mutación de estos aminoácidos a serina, la misma forma un complejo con $G\beta\gamma$ que se acumula en el RE al no poder translocarse a la membrana plasmática.

El tráfico de las proteínas G luego de la estimulación del receptor se da una vez que las mismas alcanzan la membrana plasmática, ya que no residen estáticamente allí, sino que pueden pasar por procesos de activación dependiente de traslocación desde la membrana plasmática al citoplasma seguido del reciclaje hacia la membrana.

Lo que se sabe con respecto al tráfico de las proteínas G después de la activación del receptor, se basa mayormente en las observaciones de la redistribución de α_s después de la estimulación por el agonista del receptor α_2 -adrenérgico.

Sin embargo, existen nuevos reportes que han descrito el tráfico dependiente de receptor para α_q y $G\beta\gamma$, así como también hay nuevos datos acerca del tráfico de α_s . Adicionalmente, la proteína G específica del fotorreceptor de vertebrados, la transducina, que es formada por subunidades α_t y $\beta_1\gamma_1$, se trasloca fuera de las membranas luego de la activación. En comparación con α_s , existe mucha menos evidencia con respecto a la activación e internalización de las otras subunidades α .

Interesantemente, se ha observado el mismo fenómeno en $G\beta\gamma$, la cual parece ser capaz de tener una distribución dependiente del receptor desde la membrana plasmática. Se ha propuesto un modelo en el que una interacción de alta afinidad de la subunidad α con el GPCR inhibe la translocación de $G\beta\gamma$, pero una interacción de menor afinidad permitiría su rápida traslocación. (Akgoz *et al.* 2006). Lo anteriormente expuesto sugiere que $G\beta\gamma$ podría redistribuirse en la célula en respuesta a la activación del GPCR. Los mecanismos de tráfico de las subunidades de proteínas G después de la estimulación del receptor aún no han podido ser comprendidos en su totalidad. Es de

suponerse que al menos los eventos iniciales involucrados en la despalmiteoilación y liberación desde la membrana plasmática de α_s y α_q serían un resultado directo de la activación, es decir de la unión de GTP a $G\alpha$.

En resumen, las subunidades α_s activadas, y posiblemente también las α_q , se transportarían desde la membrana plasmática hacia el interior de las células siguiendo una vía que es independiente de las vías de endocitosis de GPCR y que podría involucrar *lipids rafts*. Después de la internalización, α_s y α_q recuperarían la localización en la membrana plasmática una vez que el agonista del GPCR es removido, sugiriendo un proceso de reciclaje activo.

Por otro lado, poco se sabe sobre el mecanismo de reciclaje de las proteínas G internalizadas, pero en el caso de α_s aparentemente se reciclaría utilizando vesículas que contienen Rab11, proceso que fuera descrito en células HEK293. En *Drosophila* se ha observado que el reciclaje de α_q sería dependiente de los niveles de $G\beta\gamma$. Por lo visto, tanto el direccionamiento inicial de una $G\alpha$ hacia la membrana como su reciclaje final requerirían de la interacción con $G\beta\gamma$. También existen evidencias que indicarían que para este proceso se necesitaría la colaboración de los motores moleculares, pero esto solo se ha visto en *Drosophila* y aún no se ha comprobado en otras líneas o tipos celulares. (Marrari *et al.*, 2007).

En el laboratorio de Malhotra en los años noventa se encontró un producto marino natural llamado Ilimaquinona (IQ), el cual convertía al aparato de Golgi en pequeñas vesículas (Takizawa *et al.* 1993). En base a esos resultados, se supuso que IQ era la responsable de sobreactivar la reacción de fisión de membrana del aparato de Golgi en pequeñas vesículas, por lo cual esta fragmentación del Golgi mediada por IQ podría revelar los componentes de la reacción fisión de membrana. Mediante ensayos con este compuesto que se llevaron a cabo en células permeabilizadas, se encontró que se requería de la participación de subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G heterotriméricas y de una serina/treonina quinasa conocida como Proteína Quinasa D1 (PKD1). (Jamora *et al.* 1997, 1999). Posteriormente se pudo develar que estos componentes eran también requeridos para la formación en la cisterna trans del Golgi (TGN o *trans-Golgi network*) de los *carriers* de transporte que tienen como

destino final la membrana plasmática. (Maeda *et al.* 2001, Yeaman *et al.* 2004). Luego se observó que durante el transporte de proteínas se generaría un *pool* de diacilglicerol (DAG; Baron y Malhotra 2002), el cual reclutaría a la PKD1 a través de su primer dominio de cisteína hacia un sitio específico del TGN. Se postuló entonces que el complejo G $\beta\gamma$ activaría a la PKD1, y que esta reclutaría y/o activaría los efectores cascada abajo necesarios para llevar a cabo la fisión de membranas en el TGN. Para comprender con detalle el mecanismo del transporte mediado por PKD1 y la formación y regulación de los *carriers* de transporte, se inició la búsqueda de las subunidades específicas de G $\beta\gamma$ involucradas en este proceso, las cuales resultaron ser $\beta 1\gamma 2$ y $\beta 3\gamma 2$ dentro de las veinticinco combinaciones diferentes de G $\beta\gamma$ que se estudiaron (Díaz Añel y Malhotra 2005).

Desde el descubrimiento de IQ y su rol en la fragmentación del Golgi, una gran variedad de proteínas reguladoras del tráfico intracelular se han descrito, así como también sus localizaciones subcelulares e interacciones físicas, las cuales nos han permitido comprender cómo se encuentran configuradas las vías de señalización que involucran el transporte de vesículas. Estos componentes actualmente incluyen a las proteínas G heterotriméricas, especialmente a las subunidades $\beta\gamma$, proteínas quinasas, como las PKC (Díaz Añel y Malhotra 2005) y PKD1 (Jamora *et al.* 1997, 1999), y lípidos como el DAG (Baron y Malhotra 2002).

La PKD1 es una serina/treonina quinasa que ocupa una posición única en la vía de transducción de señales iniciada por el Diacilglicerol (DAG) y la Proteína Quinasa C (PKC) (Van Lint *et al.*, 2002). Esta quinasa, también conocida inicialmente como PKC μ , y otras dos serina/treonina quinasas similares en estructura total y secuencia primaria de aminoácidos a la PKD1, posteriormente identificadas como PKD2 y PKC ν /PKD3, constituyen una nueva familia dentro del grupo de proteínas quinasas dependiente de Ca²⁺/Calmodulina, y separada de las PKCs identificadas previamente. Las características sobresalientes de la estructura de las PKD incluyen la región reguladora N-terminal que contiene unos motivos tipo dedos de zinc ricos en repeticiones en tándem de cisteína (llamado dominio rico en cisteína o CRD= *cysteine rich domain*) que confiere alta afinidad para la unión de los ésteres de forbol y el DAG, seguido de un dominio homólogo a pleckstrina

(dominio PH) que regula negativamente la actividad catalítica.

La región C-terminal de las PKD contiene un dominio catalítico Ser/Thr quinasa, el cual está lejanamente relacionado a las quinasas reguladas por Ca^{2+} . En las células no estimuladas, la PKD es mantenida en un estado de baja actividad catalítica por el dominio N-terminal, el cual reprime la actividad catalítica de la enzima por autoinhibición. Consistente con este modelo, las depleciones o sustituciones de amino ácidos simples en el dominio PH, o su total delección, resultan en una actividad quinasa constitutivamente activa.

Entre las funciones de la quinasa que estudiamos, la PKD1, se encuentran la regulación de los eventos de membrana, citoplasmáticos y nucleares, además de estar involucrada en otros procesos biológicos, como por ejemplo el tráfico vesicular, la supervivencia celular, migración, diferenciación y proliferación. Por otro lado, la PKD1 altera las actividades relativas de las vías de la quinasa del N-terminal de Jun (JNK= *c-Jun N-terminal Kinase*) y quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK =*Extracellular signal-Regulated Kinases*), atenuando la activación de JNK y la fosforilación en c-Jun en respuesta a la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF=*Epidermal Growth Factor*), mientras que estimula las vías Ras y ERK. Esta quinasa también regula la salida de vesículas secretorias desde el TGN, un proceso que es requerido entre otras cosas para la locomoción de fibroblastos y la activación localizada de Rac1- dependiente de los procesos en la superficie externa. Con respecto al tráfico y la movilización, PKD1 también promueve el reclutamiento de integrinas hacia las nuevas adhesiones focales formadas, aparte de la invasividad de las células cancerosas.

A su vez, esta quinasa tiene un rol en la regulación de la apoptosis, la diferenciación de células T en modelos transgénicos, la reiniciación de la síntesis de ADN inducida por ésteres de forbol y los péptidos reguladores, que actúan a su vez a través de receptores acoplados a proteína Gq. Además, la PKD1 está también implicada como un mediador en los estados de estrés y enfermedad. Conjuntamente, la PKD1 ha sido reportada recientemente por ser mediadora de procesos de transducción de señales, modificación de cromatina, expresión génica mediada por el factor nuclear

β (NF β = *nuclear factor β*), supervivencia celular y síntesis del ADN. (Jacamo *et al.*, 2008).

Como se ha descrito anteriormente, las PKDs se unen al DAG, lo cual también es necesario para su reclutamiento al último compartimiento del aparato de Golgi, el TGN. Al disminuir los niveles celulares de DAG se inhibe el reclutamiento de la PKD1 y se bloquea el transporte de proteínas desde el TGN a la superficie celular. Por lo tanto, se puede afirmar que el DAG es requerido para el reclutamiento de PKD1 hacia el TGN en los estadios que llevan a la formación de los *carriers* de transporte en las células de mamíferos (Baron y Malhotra, 2002).

También se sabe que el DAG activa a las PKC η y PKC ϵ , y que estas quinasas a su vez activan a las PKDs *in vitro* en células no polarizadas. (Waldron, Iglesias y Rozengurt, 1999; Díaz Añel y Malhotra, 2005).

La familia de proteínas quinasas C (PKC) está compuesta de proteínas serina/treonina de al menos doce isoformas, y es parte de cascadas de señalización en todas las células de mamíferos. Están involucradas en una gran variedad de vías de señalización que regulan el crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, transformación, tumorigénesis, función sináptica, conducta y cognición. (Alkon *et al.* 1998; 2007). Estas isoformas son normalmente clasificadas dentro de tres subgrupos, los cuales se basan en la estructura proteica y en los requerimientos de segundos mensajeros, dividiéndose en PKC clásicas (cPKC; α , β I, β II y γ), PKC noveles (nPKC; δ , ϵ , η y θ), y PKC atípicas (aPKC; ζ , ι , λ , incluyendo a PKM ζ , la cual consiste en el dominio catalítico de PKC sin dominio regulatorio). El número de isoformas puede diferir entre las especies.

Como la mayoría de las enzimas, las isoformas de las PKCs tienen poca especificidad con respecto a sus sustratos. La selectividad de los sustratos depende de donde son activadas, es decir de su distribución intracelular.

La distribución de las isoformas de PKC puede ser resumida de la siguiente manera: las PKC α y PKC δ se encuentran expresadas en todos los tejidos, (Ohno S. Kawasaki H, *et al.*, 1987; Breitkeretz D *et al.* 2007) y son particularmente abundantes en el cerebro. PKC ζ está presente en la mayoría de los tejidos, particularmente en pulmones, cerebro e hígado. Otras isoformas están expresadas de una

manera más tejida específica, como es el caso de la PKC ϵ , que se encuentra predominantemente en el cerebro y en menor medida en riñón. La PKC β I es abundante en el bazo, la PKC β II en el bazo y cerebro, la PKC η en keratinocitos, y la PKC θ en músculo esquelético, células T y epidermis. Aunque en el cerebro se encuentra mayormente PKC γ , también se la encuentra en el tejido adrenal (Wetsel et al, 1992). Finalmente, la PKC ι/λ se puede encontrar en testículos y células secretoras de insulina.

Interesantemente, la mayoría de las células expresa más de una isoforma de PKC. Esto podría explicar la mediación de estas isoformas en funciones celulares distintas o incluso opuestas. Un ejemplo de esto sería la acción de PKC δ y PKC ϵ en las mitocondrias, donde ambas regulan la homeostasis de energía a través de la transmisión de señales opuestas al complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC, *pyruvate dehydrogenase complex*). La PKC ϵ activada transmite una señal inhibitoria a la PDHC, mientras que la PKC δ se opone a la señal y estimula PDHC (Gong, *et al*, 2012), por lo que el balance funcional del ciclo de Krebs sería determinado por el rol de estas proteínas quinasas.

Estructuralmente, las isoformas de PKC consisten en un dominio regulatorio (C1 y C2) y un dominio catalítico (C3, el dominio de unión a ATP), y C4, el dominio de unión a sustrato (C4), separados por las regiones variables isoenzima específicas (Gráfico 1). La región catalítica es altamente conservada entre las isoformas, no así la regulatoria.

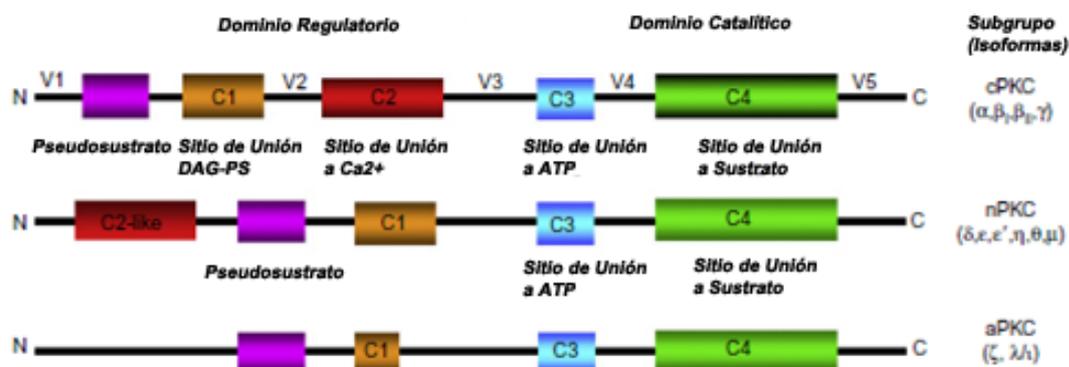


Gráfico 1: En esta imagen se observan los dominios regulatorios (C1 y C2), catalíticos (C3) y el dominio de unión a sustrato (C4) de la proteína quinasa C (PKC) y sus diferencias en las isoformas (clásicas, noveles y atípicas) que se encuentran distribuidas en numerosos tipos celulares. (Fuente: Sun y Alcon 2014)

Las isoformas de las cPKC requieren Ca^{2+} y DAG u otros compuestos específicos para activarse. Una vez activadas, su regulación es modulada a través de la acción sobre tres residuos de fosforilación en el *loop* de activación, en el motivo transmembrana (TM) y en el motivo hidrofóbico (HM). El *loop* de activación de PKC α y β II es fosforilado por la quinasa dependiente de fosfoinosítido 1 (*Phosphoinositide-dependent kinase-1* o PDK-1; Dutil *et al.* 1998, Le Good *et al.* 1998, Toker *et al.* 2000) lo que posteriormente conduce a la fosforilación de los dominios TM y HM (Edwards y Newton 1997), para permitir que las cPKC se comuniquen con los segundos mensajeros. Asimismo, la defosforilación de los dominios TM y HM es importante para la inactivación y degradación de PKC α y β II (Hansra *et al.* 1996, Hansra *et al.* 1999, Newton 2010).

La activación y la inactivación de las cPKCs es conducida mayormente por la cinética de la unión entre DAG-C1a, mientras que la interacción con el dominio C2-membrana es el mayor determinante para la localización de las cPKCs en la membrana plasmática/nuclear (Nalefski *et al.* 2001; Dries y Newton 2008; Scott *et al.* 2013).

Las nPKC son activadas directamente por DAG sin la intervención del Ca^{2+} , porque en estas isoformas el dominio de unión a DAG se une a las membranas con una afinidad lo suficientemente alta para reclutarlas en las membranas en la ausencia de cualquier mecanismo de direccionamiento (Dries *et al.* 2007). Muchos mediadores intracelulares han sido propuestos como mediadores en la distribución intracelular de PKC, tal es el caso de los lípidos (Nishizuka 1995), la glucosa (Gallo *et al.* 2005), los mediadores apoptóticos (Pinton *et al.* 2001) y el estrés oxidativo (Gopalakrishna y Jaken 2000).

Las aPKC carecen del dominio de unión a Ca^{2+} y del dominio C2 y sólo tienen la mitad del dominio C1 homólogo (dominio C1 atípico; Colon-Gonzalez *et al.* 2006). Las aPKCs son insensibles al Ca^{2+} y no son activadas por DAG ni por los ésteres de forbol, pero pueden ser activadas por ácido araquidónico y ceramida.

Todas las isoformas de PKC tienen en el N-terminal un motivo pseudosustrato cerca del

dominio C1. Este pseudosustrato actúa como un dominio autoinhibitorio que la une al dominio catalítico de la PKC, manteniéndola en un estado inactivo. Luego del anclaje a la membrana a través de C1, las isoformas de PKC pasan a un estado activo y pueden fosforilar a sustratos específicos. Tanto la PKC μ (humana) como su homólogo murino, PKD1, carecen de este motivo de pseudosustrato.

Es importante también destacar que el dominio PH de las PKDs solamente forma complejos eficientes con un único miembro de la familia de las PKCs, la PKC η . (Waldron, Iglesias y Rozengurt, 1999). A partir de estas observaciones y de que la PKD1 sería activada por las subunidades de las proteínas G heterotríméricas $\beta 1\gamma 2$ y $\beta 3\gamma 2$, pudo definirse la participación en esta vía de la PKC η , quinasa que se encuentra directamente asociada al aparato de Golgi (Díaz Añel y Malhotra 2005).

Pudo observarse que cuando la actividad de esta quinasa se veía comprometida, el transporte desde el TGN a la superficie celular era inhibido. Por otro lado, la expresión de una PKC η constitutivamente activa causó la fragmentación del aparato de Golgi, lo cual a su vez era inhibido por la coexpresión de una forma quinasa inactiva de PKD1 (PKD1-KD o PKD1 *kinase dead*), debido a que ambas quinasas pueden unirse vía el dominio PH de PKD1, que al estar inactiva y por debajo de la cascada de señalización impidió la acción de PKC η sobreactivada. A raíz de esto, se definió que $\beta\gamma$, PKC η y PKD1 actúan en serie para generar *carriers* de transporte desde el TGN, y que la sobreactivación de cualquiera de ellas resulta en una completa fragmentación del aparato de Golgi por un exceso de fisión de vesículas

Si bien se conocía la importancia del DAG en la regulación de la fisión de vesículas en el TGN, aun se desconocen sus mecanismos de producción para esta vía de señalización. Este lípido no es solo necesario para activar a las PKCs involucradas, sino que como dijéramos anteriormente, sería el encargado de reclutar a la PKD1 hacia las membranas del Golgi para poder generar la fisión de vesículas a nivel de la última cisterna de esta organela.

Las fosfatidil inositol fosfolipasas C (PI-PLCs) son una familia de proteínas compuestas por trece miembros ($\beta 1$ - $\beta 4$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\delta 1$, $\delta 3$, $\delta 4$, ϵ , ζ , $\eta 1$ y $\eta 2$), cada una de las cuales cataliza la producción

de los segundos mensajeros DAG e inositol trifosfato (IP_3) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ($PI(4,5)P_2$). Muchas de estas proteínas pueden ser activadas por la interacción de sus dominios de homología a pleckstrina (PH) con las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G (Razzini *et al.* 2000, Rebecchi y Pentylala 2000, Wing *et al.* 2001). Esta interacción les permite traslocarse a la membrana donde encuentran a su sustrato principal para producir los dos mensajeros secundarios, permitiéndoles activar a sus efectores cascada abajo, como las PKCs.

El hecho de que algunas PI-PLCs puedan ser activadas por $G\beta\gamma$ para activar a las PKCs a través de la producción de DAG, ubicó a estas proteínas entre los mejores candidatos para completar el espacio vacío que faltaba completar en la vía de regulación de la fisión de vesículas en el TGN.

Tanto la fragmentación del Golgi dependiente de $G\beta\gamma$ como la activación de PKD1 y el transporte desde el TGN a la membrana plasmática se vieron afectados por inhibidores específicos de PI-PLCs, como el U73122. Como contraparte, un activador de estas mismas PI-PLCs, el m3M3FBS, indujo la fragmentación del aparato de Golgi así como también la fosforilación de PKD1 en su *loop* de activación (Bae *et al.*, 2003; Díaz Añel, 2007). Finalmente, y debido a que estos inhibidores y activadores no son específicos para isoformas particulares de las PI-PLCs, el uso de siRNAs específicos permitió identificar a la $PLC\beta_3$ como la responsable, a través de su activación por $G\beta_1\gamma_2$, de la producción del DAG necesario para activar a la $PKC\eta$ y la PKD1 en el TGN. El bloqueo de la expresión por siRNA de $PLC\beta_3$ no solamente tuvo un efecto inhibitorio en la fosforilación y activación de ambas quinasas, sino que además fue capaz de bloquear el transporte vesicular entre el TGN y la membrana plasmática (Díaz Añel, 2007). En resumen, estos hallazgos sugieren que $G\beta\gamma$, $PLC\beta_3$, DAG, $PKC\eta$ y PKD1 actuarían en una serie de eventos regulados, que finalmente llevarían a la fisión de membranas durante la formación de los *carriers* de transporte desde el TGN hacia la superficie celular.

Un punto importante a tener en cuenta para el desarrollo de todo el marco experimental de esta Tesis es que las $PLC\beta$ no solamente pueden ser activadas por las subunidades $G\beta\gamma$ de las proteínas

G heterotriméricas, sino también por la familia Gq de subunidades G α .

Muchos GPCRs transducen la señal a través de las isoformas β de la fosfolipasa C. Cuatro isoformas de PLC β (1-4) han sido clonadas, pudiendo ser todas activadas por las subunidades G α del tipo Gq. Por ejemplo, GPCRs como el receptor α 1-adrenérgico y el receptor muscarínico m1, activan PLCs principalmente a través de las proteínas Gq.

La señalización mediada por la proteína Gq es importante a la hora de promover la activación de PKD1 en células intactas. Esta proteína Gq activada a través de una mutación induce una excesiva activación de PKD1 a través de una vía dependiente de PKC.

Se han examinado los efectos de las subunidades G α sobre la activación de PKD1 al cotransfectar una línea celular COS-7 con PKD1wt (salvaje) + G α qQ209L, G α 12Q229L y G α 13Q226L. Todas estas subunidades α de proteínas G (conocidas como mutantes QL) son deficientes en su actividad GTPasa, por lo tanto se comportan como subunidades constitutivamente activas. Aquellas células que sobreexpresaron G α qQL exhibieron un marcado aumento de su actividad basal, la cual no se vio aumentada al tratar a las células con ésteres de forbol, como el PDB (*phorbol 12,13-dibutyrate*). Esto demuestra que la activación de PKD1 en respuesta a G α qQL sería específica para el estado activado de la subunidad G α , pudiéndose además concluir de estos ensayos que la forma constitutivamente activa G α qQL estimula a la isoforma β de PLC *in vitro*, induciendo una estimulación persistente de la producción de IP₃ y DAG en células intactas. Incluso, la activación crónica de PLC β por G α q puede llevar a la desregulación (*downregulation*) de algunas PKCs. (Jingzhen *et al.*, 2000).

Los receptores acoplados a Gq también interactúan con otras proteínas G heterotriméricas, incluyendo los miembros de la familia G12, los cuales han sido recientemente involucrados en vías que llevan a la activación de las PKC, habiéndose demostrado que si bien G α q/11 es necesaria para la activación de PKD1 inducida por ácido lisofosfatídico (LPA o *lisophosphatidic acid*), G α 12/13 sería requerida para ejercer una activación máxima. (Jingzhen *et al.*, 2003; Zhi *et al.*, 2002).

Finalmente, se ha descrito que la toxina de la bacteria *Pasteurella multocida* (PMT) estimula y subsecuentemente desacopla PLC en su transducción de señal a través de la acción selectiva sobre la subunidad $G\alpha_q$. Esta toxina estimula Ca^{2+} e IP_3 en la señalización por activación de Gq dependiente de PLC β_1 , causando la misma respuesta celular ejercida por receptores unidos a proteínas Gq, como los receptores muscarínicos, de bombesina, vasopresina, endotelina, hormona liberadora de tirotrópina (TRH o *thyrotropin-releasing hormone*) y los receptores adrenérgicos del subtipo α_1 (Wilson y Ho 2004).

Materiales y Métodos

Cultivo Celular

Las células HeLa (ATTC N° CCL-2) fueron cultivadas en medio Eagle Dulbecco Modificado (DMEM; GIBCO; Cat N° 11995-065) suplementado con D-Glucosa y piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino (SFB) e incubadas a 37°C con una atmosfera de 5% CO₂.

Las células criopreservadas fueron descongeladas por resuspensión en DMEM a 37°C seguido por la incubación en placas de 100mm. Después de alcanzar el 90% de confluencia fueron divididas en placas de 35mm con vidrios de 1mm de espesor (Fisher Scientific, Cat. N° 12-545-80) para su uso posterior en experimentos de transfección y expresión de proteínas.

Las células en división cultivadas en las placas de 100mm fueron lavadas en PBS (GIBCO, Cat. No. 70011-069) y son tratados por 5 minutos a 37°C con Tripsina 2.5% (GIBCO, Cat. N° 15090-046). Este tratamiento con proteasas es inactivado agregando DMEM más SFB. Las células posteriormente son centrifugadas a baja velocidad, el sobrenadante es descartado y el pellet celular es resuspendido en medio fresco.

Posteriormente, las células son contadas y plaqueadas en placas de 35mm (4.2×10^5 células, 35% confluencia) o en 24-multi-well en una confluencia del 40% en DMEM conteniendo 10%FBS,

y se dejan crecer hasta cerca de la confluencia (24hs posteriores al plaqueo).

Una hora después de la transfección con los plásmidos, el medio es cambiado a OPTI-MEM el cual es un medio bajo en suero (GIBCO, Cat. N°11058).

Constructos y transfección celular

Los siguientes constructos acoplados a proteínas de fusión fluorescente verde (pEGFP N2 expresión vector; Clontech, Cat. N° 6081-1, Gen-Bank N° de acceso U57608) fueron utilizados de las subunidades alfa de proteínas G salvaje WTGFP-Gas, GFP-Gai2, GFP-Gaq, GFP-Gao y GFP-Gα12. Asimismo se usó el mutante constitutivamente activo de todas ellas GFP-GasQL, GFP-Gai2QL, GFP-GaqQL, GFP-GaoQL y GFP-Gα12QL. En estos constructos, la actividad GTPasa es inhibida en las subunidades alfa cambiando Leucina por Glutamina en la posición 227 (Gas), 205 (Gai2 y Gao), 209 (Gaq) y 231 (Gα12), dejando a todas estas subunidades en un estado de activación permanente. Los mutantes GFP-GaqΔPalm fueron creados deleteando los aminoácidos dobles cisteínas en la porción amino terminal de las subunidades αq de las proteínas G. En condiciones fisiológicas estas cisteínas son modificadas post-translacionalmente de manera de llevar a las subunidades α funcionales hacia la membrana plasmática.

Los plásmidos pcDNA3.1 que expresan FLAGβ1 and HA (hemaglutinina)-γ 2 fueron un regalo de Silvio Gutkind [NIH (National Institutes of Health)]. Los constructos para PKD1 fueron contruidos por el Dr. Yusuke Maeda (Research Institute for Microbial Diseases,

University of Osaka). Para los ensayos de tráfico, se usaron mutantes termosensibles VSVG045 (ts045) desde nuestro laboratorio los cuales no tenían la proteína de fusión GFP.

Para los experimentos de transfección, se empleó el reactivo de transfección Lipofectamina 2000TM (Invitrogen, Cat.N° 11668-019). A una concentración final de 4μg de DNA y 7μl de Lipofectamina, para una placa de 35mm o 1.6μg/well de DNA y 1.5μl de Lipofectamina para un multiwell de 24 tal cual lo sugiere el protocolo de Invitrogen.

Veinticuatro horas después de la transfección, las células fueron fijadas con Paraformaldehído por microscopia de inmunofluorescencia. En aquellos casos en que fueron necesarios los lisados celulares para Western Blot, en ellos el procedimiento de transfección fue realizado directamente en placas de 35mm.

Inmunofluorescencia y Western blot

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados: anticuerpo policlonal rabbit frente a la proteína GRASP-65 (Golgi Re-Assembly Stacking Protein 1, 65 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Cat. N° sc-30093), anticuerpo policlonal rabbit anti-TGN46 (Sigma–Aldrich, Cat. N° T7576), anticuerpo monoclonal de ratón anti-tubulina tirosinada (Sigma–Aldrich, Cat.N° T9028), anticuerpos secundarios Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit IgG y Alexa Fluor goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Cat. N° A10040 and A21070, respectivamente), anticuerpo policlonal rabbit anti-GST (Santa Cruz Biotechnology, Cat. N° sc-459), antiphospho-PKD1 Ser744/748 (Cell Signaling, Cat. N° 2054L), y anticuerpo monoclonal anti-VSV-G Cy3-conjugado, clon P5D4 (Sigma–Aldrich, Cat. N° C7706).

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células transfectadas crecidas en cubreobjetos fueron lavadas en PBS1X y fijadas por 20min en 4%Paraformaldehído-4%Sucrosa, seguido de la permeabilización con Tritón X-100 (0.02%) por 5min, y se bloquea una hora con BSA (5%) antes de la incubación con el anticuerpo primario correspondiente.

El anticuerpo primario apropiado fue diluido 1:800 en BSA 1% y añadido a las células para una incubación de 1h. Después de lavar tres veces con PBS 1X, las células fueron incubadas por 1h con el anticuerpo secundario correspondiente en una dilución 1:500, y montadas sobre cubreobjetos con reactivo Fluor Save™ (Calbiochem, Cat. N° 345789–20ML), después de lavar dos veces con PBS1X. El procedimiento entero se realiza a temperatura ambiente (25°C). Las células fijadas fueron visualizadas en un microscopio de Epifluorescencia Zeiss Axioplan (Carl Zeiss Intl) con un objetivo 63X, apertura numérica de 1.35, a temperatura ambiente. Las fotos fueron tomadas con una cámara

ORCA ER CCD 1344 × 1024, y analizados con el software Metamorph Software (Molecular Devices).

Para los ensayos de western blot, las células fueron transfectadas con GST-PKD1WT y los constructos Gα o Gβγ correspondientes. Veinticuatro horas luego de la transfección, las células fueron lavadas dos veces con PBS1X y luego fueron lisadas por 30min a 4°C con 250 µl de buffer RIPA1X (NaCl 150 mM, Tritón 1%, sodium deoxycholate, SDS 0.1%, Tris 50 mM, con inhibidores de proteasa)/35 mm plate.

Las células lisadas fueron centrifugadas a máxima velocidad, cuantificadas con el método de Lowry, y diluidas con la cantidad correspondiente de buffer Laemli 1X para continuar con el ensayo de SDS-PAGE. Después de la electroforesis de proteínas, y transferencia en las membranas de PVDF se procedió a bloquear 1h a temperatura ambiente con leche descremada al 5% diluida en TBS-Tween 0.05% (500mg de leche descremada en 10ml de TBS-Tween 0.05%). Luego la membrana fue incubada toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario apropiado diluido en BSA de acuerdo al protocolo del fabricante. Después de cinco lavados con TBS-Tween 0.05%, la membrana fue incubada con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa diluidos en leche descremada al 1% por 1h a temperatura ambiente. Después de otra ronda de lavados la membrana fue revelada por quimioluminiscencia.

Inhibidores frente a PKC y PLC

Los inhibidores PKC utilizados para estos experimentos fueron: Bisindolmaleimida I (también conocido como GF109203X; Calbiochem, N°203290) preparado en DMSO (10 mg/ml) a una concentración final de 2 µM; NPC15437 (Sigma–Aldrich, N° N161–5MG) preparados en agua (10mg/ml) a una concentración final de 10 µM; y Tamoxifeno (Calbiochem, Cat. N° 579002–5MG) preparado en etanol (5 mg/ml) con una concentración experimental final de 200 µM.

Para los ensayos de inhibición de PI-PLC se usó el inhibidor específico U73122 y su análogo inactivo U73343 (ambos de Calbiochem, Cat. N° 662041 and 662035, respectivamente) preparados en cloroformo a concentraciones inicial (U73122) y 200 mg/ml (U73343), con concentraciones experimentales de 1mM para ambos compuestos.

Las células HeLa fueron cultivadas y transfectadas en un 24 multi-well con el plásmido GFP-Gαq. Al final del procedimiento, el medio con OPTI-MEM fue cambiado por DMEM con el agregado de los inhibidores apropiados en la concentración final descrita arriba. Después de 24hs de incubación los ensayos de inmunofluorescencia fueron llevados a cabo.

Ensayos de Transporte con VSVG-ts045

Las células HeLa fueron transfectadas usando lipofectamina con diferentes subunidades de proteína G y los constructos VSVG-ts045, e incubados a una temperatura no permisiva de (39.5°C) por 20hs, de acuerdo a la publicación de Chi et al. (2008). Luego se añadió Cicloheximida (Sigma–Aldrich, Cat.N° C4859) la cual fue agregada al cultivo celular e incubada 30min más a la misma temperatura (32°C) y finalmente, fueron fijadas y chequeadas por Inmunofluorescencia. En todos los experimentos, tres cosas fueron monitoreadas: el porcentaje de las células en las cuales VSVG había alcanzado la membrana plasmática, la localización final de VSVG (solo en aquellos casos en donde la localización en membrana plasmática fue menor al 75% de las células), y si el Aparato de Golgi estaba intacto o fragmentado.

Resultados

Definiendo el rol de las subunidades α de proteínas G en la fisión de vesículas mediada por PKD1

Para determinar la participación de las subunidades alfa de proteínas G en la vía de señalización que regula la fisión de vesículas en el TGN y que es mediada por PKD1 y sus demás efectores definidos por nuestro laboratorio, se decidió iniciar el estudio de los efectos de estas subunidades sobre la estructura del aparato de Golgi. Para ello se transfectaron células HeLa con constructos que expresan diferentes miembros de esta familia de proteínas en las formas salvaje (WT) y constitutivamente activa. Estas últimas mutantes, a las cuales se las conoce como mutantes QL, se generaron al reemplazar leucina por glutamina (posición 227 para $G_{\alpha s}$, 205 para $G_{\alpha i_2}$ y $G_{\alpha o_A}$, 209 para $G_{\alpha q}$, y 231 para $G_{\alpha_{12}}$). Estas subunidades modificadas permanecen unidas a GTP debido a un déficit en su actividad GTPasa (Graziano y Gilman, 1989; Masters *et al.*, 1989), y fueron expresadas como proteínas de fusión acopladas a GFP para facilitar la identificación de las células transfectadas por microscopía de fluorescencia. (Figura 1)

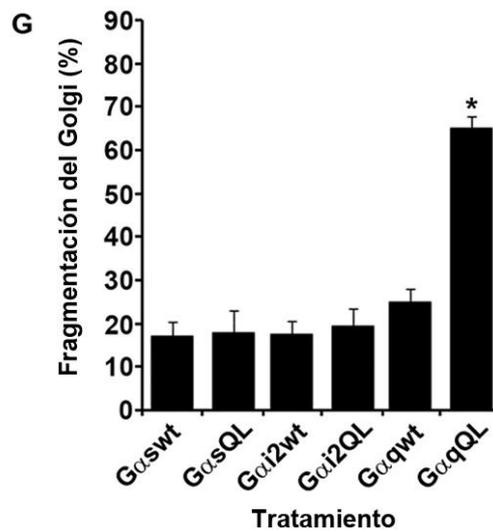
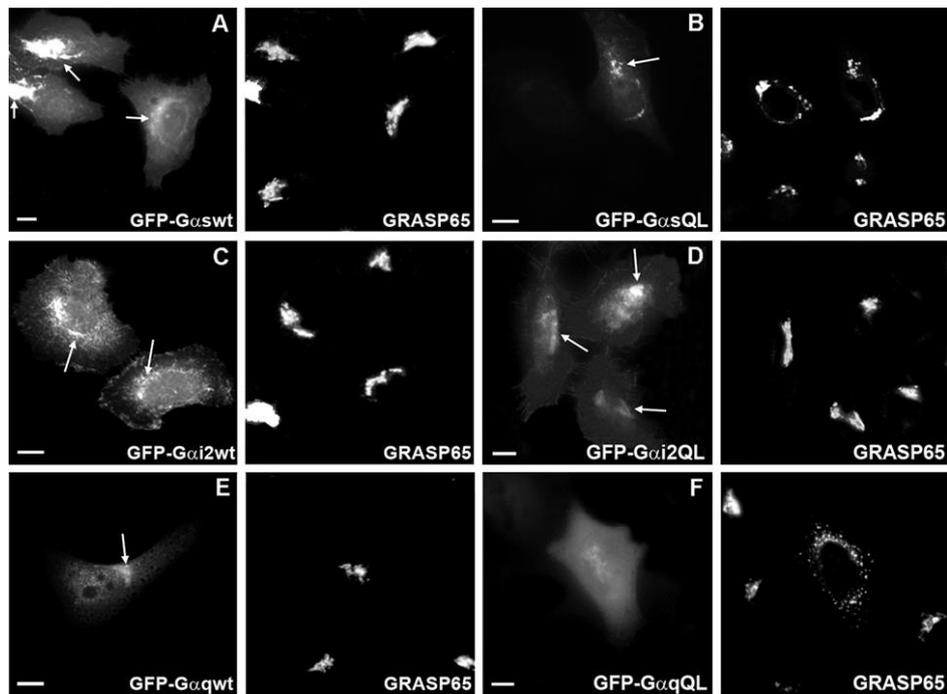


Figura 1. La subunidad α de Gq es la única capaz de causar la fragmentación del Golgi. Las células HeLa fueron transfectadas con los siguientes plásmidos GFP-G α sWT (A), GFP-G α sQL(B), GFP-G α i2WT (C), GFP-G α i2QL (D), GFP-G α qWT (E), GFP-G α qWT (E) o GFP-G α qQL (F). Luego de 24 hs post-transfección, las células fueron fijadas y tratadas para IF para detectar la expresión del tag GFP y del aparato de Golgi (GRASP65, a la derecha de cada imagen). Las flechas indican colocalización entre las subunidades G α y el aparato de Golgi. (G) Aquí se muestra el porcentaje de la fragmentación del Golgi inducida por la expresión de las subunidades G α , mostrado en las imágenes desde (A) hasta (F). En todos los experimentos, se contaron 200 células expresando GFP. Los valores en (G) son las medias (\pm S.D., barras verticales) para las cuatro condiciones experimentales.* $P < 0.05$ comparado con G α qWT. Las barras de escala indican 10 μ m.

GαqQL y su relación con el citoesqueleto de las células HeLa

Para definir si el fenómeno observado era debido a algún cambio en la estructura de la tubulina, ya que su depolimerización podría generar resultados similares en relación a la estabilidad del Golgi, se monitoreó el estado del citoesqueleto mediante el uso de anticuerpos específicos en presencia del mutante constitutivamente activo de Gαq, determinándose que los microtúbulos permanecieron intactos (Figura 2A), tal como también se había observado con la sobreexpresión de Gβ1γ2 (Díaz Añel y Malhotra 2005). Asimismo, se confirmó que la presencia de GαqQL tampoco ejerció ningún efecto sobre la viabilidad celular (no mostrado), reafirmando que la fragmentación del aparato de Golgi sería generada por la acción directa de GαqQL sobre esta organela, y no por muerte celular o por un cambio en la estabilidad de los microtúbulos inducidas por la sobreexpresión de esta subunidad constitutivamente activada.

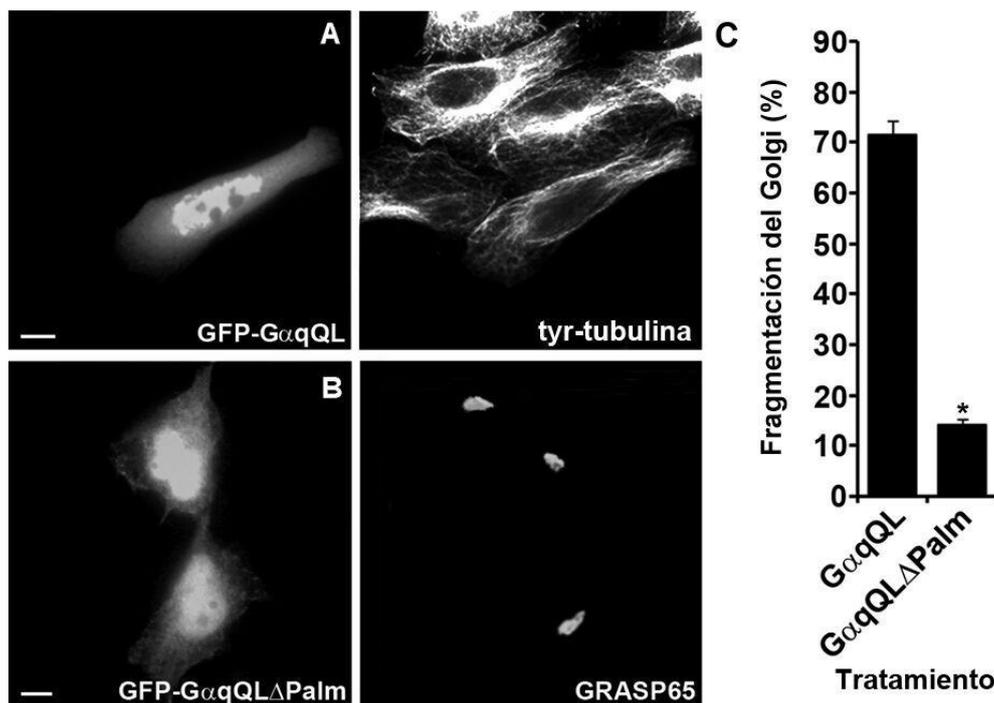


Figura 2. La actividad de GαqQL no afecta el citoesqueleto de microtúbulos y necesita estar asociada a membranas para inducir la fisión de vesículas. Las células HeLa son transfectadas con GFP-GαqQL (A) y el mutante doble no palmitoilable GFP-GαqQLΔPalm. En ambos experimentos, 24hs luego de la transfección, las células fueron fijadas y tratadas para la IF para detectar la expresión del tag GFP y de los microtúbulos (A: tyr-tubulina) o el aparato de Golgi (B: GRASP65). (C) Se indica el porcentaje de la fragmentación del Golgi inducida por la expresión de GαqQL

o $G\alpha_{qQL\Delta Palm}$. En todos los experimentos, se contaron 200 células expresando GFP. Los valores en (C) son las medias (\pm S.D., barras verticales) para cuatro condiciones experimentales. * $P < 0.05$ comparado con $G\alpha_{qQL}$. Barras de escala indican 10 μm .

Rol del dominio de palmitoilación en los efectos de $G\alpha_{qQL}$

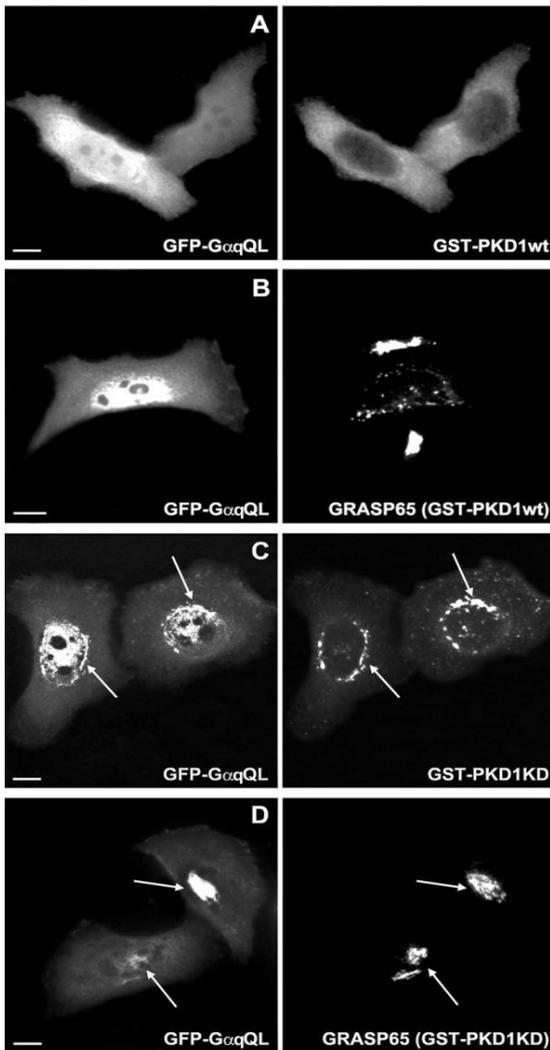
Subsecuentemente, en búsqueda de confirmar que los efectos de $G\alpha_{qQL}$ eran ejercidos por su localización en membrana y no por la sobreexpresión proteica, se diseñó un nuevo constructo en el que los dos residuos de cisteína del amino terminal (números 9 y 10) fueron removidos de la secuencia original del mutante QL y acoplados a la proteína de fusión GFP. Esta proteína fue denominada GFP- $G\alpha_{qQL\Delta Palm}$, ya que esos dos aminoácidos son requeridos para la palmitoilación de $G\alpha_q$, una modificación postraduccional de estas subunidades que, como fuera explicado en la introducción de este capítulo, es esencial para su unión a las membranas biológicas. Cuando este constructo fue sobreexpresado en células HeLa, no mostró colocalización alguna con ningún tipo de membrana, observándose que el aparato de Golgi permaneció intacto (Figura 2B y 2C), reafirmando el hecho de que el efecto de este mutante constitutivamente activo sería debido a la activación de vías de señalización en las membranas a las que deben asociarse mediante modificaciones lipídicas, tal cual fuera observado para células que expresaban $G\beta_1\gamma_2$ con una mutación en el sitio de geranilgeranilación de la subunidad γ_2 (Díaz Añel y Malhotra 2005).

Rol de PKD1 en la fragmentación del Golgi inducida por $G\alpha_q$

Para confirmar el rol de la PKD1 en nuestro modelo, decidimos estudiar la estabilidad de la estructura de esta organela en presencia de $G\alpha_{qQL}$ coexpresada con la mutante dominante negativa de PKD1 (PKD1 *kinase dead* o PKD1-KD). En este constructo, la lisina 618 fue reemplazada por una asparragina (K618N) en el sitio de unión a adenosina trifosfato (ATP), anulando así la actividad

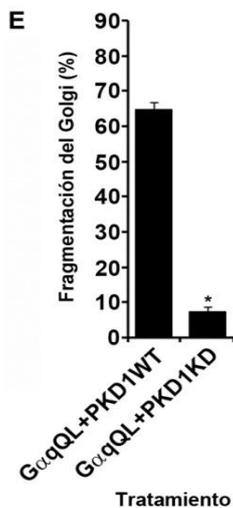
quinasa de esta proteína. (Liljedahl *et al.* 2001).

Mientras que la co-expresión de GαqQL con la variante salvaje, PKD1-WT, no mostró diferencias con el resultado observado para GαqQL sola (Figura 3), la presencia de PKD1-KD inhibió completamente el efecto de la forma constitutivamente activa de Gαq sobre la fragmentación del Golgi, sugiriendo que esta variante mutada de la quinasa estaría bloqueando la señalización iniciada por la forma activada de esta subunidad de proteína G al estar cascada abajo de la vía que regula la fisión de vesículas en el TGN.



Golgi, sugiriendo que esta variante mutada de la quinasa estaría bloqueando la señalización iniciada por la forma activada de esta subunidad de proteína G al estar cascada abajo de la vía que regula la fisión de vesículas en el TGN.

Figura 3. GαqQL actúa con PKD1 para aumentar la fisión de vesículas en el TGN. Las células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos GFP-GαqQL y GST-PKD1WT (A y B) o GST-PKD1 KD (C y D). Luego de 24 h post-transfección, las células fueron fijadas y tratadas para IF para detectar la expresión del tag GFP (imagen de la izquierda A-D), PKD1 (GST, imagen de la derecha A y C) y el aparato de Golgi (GRASP65, imagen de la derecha B y D). Todas las células GFP-GαqQL positivas también mostraron expresión de PKD1 WT o KD. Las flechas indican colocalización entre la subunidad α de GαqQL y PKD1 KD (C) o el aparato de Golgi (D). (E) Aquí se muestra el porcentaje de la fragmentación del Golgi inducida por la expresión de GαqQL en presencia de PKD1 WT o de GαqQL cotransfectada con PKD1 KD. En todos los experimentos, se contaron 200 células expresando GFP. Los valores en (E) son las medias (±S.D., barras verticales) para cuatro experimentos separados. **P* < 0.05 es comparado con el grupo GαqQL más PKD1WT. Las barras de escala indican 10 μm.



Definiendo el rol de las PKC en la vía iniciada por Gαq

Trabajos previos han demostrado que la PKD1 es activada por los complejos Gβ1γ2 y Gβ3γ2 a través de PKCη (Díaz Añel y Malhotra 2005), una quinasa que puede asociarse directamente a las membranas de Golgi y que es capaz de unirse al dominio PH de la PKD1.

Al basarnos en los efectos que produce sobre la estructura del Golgi la variante GαqQL, y habiendo demostrado la participación del rol de PKD1 en este proceso, se decidió verificar si las PKCs se encontraban involucradas en la regulación de la fisión del TGN mediada por Gαq.

Para llevar a cabo este estudio, las células HeLa fueron tratadas con diferentes inhibidores de PKC luego de ser transfectadas con GαqQL y en el momento de cambiar el medio. Los inhibidores seleccionados fueron la bisindolimaleimida (BIM), el tamoxifeno y el NPC15437, los cuales son capaces de bloquear la actividad de isoformas particulares de PKC, especialmente aquellas que pertenecen a las subfamilias noveles y convencionales, ambas activadas por DAG. Una vez finalizada la transfección de las células con la forma constitutivamente activa de Gαq, las mismas fueron incubadas 16 horas con los inhibidores correspondientes, para posteriormente proceder al análisis de las células transfectadas mediante microscopía de fluorescencia con el objetivo de chequear la integridad del aparato de Golgi, tanto en ausencia como en presencia de cada inhibidor utilizado.

Nuestros resultados mostraron que los tres inhibidores fueron capaces de bloquear la fragmentación del Golgi mediada por GαqQL (Figura 4A). Si bien estos compuestos no bloquean formas individuales de las PKC, basándonos en su especificidad podría esperarse que entre las quinastas involucradas como posibles candidatos en la vía mediada por PKD1 y activada por Gαq se encontrarían la PKCα convencional (inhibida por BIM), o las noveles PKCδ (inhibida por BIM y tamoxifeno), ε (BIM) o η (tamoxifeno y NPC15437), todas ellas descritas como activadores de PKD1 y con localización en el Golgi (Figura 4A) (Aschrafi *et al.*, 2003; Kajimoto *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Díaz Añel and Malhotra, 2005; Maissel *et al.*, 2006; Berna *et al.*, 2007; Poole *et al.*, 2008;

Garczarczyk *et al.*, 2009).

En un trabajo publicado por el grupo de Gonçalves se describió la alta especificidad del tamoxifeno y del NPC15437 para inhibir PKC η (Saraiva *et al.* 2003), lo cual podría sugerir que esta isoforma de PKC no sólo estaría involucrada en la fisión de membrana del Golgi mediada por G $\beta\gamma$, sino que también podría ser parte de una vía similar iniciada por las subunidades G α_q . Los resultados con BIM no descartarían esta hipótesis, ya que pueden ser explicados por el hecho de que actualmente no existen datos concretos sobre los efectos de este inhibidor sobre la actividad de PKC η .

De todas maneras se necesitará profundizar más en esta área para poder delinear el rol de isoformas específicas de PKC en esta vía regulada por G α_q .

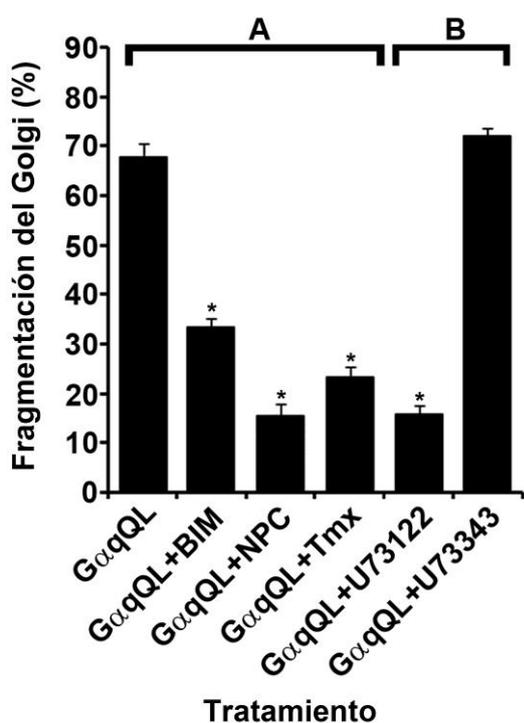


Figura 4. La inducción de la fragmentación del Golgi mediada por G α_q es dependiente de PKC y PI-PLCs. (A) Las células HeLa fueron transfectadas con el plásmido GFP-G α_q QL. Luego las células fueron incubadas por 16 hs con los inhibidores de PKC bisindolylmaleimide (BIM, segunda columna), NPC15437 (NPC, tercera columna), y tamoxifeno (Tmx, cuarta columna) o su vehiculo correspondiente DMSO/agua/etanol respectivamente (DMSO se muestra en la primera columna. Luego de la incubación se realizó la IF para detectar la expresión del tag GFP (G α_q QL) de manera de poder medir la fragmentación del Golgi (GRASP65). **(B)** Las células HeLa fueron transfectadas con el plásmido GFP-G α_q QL. Subsecuentemente, las células fueron incubadas por

16 hs con el inhibidor de PI-PLC U73122 (columna de la izquierda), o su análogo inactivo U73343 (columna de la derecha). Después de la incubación, un ensayo de IF fue realizado a continuación de manera de poder detectar la expresión del tag GFP (G α_q QL) y el aparato Golgi (GRASP65). En todos los experimentos, 200 células expresando GFP fueron contadas. Los valores en **(A)** y **(B)** son medias (\pm S.D., barras verticales) para los cuatro grupos experimentales indagados.

* $P < 0.05$ en comparación con G α_q QL.

Las PI-PLCs como efectoras de la vía mediada por PKD1 y G α_q

La acción de GαqQL sobre las PKC noveles y la PKD1 con la subsecuente fragmentación de las membranas del Golgi, nos llevó a investigar, así como lo hicimos con las subunidades Gβγ, quién era el responsable de la producción del DAG necesario para activar a las PKC y favorecer la translocación de la PKD1 hacia las membranas del TGN. Como fuera delineado anteriormente en el marco teórico de este proyecto, el candidato natural para esta tarea debería ser una PI-PLC, ya que numerosas isoformas de esta familia de las PLC, particularmente las β, pueden ser activadas por Gαq para generar los segundos mensajeros DAG e IP₃ a partir de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂).

Para determinar la participación de estas proteínas en la vía que estudiamos, decidimos aplicar el mismo procedimiento que utilizamos para definir la intervención de las PKCs, para lo cual las células HeLa fueron incubadas con un potente inhibidor de PI-PLC, el U73122, el cual ha sido previamente empleado para investigar el rol de estas proteínas en la regulación del tráfico mediado por Gβγ (Díaz Añel 2007). Las células transfectadas con GαqQL fueron incubadas por 16 horas con U73122 o con un control negativo, un análogo de este inhibidor llamado U73343 que es incapaz de bloquear la actividad de las PI-PLCs, para luego analizar por microscopía de fluorescencia la estabilidad de las membranas de Golgi en aquellas células que expresaran la variante mutante de la proteína G asociada a GFP.

El inhibidor específico de PI-PLC fue capaz de bloquear la fragmentación del Golgi mediada por GαqQL, mientras que en la presencia de U73343, el análogo inactivo de U73122, la estructura del Golgi se vio totalmente desestabilizada (Figura 4B). Este resultado parecería indicar que las PI-PLCs serían activadas directamente por Gαq y que serían las responsables de la producción del DAG necesario para la activación de la fisión de las membranas del Golgi a través de las PKCs y de la PKD1. Basados en la actividad descrita para U73122, y en que determinadas PI-PLCs pueden ser activadas por las subunidades αq de las proteínas G, podría afirmarse que tanto PLCβ1 como β3 o β4a (Kim *et al.*, 1998; Rhee 2001) serían los candidatos ideales que participarían en la regulación de

la vía del tráfico intracelular entre el TGN y la superficie celular mediado por GαqQL.

Como fuera mencionado anteriormente, si tomamos en cuenta que la PKCη podría estar involucrada en ambas vías, y que tanto Gβγ como Gαq son capaces de unirse y activar PLCβ3, existe una amplia posibilidad de que ambas subunidades de proteína G actúen en la misma vía a través de la activación de GPCR. Estos resultados deberán de ser tenidos en cuenta para una futura investigación que busque identificar a la PLCβ específica activada por Gαq en la vía de señalización que hemos caracterizado.

Regulación del transporte desde el Golgi hacia la membrana plasmática por Gαq

Para analizar el efecto directo de las subunidades Gαq sobre el transporte entre el TGN y la membrana plasmática, células HeLa fueron transfectadas con la mutante temperatura sensible de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular asociada a GFP (GFP-VSVGts045) y numerosos constructos de proteínas G.

Una vez expresado en células, este mutante queda retenido en el retículo endoplásmico (RE) a la temperatura no permisiva (39.5 °C), ya que la mutación que posee impide que a esa temperatura la proteína pueda plegarse normalmente, lo que hace que la maquinaria de control de calidad del RE le impida continuar su camino por la vía de secreción normal. De esta manera, se logra sincronizar a toda la población celular transfectada para que el transporte de la VSVG desde el RE se inicie al mismo tiempo en la siguiente etapa del protocolo.

Luego de 20 horas de incubación a 39.5 °C, se baja a la temperatura permisiva de 32 °C (según el protocolo de Chi *et al.*, 2008), lo que permite que el plegamiento se normalice y la VSVG acumulada pueda seguir su camino hacia el Golgi para ser glicosilada, y de allí continúe hacia su destino final, la membrana plasmática. Este cambio de temperaturas se lleva a cabo en presencia de cicloheximida, lo que permite que solo la proteína acumulada en el RE siga su camino y que no se produzca síntesis *de novo* de la misma.

Finalmente, se fijan las células y se miden tres parámetros: porcentaje de células en donde VSVG alcanza la superficie celular, localización final de VSVG (solo en los casos en que la localización en membrana plasmática fuera menor al 75%), y si la estructura del Golgi permanece intacta o se encuentra fragmentada (Figura 5A).

Cuando las células fueron transfectadas con $G\alpha q^{WT}$, el transporte desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática transcurrió de manera normal y la organela permaneció intacta. Como pudimos demostrar anteriormente (Díaz Añel y Malhotra, 2005), los mismos resultados fueron observados cuando fue expresada la mutante no prenilada $G\beta 1\gamma 2\Delta C68S$ (Figura 5B).

Al expresar el constructo $G\alpha q^{QL}$, el Golgi se fragmentó durante la incubación a una temperatura no permisiva de 39.5 °C, a pesar de lo cual alrededor del 50% de las células mostraba a VSVG alcanzando la membrana plasmática, mientras que el resto de la proteína viral fue retenida en vesículas identificadas como Golgi positivas mediante el uso de un anticuerpo contra el marcador TGN46 (Figura 5C) Resultados similares se observaron cuando se expresó $G\beta 1\gamma 2$ (Figura 5C), tal cual se había descrito previamente en nuestro laboratorio (Díaz Añel y Malhotra 2005; Díaz Añel 2007). En ambos casos, la co-transfección con la PKD1-KD resultó en un bloqueo del transporte de VSVG desde el Golgi hacia la membrana plasmática, junto con la inhibición de la fragmentación del Golgi (Figura 5C), mientras que ambas subunidades activas, $G\alpha q^{QL}$ y $G\beta 1\gamma 2$, se acumularon principalmente en la membrana de esta organela.

Estos resultados demostrarían que ni la forma constitutivamente activa de las subunidades αq ni el heterodímero $\beta 1\gamma 2$ de proteínas G afectarían el transporte desde el RE hacia el Golgi. En cuanto a la fragmentación del Golgi, esta sería causada por la acción de estas subunidades sobre la vía que activa a PKD1, afectando el transporte desde el TGN hacia la membrana plasmática, el cual continuaría trabajando de manera menos eficiente a pesar del fraccionamiento del Golgi,

Debido a que habíamos demostrado que $G\beta 1\gamma 2\Delta C68S$ no afectaba el transporte (Díaz Añel y Malhotra, 2005), se decidió co-transfectar este constructo con $G\alpha q^{QL}$ para estudiar si esta forma constitutivamente activa podría ser bloqueada por la variante no prenilable de $G\beta 1\gamma 2$, basándonos en

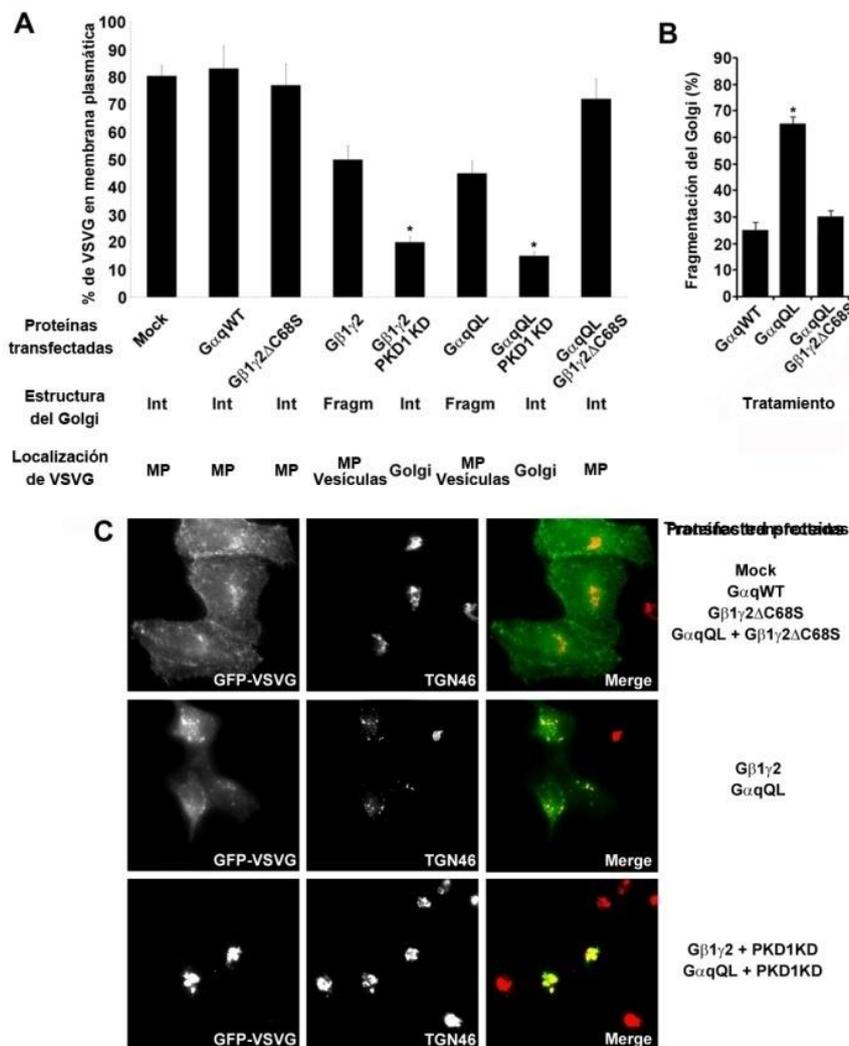
reportes previos que determinaron que ambas subunidades se unen y se transportan anterógradamente en las vías de tráfico intracelular. (Michaelson *et al.*, 2002). En estas condiciones, G β 1 γ 2 Δ C68S fue capaz de inhibir la acción de G α qQL sobre el Golgi, ya que la organela permaneció intacta y el VSVG alcanzó la membrana plasmática en niveles normales(Figura 5C).

Este último resultado solo podría explicarse por el hecho de que G α qQL sería transportada en asociación con G β 1 γ 2 Δ C68S desde el RE, uniéndose ambas a las membranas del Golgi mediante la región palmitoilada de la subunidad α . Al no poderse separar ambos complejos por no existir actividad GTPasa en G α q, la mutante constitutivamente activa vería impedida su acción sobre la vía que regula la fisión de vesículas en esa organela. Es importante aclarar que si bien G α qQL se comporta estructuralmente como una subunidad α unida a GTP, a diferencia de esta última la mutante puede unirse a complejos $\beta\gamma$. Estas observaciones demostrarían que para que el transporte entre el TGN y la membrana plasmática funcione eficientemente, se necesita de la formación de un heterotrímero funcionalmente activo, en donde G α q pueda separarse de G β 1 γ 2 mediante hidrólisis de GTP luego de ser activada a través de un GPCR.

Todos estos resultados demostrarían que las subunidades G α q poseen un rol específico al igual que las subunidades G $\beta\gamma$ en la regulación de la fisión de vesículas dependiente de PKD1 en el TGN a través de PI-PLCs y PKCs, sugiriendo fuertemente que esta señalización se iniciaría a partir de ligandos externos específicos de GPCR, como han propuesto numerosos laboratorios en los años recientes (Baldassarre *et al.*, 2000; Sumara *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2010; Giannotta *et al.*, 2012; Cancino *et al.*, 2013). Nuestros resultados acerca del importante y novedoso rol de la G α q en la regulación del transporte desde el TGN hacia la membrana plasmática, permitirán acelerar la búsqueda de aquellos GPCR y sus ligandos específicos responsables de la modulación de la fisión de vesículas de acuerdo a las necesidades de la célula, ya que el número y la variedad de estos receptores acoplados a G α q es conocido ampliamente, mientras que la asociación de los GPCR a las diferentes variantes de G $\beta\gamma$, inclusive con las dos combinaciones que determinamos para esta vía, se

encuentra mucho menos definida y aún se desconoce su verdadera especificidad para cada isoforma de este complejo de proteínas G.

Figura 5. *GαqQL* regula el transporte desde el Golgi hacia la membrana plasmática. (A) Las células HeLa fueron co-transfectadas con diferentes subunidades de proteínas G y la proteína termosensible VSVG-tsO45, e incubadas a temperaturas no permisivas (39.5°C) por 20 hs. Luego se añadió cicloheximida, y a continuación se incubó por 30 minutos más a la misma temperatura. Posteriormente, fueron incubadas dos horas más a la temperatura permisiva (32°C), fijadas y monitoreadas por IF. Los porcentajes de células con VSVG en la membrana plasmática de las células fueron medidos,



y a su vez si el Golgi permanecía intacto o fragmentado en todos los experimentos. Int: Golgi intacto; Fragam: Golgi fragmentado; PM: localización del VSVG en la membrana plasmática; Vesículas: localización de VSVG en vesículas derivadas del Golgi. En todos los experimentos fueron contadas 200 células expresando proteínas G (GFP para *Gαq* o HA para *Gβγ*). Los valores son las medias (\pm S.D., barras verticales) de los cuatro grupos experimentales. $*P < 0.05$ comparada con su correspondiente control (*Gβ1γ2* o *GαqQL*) para el bloqueo del transporte de VSVG. Los experimentos controles

corresponden a las células transfectadas solamente con VSVG. (B) Las células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos GFP-*GαqWT*, GFP-*GαqQL* o GFP-*GαqQL* más *Gβ1γ2ΔC68S*. Luego de 24 hs post-transfección, las células fueron fijadas y tratadas para IF para detectar la expresión del tag GFP y la organización del Golgi. En todos los experimentos se contaron 200 células expresando GFP. Los valores son las medias (\pm S.D., barras verticales) para las cuatro condiciones experimentales. $*P < 0.05$ al compararlo con *GαqWT*. (C) Las imágenes representativas de los tres fenotipos diferentes que se observaron en los experimentos de transporte. En la línea superior, el Golgi intacto y el VSVG

insertado en la membrana plasmática; en la línea media, el Golgi fragmentado y el VSVG co-localizando con las vesículas derivadas del Golgi e insertadas en la membrana plasmática; en la línea inferior, el Golgi intacto y el VSVG retenido en el TGN. Hacia la derecha de cada línea se indican qué plásmidos fueron transfectados en cada experimento para los tres fenotipos específicos que fueron observados.

Discusión

En los últimos años, se ha encontrado que el tráfico intracelular puede ser regulado y activado por receptores de membrana plasmática o receptores localizados en organelas, particularmente a través de sus principales efectores, las proteínas G heterotriméricas. Estas cascadas de señalización son iniciadas por estas proteínas especializadas, las cuales ejercen frecuentemente su función sobre sistemas de quinasas o de factores de transcripción, encontrándose que los primeros tendrían un rol esencial en la regulación de la fisión de vesículas en el aparato de Golgi.

Nuestro laboratorio ha demostrado que subunidades $\beta\gamma$ específicas de las proteínas G son capaces de inducir la fisión de vesículas en el Golgi a través de la cascada de señalización que involucra a PLC β 3, PKC η y PKD1. Estas observaciones, junto con numerosos resultados publicados recientemente, demuestran que las subunidades G $\beta\gamma$ serían capaces de translocarse desde la membrana plasmática hacia el Golgi, reforzando nuestra hipótesis que afirma que parte del transporte vesicular entre esta organelas y la superficie celular es regulado desde el exterior de la célula a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G.

La participación de las PI-PLCs activadas por proteínas G en la regulación del tráfico mediada por PKD1 nos llevó a investigar si las subunidades G α tenían alguna participación en estas vías de transducción de señales involucradas en el control de la fisión de membrana. Una de las candidatas obvias como participante de estas vías de señalización eran las subunidades G α_q , dado que las mismas activan específicamente a miembros de la familia PLC β (Lee *et al.*, 1993; Morris y Scarlata 1997; Golebiewska y Scarlata 2010; Weinstein y Scarlata 2011).

Para elucidar si esto era correcto, se seleccionaron subtipos representativos de esta vasta familia de proteínas de $G\alpha$, cuyas variantes salvaje y constitutivamente activa (QL) -la cual carece de actividad GTPasa y permanece en el estado unido a GTP- fueron transfectadas en células HeLa. Como se esperaba, de todas las subunidades QL testeadas, G_{i2} , G_s , G_{oA} , G_{12} y G_q , sólo esta última fue capaz de generar la fragmentación del Golgi cuando era sobreexpresada. Este resultado fue reforzado con el análisis del mutante de palmitoilación $G\alpha_qQL$, incapaz de unirse a membranas, el cual no ejerció ningún efecto sobre la fisión de vesículas, indicando que estas proteínas necesitan estar unidas a las membranas biológicas para iniciar la vía de señalización.

Estas observaciones, junto a las conclusiones de nuestros trabajos anteriores en donde se demostró que las subunidades $G\gamma$ necesitan estar preniladas para activar junto con $G\beta$ la vía que regula la fisión de vesículas de membrana en el TGN (Díaz Añel y Malhotra, 2005), demuestran la importancia del procesamiento post-traducciona l de proteínas para el correcto funcionamiento y localización de las subunidades de proteínas G.

Los roles fisiológicos de $G\alpha_q$ fueron descritos en numerosos trabajos a lo largo de los últimos años, y está claro que estas proteínas actúan directamente sobre las PI-PLCs para inducir la producción de los segundos mensajeros DAG e IP_3 (Golebiewska y Scarlata 2010). Estas subunidades de proteínas G fueron también caracterizadas como activadores de PKD1 en diferentes procesos celulares (Yuan *et al.*, 2000; Ozgen *et al.*, 2008; Waldron *et al.*, 2012), pero su rol en el tráfico mediado por PKD1 no había sido indagado hasta ese momento. Basándonos en estos puntos, y tomando en cuenta los resultados con los mutantes QL, se investigó la participación de $G\alpha_q$ en la vía previamente descrita para las subunidades $G\beta\gamma$.

Primeramente, se pudo bloquear la fragmentación del Golgi inducida por $G\alpha_qQL$ mediante la sobreexpresión de la mutante inactiva de PKD1, demostrando que estas dos proteínas pertenecen a la misma vía de regulación de tráfico de proteínas, como fuera establecido para las subunidades $G\beta\gamma$ (Díaz Añel y Malhotra 2005).

Luego de haber confirmado el rol de las subunidades $G\alpha_q$ y PKD1 en esta vía, se comenzó a buscar el activador de PKD1. Se decidió seleccionar ciertos inhibidores de PKC, que aunque individualmente no poseen especificidad para cada variante particular de estas quinasas, en conjunto son una herramienta valiosa para una identificación efectiva de los activadores de PKD1 específicos en la vía mediada por $G\alpha_q$.

Trabajos recientes han confirmado que dos de los inhibidores empleados, tamoxifeno y NPC15437, han mostrado una alta especificidad para bloquear la actividad $PKC\eta$, dado que esta isoforma es muy abundante en células epiteliales, como las células HeLa. Como estos inhibidores no han sido testeados en otros tipos celulares (Saraiva *et al.*, 2003), esa podría ser una de las razones por las cuales fuimos capaces de bloquear la fragmentación del Golgi mediada por $G\alpha_qQL$ al usar bisindolmaleimida (BIM), a pesar del hecho de que esta droga no figura en los catálogos como un inhibidor específico de $PKC\eta$. Basándonos en estos resultados con los inhibidores de PKC, proponemos que $PKC\eta$ es el candidato principal para activar a la PKD1 en la vía que regula la fisión de membranas en el aparato de Golgi de células HeLa a través de la activación de $G\alpha_q$. Asimismo, como se demostró la participación de PKC y PKD1 en la fisión de vesículas mediada por $G\alpha_q$ en el TGN, nos propusimos corroborar el rol de los productores del DAG necesarios para hacer operativa a esta vía, los cuales, basados en observaciones propias y de otros laboratorios, serían las PI-PLCs. Un inhibidor específico de los miembros de la familia de estas fosfolipasas fue capaz de bloquear la fisión de membrana inducida por $G\alpha_qQL$. Tomando en cuenta que $G\alpha_q$ fue descrita anteriormente como activadora de $PLC\beta_1$, β_3 and β_4a (Kim *et al.*, 1998; Rhee, 2001), cualquiera de estas tres proteínas sería un candidato plausible como iniciador de la síntesis de DAG mediada por esta subunidad de proteína G.

Tomando esta información como antecedente, consideramos que las proteínas G_q pueden activar directamente la vía de $PLC\beta$ para aumentar la cantidad de DAG en el Golgi, lo que permitiría que la PKD1 pueda ser reclutada hacia dicha organela para ser activada por $PKC\eta$, lo que permitiría

posteriormente regular la fisión de vesículas, conjuntamente con la concentración de DAG y la homeostasis de los lípidos. Como se especificó anteriormente, estudios más exhaustivos serán necesarios para poder identificar las subunidades de PLC y PKC específicas involucradas en esta vía de señalización.

Finalmente, la acción de $G\alpha_q$ ha demostrado ejercer una acción directa sobre tráfico vesicular, ya que el transporte de la glicoproteína viral VSVG desde el TGN hacia la membrana plasmática pudo ser restituido al bloquear el accionar de $G\alpha_{qQL}$ con una mutante no prenilada de $G\beta_1\gamma_2$, permaneciendo el complejo heterotrimérico unido a la organela intacta.

La PKD1-KD fue también capaz de impedir la acción de $G\alpha_{qQL}$ sobre el transporte desde el Golgi hacia la membrana plasmática, al bloquear el último paso conocido en la vía de fisión de vesículas desde el Golgi regulada por proteínas G.

En todo este capítulo se ha descrito un nuevo rol para la subunidad $G\alpha_q$, demostrando que estas proteínas se encuentran directamente involucradas en la regulación de la fisión vesicular en el Golgi. Nuestros resultados sugieren que esta subunidad particular de $G\alpha$ sería capaz de estimular la fosforilación de PKD1 en membranas biológicas a través de una vía de señalización claramente distintiva, la cual incluye al DAG generado por una PI-PLC β directamente activada por $G\alpha_q$, y una PKC novel, probablemente la PKC η . En este sistema, el DAG producido cumpliría el doble rol de activar a la PKC (Griner y Kazanietz 2007) y de reclutar a la PKD1 a las membranas del Golgi (Baron y Malhotra 2002).

Aunque se han descrito nuevos componentes de esta vía de señalización a lo largo de los últimos años, aún restan clarificar dos aspectos importantes: por un lado no existen nuevos sustratos definidos para PKD1 que puedan ser caracterizados como responsables de la fisión de membranas en el TGN. El candidato más cercano podría ser la fosfatidilinositol-4-quinasa β (PI4KIII β), la cual fue descrita por Hausser *et al.* en 2005, pero aún no se conoce el mecanismo por el cual esta quinasa podría generar nuevas vesículas. En segundo lugar, uno de los mayores objetivos sería comprender

cómo esta vía de regulación es disparada a nivel de la membrana plasmática, es decir cuáles son los GPCR y sus ligandos específicos que inician esta cascada de señalización.

Hasta la publicación de los resultados que describimos en este capítulo (Coria *et al.* 2014), la búsqueda del inicio de esta vía regulatoria era muy compleja, ya que las subunidades G $\beta\gamma$ son muy promiscuas, interactuando con numerosos GPCR y sustratos, y participando en numerosas vías, como es el caso de $\beta 1\gamma 2$.

El descubrimiento de la participación de G α_q como mediadora del tráfico intracelular permitirá acotar la búsqueda de los GPCR que regularían esta vía de transporte, ya que se conocen con detalle los receptores asociados a esta isoforma de proteína G, como es el caso del receptor muscarínico M3, del cual se ha demostrado que puede inducir la fragmentación del Golgi y la secreción de insulina mediada por PLC β y PKD1. (Saini *et al.*, 2010). En el Gráfico 2 puede observarse un esquema de la vía de regulación de la fisión vesicular en el aparato de Golgi dependiente de proteínas G heterotriméricas, de acuerdo a los resultados de nuestro laboratorio y de otros colegas.

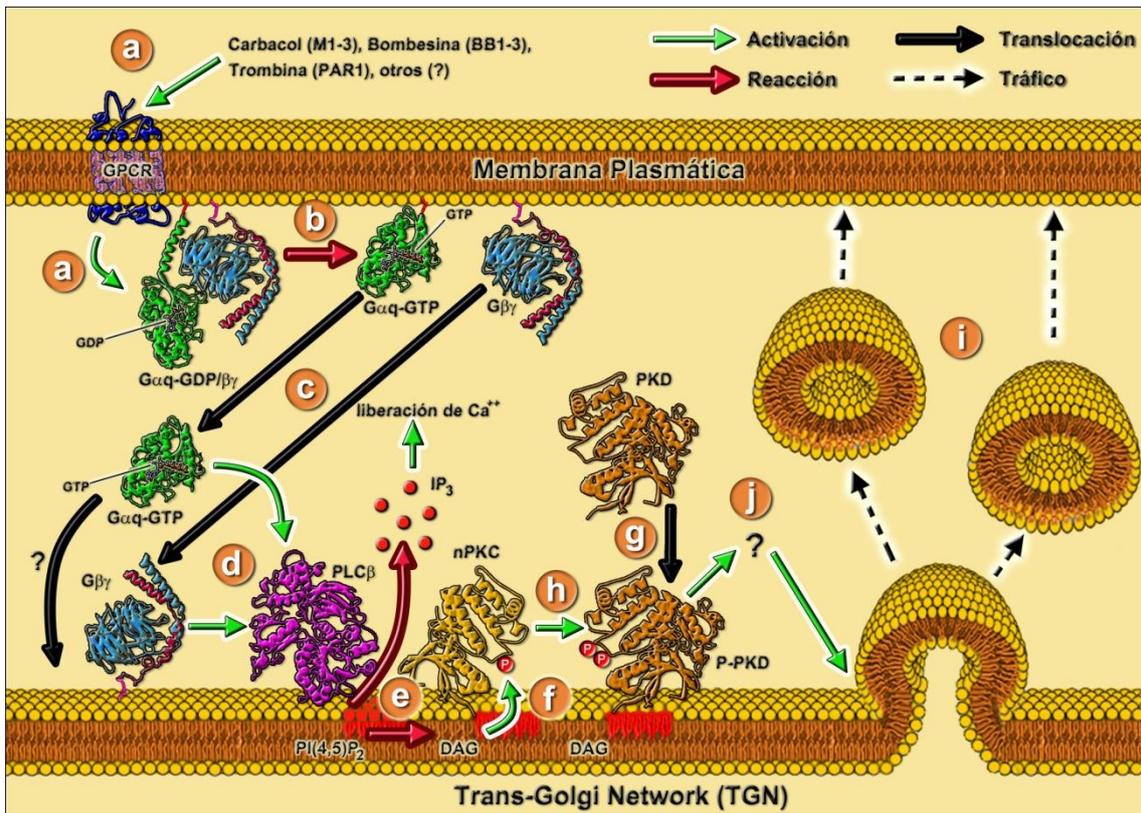


Gráfico 2. Esquema de la vía de regulación de la fisión vesicular en el aparato de Golgi dependiente de proteínas G heterotriméricas descrita en nuestro laboratorio. Una vez iniciada la vía por intermedio de una señal externa que activaría a un receptor acoplado a proteína G (GPCR) (a), la subunidad Gαq intercambiaría GDP por GTP, se separaría

de $\beta\gamma$ (b), y ambas se traslocarían al TGN (c). Allí activarían directamente a una $PLC\beta$ (d), que de esta manera podría catalizar la producción de IP_3 y DAG a partir de $PI_{(4,5)}P_2$ (e). El DAG producido cumpliría dos funciones: por un lado activaría a una PKC novel (f), y por otro favorecería la translocación de la PKD1 al TGN (g), a través de la unión del primer dominio de cisteína de la quinasa a este lípido. De esta manera, la PKC podría activar a la PKD1 (h), a través de la fosforilación de su *loop* de activación (serinas 744/748), la cual una vez activada en el Golgi sería capaz de fosforilar diversos sustratos, aún desconocidos (j), que intervendrían en la formación y fisión de vesículas que llevan su cargo desde el TGN directamente a la superficie celular (i). Adaptado de Coria *et al.* 2014.

En cuanto a la participación de $G\alpha_q$ en esta vía regulatoria, una de las principales controversias se centra en su localización celular. Se sabe que $G\beta\gamma$ puede translocar desde la membrana plasmática hacia el Golgi una vez que es activada (Akgoz *et al.*, 2004; Akgoz *et al.*, 2006; Chisari *et al.*, 2007; Saini *et al.*, 2007; Irannejad y Wedegaertner, 2010; Saini *et al.*, 2010), pero este proceso no había sido descrito para la subunidad $G\alpha_q$. Sin embargo, una publicación reciente ha demostrado que $G\alpha_q$ cicla entre la membrana plasmática y el aparato de Golgi en base a su estado de palmitoilación, a través de la acción de las proteínas residentes del Golgi palmitoil-acil-transferasas 3 y 7 con motivo DHHC, (DHHC3-7) (Tsutsumi *et al.*, 2009). Estas observaciones reforzarían la hipótesis que afirma que la $G\alpha_q$ asociada a un GPCR puede regular el tráfico intracelular desde la superficie celular. De cualquier forma, en el caso de $G\alpha_q$ no podemos descartar un accionar intracelular, ya que trabajos recientes demostraron que estas subunidades de proteínas G se asocian al Golgi a través de los receptores KDEL, los cuales se comportarían como GPCR, y de esa manera serían capaces de regular el tráfico interno de Golgi (Giannotta *et al.*, 2012; Cancino *et al.*, 2013).

Si bien en estas publicaciones los autores demostraron que $G\alpha_q/11$ tendría un rol en el transporte intracelular vía la activación del receptor KDEL en el Golgi, aún no han podido dilucidar la acción concreta de este mecanismo en el tráfico intracelular, sugiriendo que esto podría ocurrir mediante la liberación de calcio y la posterior activación en el Golgi de quinasas de la familia de las Src (*Src family of protein tyrosine kinases* o SFKs).

Por otro lado, estos autores solo evaluaron el rol de Gαq/11 y Gαs, pero no analizaron a las demás subunidades que se indagan en nuestro trabajo, aun sabiéndose que las células HeLa expresan una gran variedad de subunidades α (Krumins y Gilman 2006), y que un amplio número de ellas se encuentran localizadas en el Golgi, como fuera establecido por Michaelson *et al.* 2002 y demostrado para Gαi por Lin *et al.* en 2009.

Todos los resultados presentados en este capítulo de Tesis demuestran fuertemente la participación de las proteínas G heterotriméricas en la regulación de la fisión de vesículas en el aparato de Golgi mediada por PKD1, y al confirmar que Gαq juega un papel central en esta vía, nos encontramos más cerca de dilucidar cómo la señalización extra y/o intracelular es capaz de dirigir el ritmo del tráfico entre el TGN y la membrana plasmática de acuerdo a los requerimientos de la célula.

BIBLIOGRAFIA CAPITULO 1

Akgoz M, Kalyanaraman V, Gautam N. (2004) *Receptor-mediated reversible translocation of the G protein betagamma complex from the plasma membrane to the Golgi complex.* J Biol Chem. 279(49):51541-4.

Akgoz M, Kalyanaraman V, Gautam N. (2006) *G protein betagamma complex translocation from plasma membrane to Golgi complex is influenced by receptor gamma subunit interaction.* Cell Signal. 18(10):1758-68.

Alkon D. L(1998) *Molecular specificity of synaptic changes responsible for associative memory.* Adv Exp Med Biol. 446:1-15. Review.

Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JF. (2000) *H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway.* Mol Cell Biol. (7):2475-87.

Aschrafi A, Franzen R, Shabahang S, Fabbro D, Pfeilschifter J, Huwiler A.(2003) *Ceramide induces translocation of protein kinase C-alpha to the Golgi compartment of human embryonic kidney cells by interacting with the C2 domain.* Biochim Biophys Acta. 1634(1-

2):30-9.

Azpiazu I, Akgoz M, Kalyanaraman V, Gautam N. (2006) ***G protein betagamma11 complex translocation is induced by Gi, Gq and Gs coupling receptors and is regulated by the alpha subunit type.*** Cell Signal. (8):1190-200.

Bae YS, Lee TG, Park JC, Hur JH, Kim Y, Heo K, Kwak JY, Suh PG, Ryu SH. (2003) ***Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity.*** Mol Pharmacol. 63(5):1043-50.

Baldassarre M, Dragonetti A, Marra P, Luini A, Isidoro C, Buccione R.(2000) ***Regulation of protein sorting at the TGN by plasma membrane receptor activation.*** J Cell Sci. 113 (Pt 4):741-8.

Baron, C. L. and Malhotra, V. (2002) ***Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane.*** Science **295**, 325–328).

Berna MJ, Hoffmann KM, Tapia JA, Thill M, Pace A, Mantey SA, Jensen RT.(2007) ***CCK causes PKD1 activation in pancreatic acini by signaling through PKC-delta and PKC-independent pathways.*** Biochim Biophys Acta. 1773(4):483-501.

Breitkreutz D, Braiman-Wiksmann L, Daum N, Denning MF, Tennenbaum T. (2007) ***Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium.*** J Cancer Res Clin Oncol. 133(11):793-808. Review.

Cabrera, M., Muñiz, M., Hidalgo, J., Vega, L., Martín, M.E., and Velasco, A. (2003) ***The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus.*** Mol Biol Cell. Vol 10:4114-25.

Cancino J, Capalbo A, Luini A. (2013) ***Golgi-dependent signaling: self-coordination of membrane trafficking.*** Methods Cell Biol. 118:359-82.

Coria AS, Masseroni ML, Díaz Añel AM. (2014) ***Regulation of PKD1-mediated Golgi to cell surface trafficking by Gαq subunits.*** Biol Cell. 106(1):30-43.

Chi, S., Cao, H., Chen, J. y McNiven, M. A. (2008). ***Eps15 mediates vesicle trafficking from***

- the trans-Golgi network via an interaction with the clathrin adaptor AP-1.* Mol. Biol. Cell **19**, 3564-3575.
- Chisari M, Saini DK, Kalyanaraman V, Gautam N. (2007) *Shuttling of G protein subunits between the plasma membrane and intracellular membranes.* J Biol Chem. 282(33):24092-8.
- Colón-González F, Kazanietz MG. (2006) *C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions.* Biochim Biophys Acta. 1761(8):827-37.
- Dhanasekaran N, Prasad MV. (1998) *G protein subunits and cell proliferation.* Biol Signals Recept. 7(2):109-17.
- Díaz Añel A.M. (2007) *Phospholipase C beta3 is a key component in the Gbetagamma/PKCeta/PKD-mediated regulation of trans-Golgi network to plasma membrane transport.* Biochem J. 406(1):157-65.
- Díaz Añel y Malhotra (2005) *PKCeta is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus.* J Cell Biol.;169(1):83-91.
- Díaz Añel, A. M. and Malhotra, V. (2005) *PKCeta is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus.* J. Cell Biol. 169, 83–91
- Dries DR, Gallegos LL, Newton AC. (2007) *A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production.* J Biol Chem. 282(2):826-30. Epub 2006 Oct 27.
- Dries y Newton (2008) *Kinetic analysis of the interaction of the C1 domain of protein kinase C with lipid membranes by stopped-flow spectroscopy.* J Biol Chem. 283(12):7885-93.
- Dutil EM, Toker A, Newton AC. (1998) *Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1).* Curr Biol. 8(25):1366-75.
- Edwards AS, Newton AC.(1997) *Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal*

hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. J Biol Chem. 272(29):18382-90.

Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE. (1998) *Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors.* Annu Rev Biochem. 70:281-312. Review.

Gallo A, Ceolotto G, Pinton P, Iori E, Murphy E, Rutter GA, Rizzuto R, Semplicini A, Avogaro A. (2005) *Metformin prevents glucose-induced protein kinase C-beta2 activation in human umbilical vein endothelial cells through an antioxidant mechanism.* Diabetes. 54(4):1123-31.

Garczarczyk D, Toton E, Biedermann V, Rosivatz E, Rechfeld F, Rybczynska M, Hofmann J. (2009) *Signal transduction of constitutively active protein kinase C epsilon.* Cell Signal. 21(5):745-52.

Giannotta M, Ruggiero C, Grossi M, Cancino J, Capitani M, Pulvirenti T, Consoli GM, Geraci C, Fanelli F, Luini A, Sallese M. (2012) *The KDEL receptor couples to Gαq/11 to activate Src kinases and regulate transport through the Golgi.*

Golebiewska U, Scarlata S. (2010) *The effect of membrane domains on the G protein-phospholipase Cβ signaling pathway.* Crit Rev Biochem Mol Biol. 45(2):97-105.

Gong J, Hoyos B, Acin-Perez R, Vinogradov V, Shabrova E, Zhao F, Leitges M, Fischman D, Manfredi G, Hammerling U. (2012) *Two protein kinase C isoforms, δ and ε, regulate energy homeostasis in mitochondria by transmitting opposing signals to the pyruvate dehydrogenase complex.* FASEB J. 26(8):3537-49.

Gopalakrishna R, Jaken S. (2000) *Protein kinase C signaling and oxidative stress.* Free Radic Biol Med. 28(9):1349-61.

Graziano MP, Gilman AG. (1989) *Synthesis in Escherichia coli of GTPase-deficient mutants of Gs alpha.* J Biol Chem. 264(26):15475-82.

- Hansra G, Bornancin F, Whelan R, Hemmings BA, Parker PJ. (1996) *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dephosphorylation of protein kinase Calpha correlates with the presence of a membrane-associated protein phosphatase 2A heterotrimer*. J Biol Chem. 271(51):32785-8.
- Hongpaisan J, Alkon DL. (2007) *A structural basis for enhancement of long-term associative memory in single dendritic spines regulated by PKC*. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(49):19571-6.
- Hynes TR, Mervine SM, Yost EA, Sabo JL, Berlot CH. (2004) *Live cell imaging of Gs and the beta2-adrenergic receptor demonstrates that both alphas and beta1gamma7 internalize upon stimulation and exhibit similar trafficking patterns that differ from that of the beta2-adrenergic receptor*. J Biol Chem. 279(42):44101-12.
- Irannejad y Wedegaertner, (2010) *Regulation of constitutive cargo transport from the trans-Golgi network to plasma membrane by Golgi-localized G protein betagamma subunits*. J Biol Chem. 285(42):32393-404.
- Jacamo R, Sinnott-Smith J, Rey O, Waldron RT, Rozengurt E. (2008) *Sequential protein kinase C (PKC)-dependent and PKC-independent protein kinase D catalytic activation via Gq-coupled receptors: differential regulation of activation loop Ser(744) and Ser(748) phosphorylation*. J Biol Chem.;283(19):12877-87.
- Jamora C1, Takizawa PA, Zaarour RF, Denesvre C, Faulkner DJ, Malhotra V. (1997) *Regulation of Golgi structure through heterotrimeric G proteins*. Cell.;91(5):617-26.
- Jamora, C., Yamanouye, N., Van Lint, J., Laudenslager, J., Vandenheede, J. R., Faulkner, D. J. and Malhotra, V. (1999) *Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D*. Cell 98, 59–68
- Kajimoto T, Sawamura S, Tohyama Y, Mori Y, Newton AC. (2010) *Protein kinase C {delta}-specific activity reporter reveals agonist-evoked nuclear activity controlled by Src family of kinases*. J Biol Chem. 2010 Dec 31;285(53):41896-910.

- Kajimoto T, Shirai Y, Sakai N, Yamamoto T, Matsuzaki H, Kikkawa U, Saito N. (2004) ***Ceramide-induced apoptosis by translocation, phosphorylation, and activation of protein kinase Cdelta in the Golgi complex.*** J Biol Chem. 279(13):12668-76.
- Kim MJ, Min DS, Ryu SH, Suh PG. (1998) ***A cytosolic, galphaq- and betagamma-insensitive splice variant of phospholipase C-beta4.*** J Biol Chem. 273(6):3618-24.
- Kong KC, Butcher AJ, McWilliams P, Jones D, Wess J, Hamdan FF, Werry T, Rosethorne EM, Charlton SJ, Munson SE, Cragg HA, Smart AD, Tobin AB.(2010) ***M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1.*** Proc Natl Acad Sci U S A. 107(49):21181-6.
- Kranenburg O, Verlaan I, Moolenaar WH. (1999) ***Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase.*** J Biol Chem. 10;274(50):35301-4.
- Krumins AM, Gilman AG.(2006) ***Targeted knockdown of G protein subunits selectively prevents receptor-mediated modulation of effectors and reveals complex changes in non-targeted signaling proteins.*** J Biol Chem. 281(15):10250-62.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. (1998) ***Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1.*** Science. 281(5385):2042-5.
- Lee SB, Shin SH, Hepler JR, Gilman AG, Rhee SG. (1993) ***Activation of phospholipase C-beta 2 mutants by G protein alpha q and beta gamma subunits.*** J Biol Chem. 268(34):25952-7.
- Li J, O'Connor KL, Hellmich MR, Greeley GH Jr, Townsend CM Jr, Evers BM.(2004) ***The role of protein kinase D in neurotensin secretion mediated by protein kinase C-alpha/-delta and Rho/Rho kinase.*** J Biol Chem. 279(27):28466-74.
- Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J. and Malhotra, V. (2001) ***Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-***

Golgi network. Cell 104, 409–420

Lin P, Fischer T, Lavoie C, Huang H, Farquhar MG.(2009) ***Calnuc plays a role in dynamic distribution of Galphai but not Gbeta subunits and modulates ACTH secretion in AtT-20 neuroendocrine secretory cells.*** Mol Neurodegener. 4:15.

Maeda Y, Beznoussenko GV, Van Lint J, Mironov AA, Malhotra V. (2001) ***Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain.*** EMBO J.;20(21):5982-90.

Maissel A, Marom M, Shtutman M, Shahaf G, Livneh E. (2006) ***PKCeta is localized in the Golgi, ER and nuclear envelope and translocates to the nuclear envelope upon PMA activation and serum-starvation: C1b domain and the pseudosubstrate containing fragment target PKCeta to the Golgi and the nuclear envelope.*** Cell Signal. 18(8):1127-39.

Marrari Y, Crouthamel M, Irannejad R, Wedegaertner PB (2007) ***Assembly and trafficking of heterotrimeric G proteins.*** Biochemistry 46 7665–7677.

Michaelson D, Ahearn I, Bergo M, Young S, Philips M. (2002) ***Membrane trafficking of heterotrimeric G proteins via the endoplasmic reticulum and Golgi.*** Mol Biol Cell. 13(9):3294-302.

Michaelson D, Ahearn I, Bergo M, Young S, Philips M. (2002) ***Membrane trafficking of heterotrimeric G proteins via the endoplasmic reticulum and Golgi.*** Mol Biol Cell. 13(9):3294-302.

Morris AJ, Scarlata S. (1997) ***Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes.*** Biochem Pharmacol. 54(4):429-35.

Nalefski E. A, Newton A. C. (2001). ***Membrane binding kinetics of protein kinase C betaII mediated by the C2 domain.*** Biochemistry. 40(44):13216-29.

Newton A. C. (2010) ***Protein kinase C: poised to signal.*** Am J Physiol Endocrinol Metab. 298(3):E395-402.

- Ohno S, Kawasaki H, Imajoh S, Suzuki K, Inagaki M, Yokokura H, Sakoh T, Hidaka H. (1987) *Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C*. Nature. 14;325(7000):161-6.
- Ozgen N, Obrezchikova M, Guo J, Elouardighi H, Dorn GW 2nd, Wilson BA, Steinberg SF. (2008) *Protein kinase D links Gq-coupled receptors to cAMP response element-binding protein (CREB)-Ser133 phosphorylation in the heart*. J Biol Chem. 283(25):17009-19.
- Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. (2001) *The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action*. EMBO J. 20(11):2690-701.
- Poole DP, Amadesi S, Rozengurt E, Thacker M, Bunnett NW, Furness JB. (2008) **Stimulation of the neurokinin 3 receptor activates protein kinase C epsilon and protein kinase D in enteric neurons**.
- Razzini, G., Brancaccio, A., Lemmon, M. A., Guarnieri, S. and Falasca, M. (2000) *The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase Cbeta (1)*. J. Biol. Chem. 275, 14873–14881
- Rebecchi MJ, Pentylala SN. (2000) *Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C*. Physiol Rev. 2000 Oct;80(4):1291-335.
- Rhee SG. (2001) *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C*. Annu Rev Biochem.70:281-312.
- Saini DK, Kalyanaraman V, Chisari M, Gautam N. (2007) *A family of G protein βγ subunits translocate reversibly from the plasma membrane to endomembranes on receptor activation*. J Biol Chem. 282(33):24099-108.
- Saini DK, Karunarathne WK, Angaswamy N, Saini D, Cho JH, Kalyanaraman V, Gautam N.(2010) *Regulation of Golgi structure and secretion by receptor-induced G protein βγ*

- complex translocation.** Proc Natl Acad Sci U S A. 107(25):11417-22.
- Saraiva L, Fresco P, Pinto E, Gonçalves J. (2003) ***Isoform-selectivity of PKC inhibitors acting at the regulatory and catalytic domain of mammalian PKC-alpha, -betaI, -delta, -eta and -zeta.*** J Enzyme Inhib Med Chem. 18(6):475-83.
- Scott AM, Antal CE, Newton AC. (2013) ***Electrostatic and hydrophobic interactions differentially tune membrane binding kinetics of the C2 domain of protein kinase Ca.*** J Biol Chem. 288(23):16905-15.
- Sondek y Siderovski (2001) ***Ggamma-like (GGL) domains: new frontiers in G-protein signaling and beta-propeller scaffolding.*** Biochem Pharmacol. 61(11):1329-37.
- Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, Ramracheya R, Caille D, Jiang H, Platt KA, Meda P, Aebersold R, Rorsman P, Ricci R. (2009) ***Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis.*** Cell. 136(2):235-48. G protein betagamma-subunits. J Biol Chem. 276(51):48257-61.
- Sun MK, Alkon DL. (2014) ***The "memory kinases": roles of PKC isoforms in signal processing and memory formation.*** Prog Mol Biol Transl Sci. 122:31-59.
- Takizawa PA, Malhotra V. (1993) ***Coatomers and SNAREs in promoting membrane traffic.*** Cell. 75(4):593-6. Review.
- Tsutsumi R, Fukata Y, Noritake J, Iwanaga T, Perez F, Fukata M.(2009) ***Identification of G protein alpha subunit-palmitoylating enzyme.*** Mol Cell Biol. (2):435-47.
- Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenheede JR, Seufferlein T. (2002) ***Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move.*** Trends Cell Biol. (4):193-200. Review.
- Waldron RT, Iglesias y Rozengurt, (1999) ***The pleckstrin homology domain of protein kinase D interacts preferentially with the eta isoform of protein kinase C.*** The Journal of Biological Chemistry, 274,9224-9230.
- Weinstein H, Scarlata S. (2011) ***The correlation between multidomain enzymes and multiple***

activation mechanisms--the case of phospholipase C β and its membrane interactions.

Biochim Biophys Acta. 1808(12):2940-7.

Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, Rivera H, Halpern AE, Phung HM, Negro-Vilar A, Hannun YA. (1992) *Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes.* J Cell Biol. 117(1):121-33.

Wilson B. A and Ho. M. (2004) *Pasteurella multocida toxin as a tool for studying Gq signal transduction.* Rev Physiol Biochem Pharmacol. 152:93-109.

Wing MR, Houston D, Kelley GG, Der CJ, Siderovski DP, Harden TK. (2001) *Activation of phospholipase C-epsilon by heterotrimeric G protein betagamma-subunits.* J Biol Chem. 276(51):48257-61.

Wing, M. R., Houston, D., Kelley, G. G., Der, C. J., Siderovski, D. P. and Harden, T. K. (2001) *Activation of phospholipase C-epsilon by heterotrimeric G protein betagamma-subunits.* J. Biol. Chem. 276, 48257–48261.

Wing MR, Houston D, Kelley GG, Der CJ, Siderovski DP, Harden TK. (2003) *Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity.* Mol Pharmacol. 63(5):1043-50.

Waldron RT, Innamorati G, Torres-Marquez ME, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. *Differential PKC-dependent and -independent PKD activation by G protein α subunits of the Gq family: selective stimulation of PKD Ser⁷⁴⁸ autophosphorylation by G α q.* Cell Signal. (4):914-21.

Yamaguchi K, Ogita K, Nakamura S, Nishizuka Y. (1995) *The protein kinase C isoforms leading to MAP-kinase activation in CHO cells.* Biochem Biophys Res Commun. 210(3):639-47.

Yeaman C, Ayala MI, Wright JR, Bard F, Bossard C, Ang A, Maeda Y, Seufferlein T, Mellman I, Nelson WJ, Malhotra V. (2004) *Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network.* Nat Cell Biol.;6(2):106-12. Epub 2004 Jan 25.

Yuan J, Slice L, Walsh JH, Rozengurt E. *Activation of protein kinase D by signaling through*

the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G(q). J Biol Chem. 275(3):2157-64.

Yuan J, Slice L, Walsh JH, Rozengurt E.(2000) *Activation of protein kinase D by signaling through the alpha subunit of the heterotrimeric Gprotein G(q).* J Biol Chem. 275(3):2157-64.

Yuan J, Slice LW, Gu J, Rozengurt E. (2003) *Cooperation of Gq, Gi, and G12/13 in protein kinase D activation and phosphorylation induced by lysophosphatidic acid.* J Biol Chem. 278(7):4882-91.

CAPÍTULO 2

Rol de la Proteína Quinasa D1 (PKD1) y sus activadores en la distribución y funcionalidad de los receptores neurotróficos del tipo Trk

Resumen

En este capítulo evaluamos la relación entre la proteína quinasa D1 y el tráfico hacia la superficie neuronal de los receptores de neurotrofinas, TrkA y TrkB. Al establecer la relación entre el *sorting* y la funcionalidad de estos receptores, a su vez clarificamos aspectos esenciales del transporte mediado por PKD1 en neuronas de hipocampo en cultivo. Al mismo tiempo, establecimos una asociación entre la plasticidad sináptica y el transporte de receptores mediado por la vía de señalización en la que participa PKD1 ($G\beta\gamma$, PLCs, PKCs, PKD1). Pudimos observar que la localización somatodendrítica normal de TrkA y TrkB fue modificada en ausencia de una PKD1 activa, viéndose en el caso de TrkA una retención en el aparato de Golgi, mientras que en el caso de TrkB el mismo pasó a localizarse en la dendrita apical y en el soma.

A la vez el LTP (*Long-term potentiation*) en neuronas sobreexpresando TrkB, y el *Status epilepticus* (SE) para el receptor TrkB endógeno se vieron modificados en ausencia de una PKD1 activa. En ambos análisis, la inserción del receptor TrkB en la membrana plasmática fue modificada.

Con base en estos resultados, proponemos un nuevo rol para la PKD1, ya que como reguladora del transporte de TrkA y TrkB en neuronas, participaría a su vez en la modulación del LTP, el SE y en la modificación del largo y número dendrítico neuronal.

Abstract

In this chapter, we have evaluated the relationship between protein kinase D1 and the trafficking to the neuronal surface of neurotrophin receptors TrkA and TrkB. Once established the relationship between sorting and functionality of these receptors, we have also clarified essential aspects of PKD1 mediated trafficking in hippocampal neuronal culture. At the same time, we have

established an association between synaptic plasticity and PKD1-mediated neurotrophin receptor transport ($G\beta\gamma$, PLCs, PKCs, PKD1). We have shown that TrkA somatodendritic normal localization was modified in absence of PKD1 activity, being retained at the Golgi Apparatus, at the same time as TrkB somatodendritic receptor was distributed to the apical dendrite and soma in the same conditions.

In TrkB overexpressing neurons and for endogenous TrkB, LTP and Status epilepticus were respectively modified when PKD1 activity was blocked. In both analyses TrkB plasma membrane insertion was modified in.

Based in these results, we propose a novel role for PKD1, since as a regulator of TrkA and TrkB trafficking in neurons, it would be also involved in the modulation of LTP, SE and dendritic length and number.

Introducción

Nuestro trabajo se ha enfocado en los últimos años en el estudio de la regulación del tráfico de proteínas en células de mamíferos. Estos estudios nos han llevado a describir una nueva vía de transducción de señales capaz de regular la fisión de las vesículas que se originan en la cara trans del aparato de Golgi (*trans Golgi network* o TGN) con destino a la membrana plasmática, cuya señal se originaría en la misma superficie celular para coordinar la velocidad de flujo de vesículas de acuerdo a las necesidades de la célula.

En células epiteliales tipo HeLa esta vía de señalización está integrada por subunidades $\beta\gamma$ (Díaz Añel y Malhotra 2005) y α_q (Coria *et al.* 2014) de proteínas G heterotriméricas, fosfolipasa C β_3 (PLC β_3 ; Díaz Añel 2007), la Proteína Quinasa C novel η (PKC η ; Díaz Añel y Malhotra 2005) y la Proteína Quinasa D1 (Jamora *et al.* 1999, Liljedahl *et al.* 2001).

A partir de un trabajo en colaboración con el laboratorio del Dr. Alfredo Cáceres del INIMEC-CONICET-UNC, decidimos estudiar si esta vía de señalización participaba también en la regulación de sistemas de transporte más complejos, como el que existe en células polarizadas, que son aquellas

que poseen dos tipos de membranas plasmáticas que se diferencian tanto por su estructura y composición proteica como por sus funciones específicas.

El modelo que se utilizó para este capítulo del trabajo de Tesis son las neuronas piramidales en cultivo primario, las cuales representan la población mayoritaria en el hipocampo y en la corteza del sistema nervioso central (SNC). Las mismas se caracterizan por poseer un soma de forma piramidal que le da el nombre a este tipo celular, además de un compartimiento axonal y compartimientos dendríticos apicales y basales.

Las neuronas piramidales no son todas idénticas, si bien se pueden identificar principios de funcionamiento similares, en particular la existencia de dominios dendríticos con diferentes *inputs* sinápticos, excitabilidad, modulación y plasticidad, las cuales son funciones comunes que permiten que las sinapsis se gesten a lo largo de los árboles dendríticos para contribuir a la generación del potencial de acción.

Todas las neuronas piramidales poseen numerosas dendritas basales cortas, y usualmente una sola dendrita apical larga que conecta el soma con lo que se conoce como la región *tuft* (“penacho”) de las dendritas. Esta dendrita apical principal se bifurca antes de dar lugar al *tuft* a una distancia variable del soma, y en algunos casos resulta en la aparición de una dendrita apical melliza la cual se bifurca nuevamente. En muchos casos existen dendritas apicales oblicuas que emanan desde la dendrita apical principal en varios ángulos (Figura1).

Los diferentes compartimientos de la neurona -soma, basal, apical, tronco, oblicuo y dendritas del *tuft*- reciben información de varias fuentes diferentes de las capas corticales. Los *inputs* excitatorios e inhibitorios de las fuentes locales son comúnmente recibidos por el soma y las dendritas basales, mientras que los *inputs* que provienen de sectores más distantes, como las proyecciones corticales y talámicas, son recibidos por las dendritas oblicuas y distales del *tuft*. (Petreanu *et al.*, 2009; para review leer DeFelipe y Farinas 1992; Bannister 2005; Sprouston 2008)

Para el trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Cáceres, se utilizaron cultivos primarios

de neuronas embrionarias de hipocampo de rata con polaridad dendrita-axón establecida de 7 días *in vitro* (7 D.I.V.), a las cuales se les bloqueó la actividad endógena de PKD1 a través de la sobreexpresión de la variante dominante negativa de esta quinasa (PKD1-KD), o mediante la expresión de un ARN de interferencia específico del tipo *small hairpin* (shARN-PKD1).

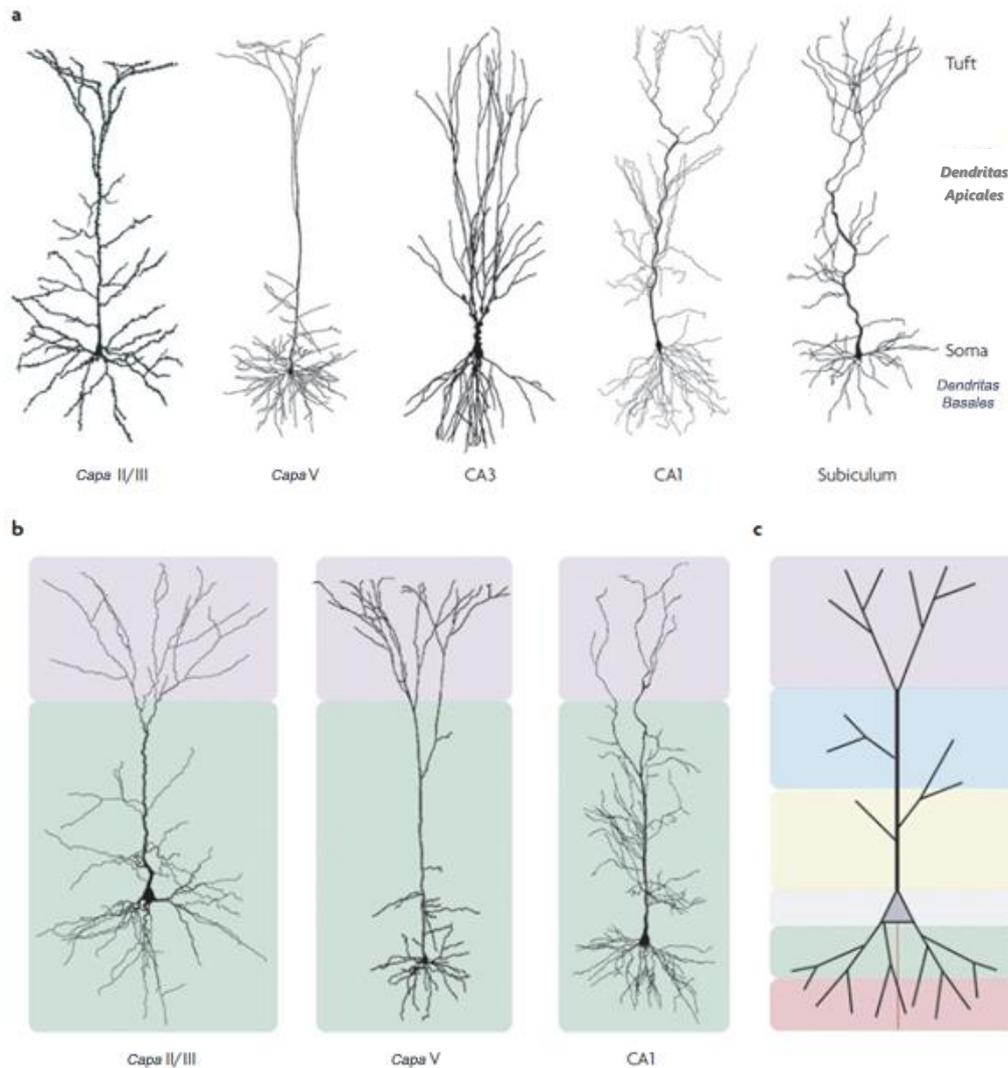


Figura 1. Estructura de las neuronas piramidales y de los dominios del *input* sináptico. A) la estructura de las neuronas piramidales de diferentes áreas corticales. Cada tipo de neurona piramidal tiene dendritas basales y apicales y un *tuft* apical, pero existen diferencias considerables entre este tipo de neuronas que aquí se muestran. Las de la capa V tienen dendritas apicales mas largas y menos dendritas oblicuas apicales en relación a las de la capa II/III. Las dendritas apicales de la capa CA3 hipocampal se ramifican más próximas al soma que aquellas de la capa CA1, las cuales típicamente tiene una dendrita apical principal bien destacada y un *tuft*. Las neuronas del CA3 tienen también una

acumulación de espinas grandes en los primeros 100 μm de la porción de la dendrita apical. El largo vertical de cada célula, de derecha a izquierda es: desconocido, 1180 μm , 580 μm , 730 μm , 790 μm . Todas las células son de rata, excepto las de la capa II/III que son de conejo. B) El *tuft* apical (resaltado con un fondo purpura) de las neuronas piramidales recibe los *inputs* excitatorios de sinapsis que tienen diferentes orígenes presinápticos que aquellos que forman sinapsis con las dendritas apicales más próximas o con las dendritas basales (resaltadas por un fondo verde). Las porciones basales y proximal de las dendritas apicales de las capas II/III reciben los *inputs* desde las capas IV y también reciben excitación del circuito local. El *tuft* apical de las capas II/III también recibe *inputs* de otras áreas corticales y también *inputs* no específicos desde el tálamo. Un arreglo similar puede ser identificado en la capa V de las células piramidales. Las dendritas apicales basales y proximales de las células piramidales CA1 recibe *inputs* primariamente desde las células CA3, mientras que los *tuft* apicales reciben *input* desde la corteza entorrinal y el núcleo reuniens talámico. C) un dibujo esquemático de las neuronas piramidales, que ilustra los diversos dominios dendríticos que pueden recibir *inputs* sinápticos únicos. Algunas evidencias sostienen que los árboles dendríticos de las células piramidales se dividen en al menos todos estos dominios, los cuales corresponden a regiones que reciben *inputs* sinápticos distintos y/o poseen sinapsis con diferentes propiedades (modificado de Sprouton 2008).

Utilizando ambos enfoques, pudo observarse que si bien la ausencia de una PKD1 activa no produjo efectos inmediatos en el crecimiento dendrítico (Bisbal *et al.* 2008) como los descritos en neuronas jóvenes (2-3 D.I.V.; Horton *et al.* 2005), recién a partir de las 30 horas del bloqueo de la actividad quinasa se comenzó a observar una reducción en el tamaño y número de las dendritas, algo que podría atribuirse a una posible falla en la distribución de proteínas implicadas en el proceso de crecimiento dendrítico, como por ejemplo los receptores de factores neurotróficos del tipo tropomiosina, conocidos como receptores Trk.

También se observó que el bloqueo de la actividad de PKD1, ya sea por sobre-expresión de PKD1-KD o bloqueando su síntesis con un shRNA específico, no fue capaz de inhibir la fisión de vesículas que salen del TGN, a diferencia de lo observado en células no polarizadas (Liljedahl *et al.* 2001). Además, los marcadores axonales (como la molécula de adhesión L1) no vieron afectados su destino final en la región terminal del axón. Por otro lado, en esas mismas condiciones experimentales ambos marcadores dendríticos analizados, el receptor de transferrina (TfR) y el receptor relacionado

con LDL (LRP), que se localizan normalmente tanto en el citoplasma como en la superficie celular de la región somato-dendrítica, mostraron una localización intracelular en toda la neurona, incluido el axón, teniendo como sitio de inserción final la membrana plasmática de la zona terminal del axón, en forma idéntica a como se ha observado para algunos marcadores característicos de ese compartimento neuronal (Bisbal *et al.* 2008).

Experimentos adicionales demostraron que los marcadores dendríticos que cambian su localización ante la ausencia de actividad PKD1, si bien seguían siendo capaces de insertarse en la membrana plasmática de las dendritas, eran rápidamente endocitados y reciclados al axón en un proceso conocido como *transcitosis* (Bisbal *et al.* 2008), de manera similar a como fuera observado para el marcador axonal VAMP2, que debe su localización característica a un proceso conocido como *retención selectiva* (Sampo *et al.* 2003).

En base a estos resultados preliminares, podría afirmarse que la PKD1 en neuronas estaría involucrada en la regulación, probablemente a nivel de la selectividad de cargo que se lleva a cabo en el TGN y/o a nivel de la membrana plasmática, del tráfico y la distribución de un grupo selecto de proteínas de membrana típicamente dendríticas.

Interesantemente, nuevos resultados de nuestro laboratorio demostraron que la PKD1 y sus efectores inmediatos -PKC noveles y PLC del tipo β - también regularían el transporte de otros tipos de proteínas de membrana, pero de manera diferente a la descrita hasta ahora. Por ejemplo, receptores del tipo GPCR para el neurotransmisor glutamato -conocidos como receptores metabotrópicos-, cuya localización fisiológica en ausencia de ligando es somato-dendrítica, no abandonaron su normal lugar en membrana cuando se bloqueó la actividad de la PKD1, pero en dichas condiciones el índice de polaridad axón/dendrita del receptor se vio significativamente modificado al desviarse una gran parte del mismo hacia el axón. Este resultado fue válido tanto para el receptor mGluR1 (Fraire, Masseroni *et al.* 2014) como para el mGluR5 (Tesis M.L. Masseroni, 2013; Masseroni *et al.*, en preparación).

Por otro lado, para otra proteína típica de membranas dendríticas, la subunidad NR2A del receptor para el neurotransmisor NMDA, la ausencia en neuronas de una actividad normal de PKD1

o de sus efectores río arriba reveló resultados muy diferentes a los descritos hasta ahora para proteínas de este tipo. En el caso de NR2A, el bloqueo de la vía regulatoria del transporte produjo una completa internalización de la proteína sin relocalización a ningún tipo de membrana, ubicándose la misma en estructuras de tipo endosomal dentro del citoplasma neuronal (Tesis M.L. Masseroni, 2013).

En base a lo observado, creemos que el bloqueo de la actividad de la vía que activa PKD1 también podría afectar el tráfico de los receptores de factores tróficos dendríticos NGF (*Nerve Growth Factor* o factor de crecimiento nervioso) y BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* o factor neurotrófico derivado de cerebro), conocidos como TrkA y TrkB respectivamente, y que el cambio en la distribución de estos receptores influiría de manera notoria en la actividad neuronal normal dependiente de estos receptores.

Existen otros antecedentes de defectos en el transporte de este tipo de receptores asociados al desarrollo de los procesos neuronales, tanto dendríticos como axonales. Por ejemplo, se ha encontrado recientemente que una disminución en el transporte del receptor del NGF, por defectos en el tráfico de la proteína asociada a la Huntingtina-1 (HAP-1 o *Huntingtin Associated Protein-1*), conduce a una inhibición del crecimiento de las neuritas en neuronas hipotalámicas en cultivo (Rong *et al.* 2006). Es importante aclarar que la HAP-1 y su proteína asociada huntingtina (htt) han sido involucradas en la patología de la enfermedad neurológica de Huntington (Li y Li 2005).

Factores de Crecimiento: descubrimiento de NGF y BDNF

La era de los factores de crecimiento comenzó hace sesenta años, cuando Rita Levi-Montalcini, Viktor Hamburger y Stanely Cohen en 1953, descubrieron el factor de crecimiento nervioso o NGF.

Desde ese momento se han realizado numerosas investigaciones para dilucidar el funcionamiento neuronal mediado por la neurotrofinas (NT), tanto en lo que se refiere a desórdenes psiquiátricos, neurodegenerativos y de desarrollo, además de sus acciones clásicas en cuanto a la supervivencia neuronal, crecimiento dendrítico y axonal, axón *guidance*, estructura sináptica y sus conexiones, liberación de neurotransmisores, potenciación a largo plazo (*Long Term Potentiation* o LTP) y plasticidad sináptica.

Luego de la secuenciación de los genomas de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, se descubrió que en estos dos organismos no existen las NT ni sus receptores, reforzando la idea de que estas proteínas no serían absolutamente necesarias para el desarrollo de los circuitos neuronales *per se*, pero que estarían involucradas en otras actividades, como por ejemplo influenciando muchos aspectos de la actividad neuronal que resulta en la generación de nuevas conexiones sinápticas, las cuales pueden ser duraderas. Las alteraciones en los niveles de NT y sus receptores tienen además efectos profundos en una amplia variedad de fenómenos, como la mielinización, regeneración, dolor, agresión, depresión y abuso de sustancias. (Chao 2003).

Este descubrimiento del NGF como miembro de una familia de factores de crecimiento estructurados similarmente, más conocidos como neurotrofinas, generó un gran interés en el área de la comunicación de células nerviosas, durante el desarrollo del sistema nervioso, y en la neuroplasticidad, memoria y aprendizaje en el sistema nervioso adulto. Dentro de la familia de neurotrofinas, además de los ya mencionados NGF y BDNF, se pueden encontrar la Neurotrofina-3 (NT-3) y la Neurotrofina-4 (NT-4), quienes regulan una amplia variedad de funciones neuronales actuando a través de los receptores p75NTR, TrkA, TrkB y TrkC.

El aislamiento exitoso del NGF de la glándula salival fue muy importante para la época, dada la precariedad de las técnicas de fraccionamiento celular que existían hasta el momento. En los años 1960, Cohen *et al.* demostraron *in vivo* que la inyección del anticuerpo contra NGF causa la muerte de las neuronas simpáticas. Poco tiempo después comenzaron a descubrirse los otros factores de crecimiento que conocemos actualmente.

En los años 1980, en base a evidencias previas que demostraban que el ganglio sensorial, distribuido segmentalmente a lo largo del tronco de los vertebrados, deriva de la cresta neural, pudo descubrirse que muchos ganglios sensoriales craneales derivan asimismo desde las placodas (láminas del ectodermo) epiteliales. Se pudo corroborar que los factores tróficos derivados de estas placodas eran requeridos para el desarrollo y supervivencia de las neuronas derivadas de la cresta neural o de la placoda periférica de las neuronas sensoriales, y que no solo el NGF promovía la supervivencia de las neuronas sensoriales derivadas de la cresta neural. Dichas observaciones llevaron al grupo de Barde *et al.* en 1982 al descubrimiento y clonado del BDNF como un factor trófico.

Los análisis de la secuencia nucleotídica revelaron que el NGF y el BDNF están estructuralmente relacionados (Leibrock *et al.* 1989). Muchos equipos de investigación reconocieron posteriormente regiones altamente conservadas en los transcritos del NGF y del BDNF, permitiendo el diseño de los *primers* para las reacciones en cadena de polimerasa (PCR), descubriendo con ello a las neurotrofinas NT-3 (Hohn *et al.* 1990; Jones y Reichardt 1990; Maisonpierre *et al.* 1990; Rosenthal *et al.* 1990) y a la NT-4 (Berkemeier *et al.* 1991).

Estructura de las Neurotrofinas

En cuanto a la estructura de las neurotrofinas, las encontramos como NT maduras y pro-NT, existiendo las maduras como dímeros asociados no covalentemente que pesan alrededor de 13,5 kDa. Las NT son inicialmente sintetizadas como precursores o pro-NT, las cuales son clivadas para producir las NT maduras. Las pro-NT son clivadas intracelularmente por furina o pro-convertasa en un sitio de clivaje de aminoácidos dibásicos para liberar la porción carboxilo terminal de las proteínas maduras, pudiendo ocurrir este clivaje en el aparato de Golgi o dentro de vesículas secretoras. Las proteínas maduras, que pesan alrededor de 12 kDa, forman dímeros estables, no covalentes, y están normalmente expresadas en bajos niveles durante el desarrollo. La porción amino-terminal (o pro-

dominio) de las pro-NT se cree que es importante para el plegado apropiado y el *sorting* de las NT (Chao 2003)

Se han podido determinar las estructuras macromoleculares para cada una de las neurotrofinas (McDonald *et al.* 1991; Robinson *et al.* 1999; Ultsch *et al.* 1999 (Figura 2 y 3)), estableciéndose que cada subunidad de neurotrofina tiene un esqueleto que consiste en dos pares de cadenas beta antiparalelas, las cuales generan una forma elongada, y que son estabilizadas por tres puentes disulfuro.



Figura 2. Estructura NGF (fuente: Protein Data Bank)

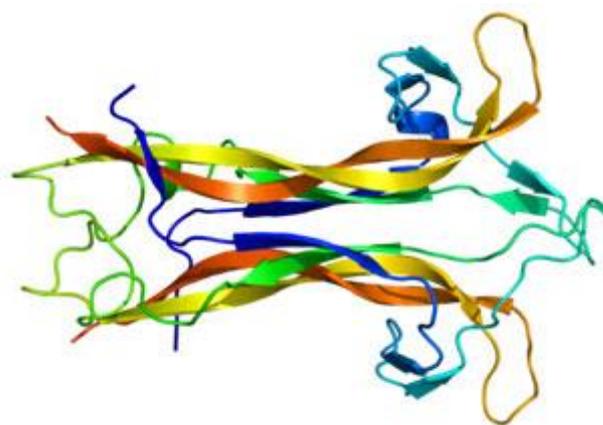


Figura 3. Estructura BDNF (fuente: WikiCommons)

La estructura ha sido descrita como un “nudo” de cisteína, habiéndose observado una organización similar en cuanto al plegado en otros factores de crecimiento, incluyendo a los miembros de la familia TGFbeta (*Transforming Growth Factor beta* o Factor de Crecimiento Transformante beta) y PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor* o Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas; McDonald y Chao 1995). Las interacciones altamente conservadas entre las interfaces de las diferentes neurotrofinas permiten la formación de los heterodímeros entre las diversas neurotrofinas *in vitro*, pero aun no hay demasiada evidencia que confirme la existencia de dichos heterodímeros *in vivo* para todos los miembros de la familia de NT (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5).

Todas estas neurotrofinas actúan como ligandos para cuatro receptores: p75NTR, TrkA, TrkB y TrkC. La función de estos complejos de receptores múltiples es compleja, ya que los mismos actúan de manera independiente, pero a su vez se ha observado que algunas neuronas expresan complejos de p75NTR y Trk que interactúan física y funcionalmente en modos que alteran las propiedades de señalización de cada ligando.

Tanto las pro-neurotrofinas como las neurotrofinas maduras pueden unirse y activar la señalización de p75NTR, mientras que los receptores Trk prefieren a las neurotrofinas maduras y son selectivos para algunas en particular. NGF se une y activa preferiblemente a TrkA, NT-3 se une y activa preferencialmente a TrkC, y BDNF y NT-4 se acoplan con TrkB y son funcionalmente redundantes en mamíferos, y dada esa redundancia en las aves, el gen para NT-4 se ha perdido aparentemente durante la evolución. De todas las neurotrofinas, NT-3 es la más promiscua, lo cual se ha observado al medir la activación de transcritos de TrkA que fueron generados por *splicing* alternativo y que fueron efectivamente activados por NT-3 (Clary y Reichardt 1994). Años más tarde, se pudo demostrar que esta neurotrofina influencia la señalización de TrkA de manera diferente (Harrington *et al.* 2011).

En cuanto a la localización de estos receptores, se ha observado que se expresan uno o más de los cuatro tipos en una gran variedad de neuronas y de glía del sistema nervioso central y periférico, así como también en una amplia diversidad de células no neuronales (Figura 4).

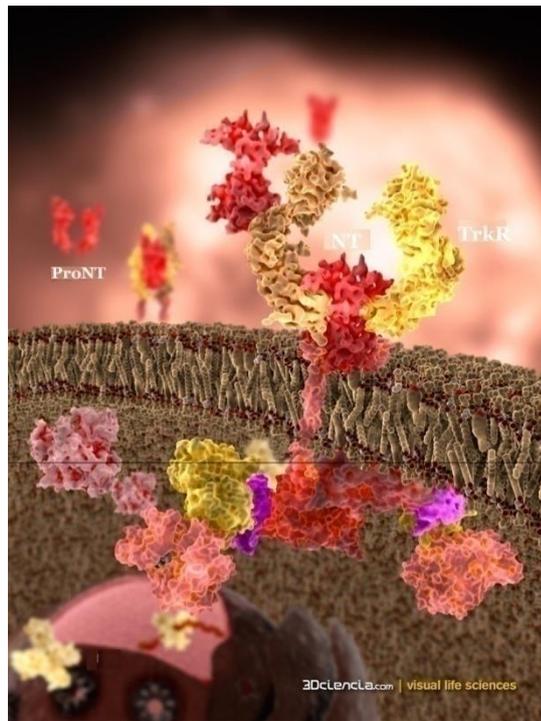


Figura 4. Imagen 3D de la inserción de los receptores Trk en la membrana plasmática luego de la interacción con la NT madura.

Procesamiento y secreción de las Neurotrofinas

Con respecto al procesamiento y secreción de las neurotrofinas, como muchos polipéptidos biológicamente activos que son secretados, su síntesis se lleva a cabo a nivel del retículo endoplásmico rugoso (RER), para finalmente ser empaquetadas dentro de vesículas secretorias como pro-neurotrofinas en el aparato de Golgi. Estas pro-neurotrofinas, las cuales tienen un largo promedio de entre 210 y 270 aminoácidos, son procesadas dentro de estas vesículas por proteasas de la familia de las pro-proteínas convertasas (Seidah *et al.* 1996), dando lugar a las neurotrofinas maduras, las cuales poseen un largo promedio de 120 residuos. En el caso del BDNF, el dominio clivado pro-dominio es almacenado y co-secretado con el BDNF maduro (Dieni *et al.* 2012), pero aun se desconoce si estos pro-dominios almacenados tienen alguna función biológica y si sus equivalentes en otras neurotrofinas también son secretados. En algunos casos, el procesamiento vesicular de las NT es incompleto, llevando a la secreción de pro-NT no procesadas, desde las cuales las NT maduras

pueden ser liberadas por plasmina y las metaloproteinasas de la matriz extracelular, dando lugar a la posterior secreción de las mismas.

La secreción de NT por las células neuronales y no neuronales es diferente desde varios frentes de análisis, los cuales no fueron inmediatamente apreciados por los investigadores. Primero, las neuronas (y las células neuroendócrinas) tienen distintos mecanismos regulatorios y secretorios, mientras que las células no neuronales tienen sólo un modo constitutivo. Por otro lado, mientras que en las células no neuronales el mecanismo de secreción de las cuatro NT es similar, en las neuronas este no es el caso, ya que NGF, NT-3 y NT-4 se transportan principalmente a través de la vía secretoria constitutiva en neuronas y células neuroendócrinas, mientras que el BDNF se moviliza selectivamente a través de la vía secretoria regulada (Farhadi *et al.* 2000; Griesbeck *et al.* 1999;). Esta distinción es particularmente importante en el contexto de las funciones del BDNF en aprendizaje y memoria, donde el control de la secreción de esta neurotrofina por la actividad neuronal es esencial. Además, como dijéramos anteriormente, la segunda distinción importante entre las neuronas y muchas células no neuronales es que las primeras son células altamente polarizadas.

Normalmente, las NT se secretan en el compartimiento somatodendrítico neuronal, ya que allí es el sitio en donde se producen las sinapsis entre las neuronas. Sin embargo, el BDNF sigue un patrón de secreción muy similar al de los neuropéptidos, siendo empacado en vesículas de núcleo denso (*dense-core vesicles* o DCV), las cuales son transportadas anterógradamente y secretadas en el terminal axonal. (Dieni *et al.* 2012).

Con respecto a la interacción NT/Receptor, las cuatro NT interactúan eficientemente con p75NTR, mientras que TrkA funciona primariamente como receptor para NGF, TrkB para BDNF y NT-4, y TrkC para NT-3 (Figura 5). La complejidad aumenta si se analiza la habilidad de NT-3 de interactuar débilmente con los receptores TrkA y TrkB, y por la capacidad del p75NTR para influenciar las interacciones NT/receptores Trk (Huang y Reichardt 2003). Las bases estructurales que gobiernan la selectividad de las interacciones NT/receptor han sido ampliamente estudiadas por

análisis de cristalografía de rayos X de los complejos que estos forman y por estudios mutagénicos de estructura/función.

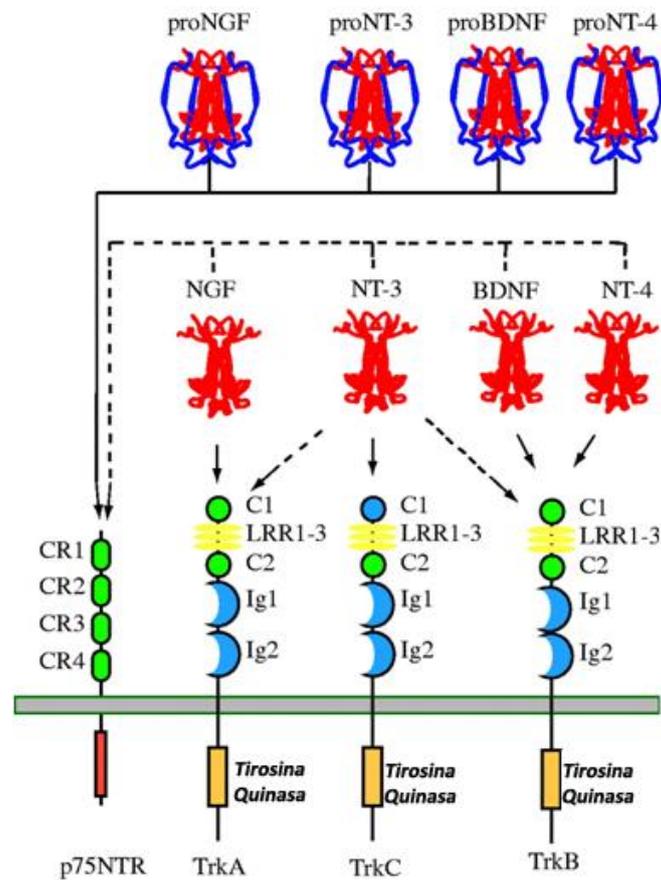


Figura 5. Se representa la interacción NT con su respectivo receptor. Tanto las pro-NT como las NT pueden interactuar con p75NTR, no así con los receptores Trk, los cuales lo hacen con las NT maduras.

Fuente de la Imagen: Reichardt L F Phil. Trans. R. Soc. B 2006; 361:1545-1564

En cuanto a la estructura de los receptores de NT, estos contienen una región extracelular, que en el caso de los receptores Trk se caracteriza por poseer dominios de repetición ricos en leucina y dos dominios tipo C2-Inmunoglobulinas (IgG), que representan la región de unión de las NT, aunque la región rica en repeticiones de leucina también contribuye, pero de menor manera, a la unión del ligando (Figura 5). Las interacciones de las NT con los receptores son mediadas por los residuos aminoacídicos que están altamente conservados entre las NT, mientras que el segundo grupo de interacciones esta mediado por residuos acídicos que no están conservados entre las NT. La superficie

formada (conocida como *conserved patch* o zona conservada) contribuye de manera importante a la afinidad en la unión del ligando, mientras que la superficie cercana al extremo (conocido como *specific patch* o zona específica), es la responsable de la selectividad en la unión de las NT a las isoformas Trk específicas. No se ha descrito aun una comparación similar y bien detallada de las NT y sus interacciones con el receptor p75, aunque sí se han reportado las respuestas obtenidas a esta interacción por medio de análisis de resolución de estructuras. Inicialmente parecía que era posible generalizar las acciones de las NT afirmando que las diferentes NT poseen un rango similar de funciones, si bien actúan sobre diferentes poblaciones celulares, dependiendo del tipo de receptor que se exprese. Esto se volvió consistente hasta cierto punto, ya que al avanzar en las investigaciones se demostró que los receptores para NT pueden mediar respuestas celulares muy diferentes e incluso hasta opuestas.

Aunque la función de las NT en el sistema nervioso periférico contribuye al soporte neurotrófico de varias poblaciones neuronales -lo que está en completo acuerdo con la hipótesis de las NT desarrollada originalmente por Víctor Hamburger y Rita Levi-Montalcini-, las NT también median un rango extraordinario de otras funciones. Por ejemplo, las NT pueden promover la supervivencia o la muerte celular en las neuronas, dependiendo de las circunstancias, el receptor empleado, o si están en presencia o no de las pro-NT o NT maduras. En algunos casos, las asociaciones NT/receptor promueven señales pro-supervivencia, mientras que en otras oportunidades estas asociaciones desencadenan una señalización constitutiva que culmina en señales pro-muerte (Bothwell 2014).

Mientras que en determinadas ocasiones la acción de las NT responde con precisión a la hipótesis original que predice que deben enviar señales tróficas desde el terminal axonal retrógradamente hacia el soma neuronal, en algunos casos, y particularmente para BDNF, las NT pueden ser transportadas anterógradamente hacia los axones y converger en señales hacia las células post sinápticas (Altar *et al.* 1997). Otras funciones de las NT, como el control de las ramificaciones

neuronales y de la función sináptica, difieren radicalmente del concepto original de la hipótesis de las NT.

Considerando la morfología particular que caracteriza a las neuronas, es importante comprender cómo la distribución de los receptores de NT es regulada tanto por la secreción como por el transporte intracelular, los cuales en los procesos distales estarían coordinados por la señalización de las NT en el cuerpo celular y en el compartimento axonal.

Se hace evidente que actúan coordinadamente la señalización por NT con el transporte vesicular para modificar el funcionamiento neuronal, porque la interrupción o alteración de los mecanismos de transporte vesicular conducen a la modificación de la señalización por NT, lo cual puede generar graves enfermedades en el sistema nervioso (Bronfman *et al.* 2007; Salinas *et al.* 2010).

Síntesis y secreción de las Neurotrofinas

Como se describiera más arriba, las neurotrofinas son proteínas homodiméricas sintetizadas como precursores (proNT) y que son secretadas hacia el espacio extracelular de manera constitutiva y regulada. Como muchas proteínas secretadas, después del clivaje del péptido señal en el RE, el homodímero transita a través del Golgi, donde está sujeto a glicosilación en su prodominio. El homodímero se acumula en vesículas del TGN, donde los prodominios son clivados y secretados. La eficiencia del clivaje varía de acuerdo al tipo de células neuronales.

La secreción postsináptica de las NT, particularmente de BDNF, ha sido muy bien documentada (Cohen-Cory *et al.* 2010; Lessmann *et al.* 2003). La evidencia ha demostrado que BDNF y NT-3 son secretados más eficientemente hacia los gránulos secretorios dendríticos en neuronas hipocampales en relación a NT-4 y NGF. Aunque la secreción de NT es más lenta que su liberación, la misma colocaliza con PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*), un marcador postsináptico de las sinapsis glutamatergicas. La secreción regulada de BDNF en las sinapsis glutamatergicas es altamente regulada, pero eso solo ocurre en las sinapsis activas. Para que este

fenómeno se lleve a cabo, debe haber una coordinación entre los mensajeros de BDNF a ser traducidos y la secreción de vesículas en las dendritas.

Se requieren estudios adicionales para clarificar los mecanismos moleculares que están involucrados en la focalización (*targeting*) dependiente de la actividad de los mRNA de BDNF específicos hacia las dendritas. Sin embargo, se ha propuesto que la síntesis local y secreción de BDNF en las sinapsis activas son llevados a cabo con la colaboración de motores moleculares, como es el caso de KIF-5, y que también depende de la síntesis en las membranas del RE y la posterior secreción desde los Golgi *outpost* localizados en las dendritas distales. De esa manera, el BDNF secretado postsinápticamente activaría a los receptores TrkB, resultando en una regulación autócrina de la potenciación sináptica, o en la potenciación presináptica de TrkB de los neurotransmisores liberados, regulando así la inervación de los blancos (Cohen-Cory *et al.* 2010; Horton y Ehlers 2003a).

Además, ha sido demostrado que la secreción regulada de BDNF puede ocurrir en el terminal pre-sináptico, para lo cual es necesario que las DCV derivadas del aparato de Golgi pasen por el sistema de transporte anterógrado de una manera dependiente de kinesinas hacia el terminal sináptico. La evidencia ha mostrado que BDNF y NT-3 atraviesan el transporte anterógrado y se acumulan en las DCV en un modo dependiente de las KIF1A (un miembro de la subfamilia de las kinesinas 3) (Lo *et al.* 2011), sugiriendo que el direccionamiento en el transporte anterógrado sería regulado en parte durante el *targeting* de BDNF-DCV hacia una subfamilia de kinesinas específicas. En el terminal presináptico, el BDNF es secretado en un modo dependiente de actividad similarmente a otros neuropéptidos, ejerciendo efectos postsinápticos que regulan el desarrollo y mantenimiento de las redes neuronales (Altar y DiStefano 1998; Lessmann *et al.* 2003; Matsumoto *et al.* 2008) (Figura 6). Tanto la secreción de BDNF como el transporte anterógrado de los receptores Trk son temáticas que requieren de mayor investigación.

En las neuronas hipocampales, las vesículas TrkB positivas son co-transportadas durante el transporte anterógrado con VAMP2, una proteína asociada a vesículas sinápticas, indicando así el destino final de estos receptores en el terminal presináptico (Gomes *et al.* 2006).

Este transporte anterógrado de TrkB es específicamente mediado por la kinesina convencional 1 y el complejo CRMP/Slp1/Rab27a (Arimura *et al.* 2009). La proteína CRMP2 se asocia con la kinesina para unirse a los microtúbulos, y a través de la acción de la pequeña proteína G Rab27a y del efector Slp1, el cual se une a la cola citosólica de TrkB, Rab27a y CRMP2 conectan a TrkB al transporte anterógrado (Figura 6). De esta manera, las vías de señalización cascada arriba que resultan en la regulación de la actividad de CRMP2 aumentan el transporte de TrkB hacia el terminal presináptico. Rab27a ha sido involucrada en la regulación de la secreción de los gránulos que derivan del TGN en muchos modelos celulares, y podría jugar un rol importante en el direccionamiento e inserción del TrkB derivado del TGN en el terminal presináptico (Fukuda 2008). Otra GTPasa monomérica de la familia Rab involucrada en el transporte anterógrado de los Trk es Rab11, que regula la dinámica de los endosomas de reciclado en numerosos tipos celulares.

En neuronas simpáticas, después de la endocitosis de TrkA, Rab11 regula la transcitosis y el transporte anterógrado de este receptor hacia el cono de crecimiento del sistema nervioso simpático, donde se aumenta la sensibilidad a NGF (Ascaño *et al.* 2009). El transporte vesicular de Rab11 está asociado a la kinesina 2 a través de la interacción con el efector FIP5 (Schonteich *et al.* 2008). Aunque no se ha demostrado que este complejo regule la transcitosis dependiente de Rab11, es probable que diferentes motores moleculares y complejos asociados regulen el transporte anterógrado de vesículas con Trk desde el TGN hacia el terminal presináptico.

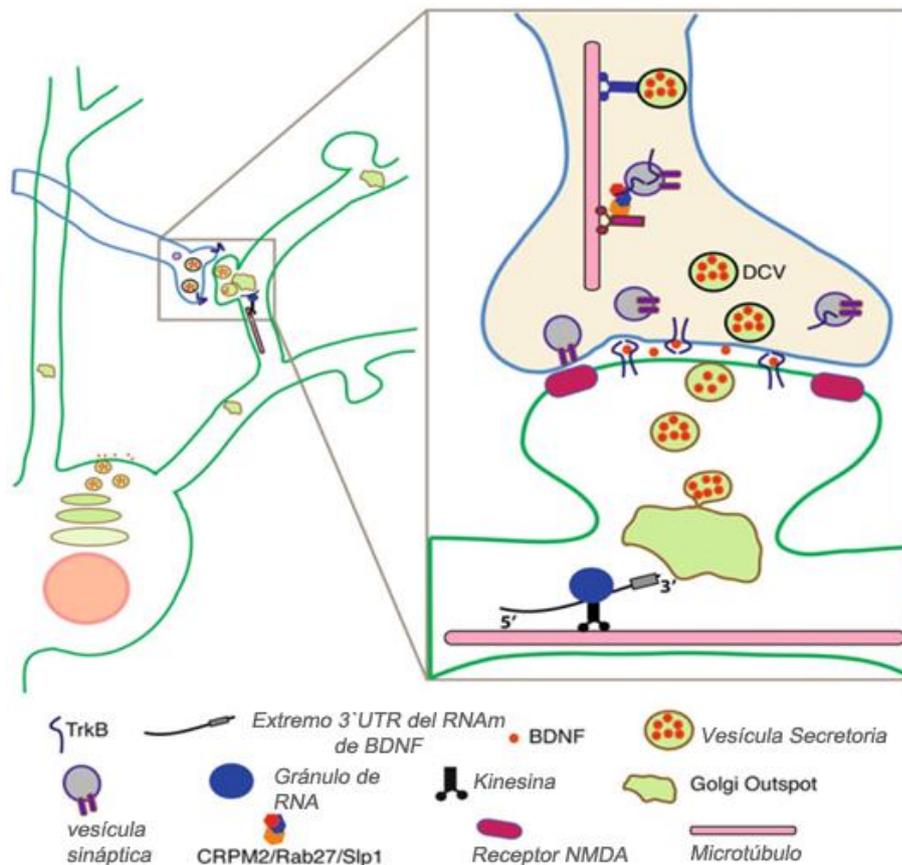


Figura 6. Diagrama esquemático de las sinapsis glutamatérgicas en el SNC. En el terminal presináptico, delineado en azul, se ilustra cómo las vesículas de núcleo denso (DCV = *dense-core vesicles*) y los precursores de vesículas sinápticas son transportados hacia el terminal por diferentes motores moleculares de la familia KIF. Las DCV son cargadas con BDNF y se fusionan con la membrana plasmática en respuesta al aumento en la concentración de calcio. El transporte anterógrado de los precursores de vesículas sinápticas que llevan los receptores TrkB es regulado por la GTPasa monomérica Rab27. Existe una coordinación entre la traducción y la secreción de BDNF en las neuronas postsinápticas (delineada en verde). El mRNA para BDNF también es transportado a lo largo de las espines dendríticas por miembros de la familia KIF. Los receptores TrkB se encuentran localizados tanto en las membranas pre- como en las post-sinápticas.

Internalización y transporte retrógrado de las Neurotrofinas

En cuanto a la internalización y transporte retrógrado de las neurotrofinas, debemos tomar en cuenta que una vez que estas se unen a su receptor, el cual puede estar localizado a lo largo del axón, en el cuerpo celular neuronal o en las sinapsis (pre- o post-sinápticas), el complejo NT/receptor

rápidamente activa las cascadas de señalización en la membrana plasmática que llevan a la internalización del mismo. Por algún tiempo, la endocitosis del complejo NT/receptor fue considerada como un mecanismo que solamente estaba involucrado en la desregulación de la transducción de la señal. Sin embargo, se ha establecido recientemente que la internalización y el tráfico post-endocítico de los receptores es esencial para la señalización y funcionamiento neuronal. Luego de la internalización, estos receptores continúan señalizando desde los endosomas, donde se asocian con diferentes adaptadores de la señalización. Adicionalmente, la eficiencia de la endocitosis y reciclado de los receptores de regreso a la membrana plasmática es un mecanismo que regula la disponibilidad del receptor para el comienzo de la señalización. Finalmente, la eficiencia de la degradación del complejo ligando/receptor en la vía endocítica tardía determina la duración de la señalización dentro de la célula, teniendo a su vez un impacto importante en la función celular (Bronfman *et al.* 2007 Miaczynska *et al.* 2004 Platta y Stenmark 2011).

La internalización y tráfico intracelular de los receptores Trk sucede cuando los receptores activados son internalizados en la membrana en rutas dependientes o independientes de clatrina. Las rutas independientes de clatrina incluyen al menos ocho mecanismos diferentes, incluyendo la endocitosis de tipo caveolar, la macropinocitosis, la endocitosis dependiente de Arf6, las vías independientes de clatrina y las dependientes de colesterol.

Todas las vías dependientes de clatrina o independientes de la misma convergen en los endosomas tempranos (denominados también endosomas de *sorting*). Desde allí, algunos de los componentes son rápidamente reciclados a través de los endosomas de reciclado (o endosomas pericentriolares), mientras que el resto de los receptores son distribuidos hacia los endosomas tardíos y lisosomas, donde las proteínas son degradadas.

La dinámica del tráfico intracelular, incluido dentro del sistema endolisosomal, está coordinado por las Rab GTPasas, las cuales son miembros de una amplia familia de GTPasas que controlan la identidad de membrana y la fisión, corte, movilidad y fusión vesicular a través del reclutamiento de las diferentes y diversas proteínas efectoras. Por ejemplo, Rab5 es un regulador

clave del tráfico endosomal temprano; Rab11 y Rab4 regulan el transporte a través de la vía de reciclaje; y Rab7 regula el tránsito desde los endosomas tempranos hacia los endosomas tardíos y desde los endosomas tardíos hacia los lisosomas.

Dos rutas principales en la internalización de Trk han sido sugeridas en la literatura: una es dependiente de clatrina y dinamina, y la otra involucra los procesos macropinocíticos que dependen de una chaperona denominada Pincher, de Rac y de actina, pero independiente de dinamina.

La dinamina es una GTPasa que provoca el corte y escisión de las vesículas desde la membrana plasmática, y Rac es una pequeña GTPasa que pertenece a la familia de las Rho y que regula la dinámica del citoesqueleto de actina. Por otro lado, es sabido que la internalización de TrkA y TrkB es inhibida por la monodansilcadaverina, una droga que inhibe la internalización mediada por clatrina.

Se ha reportado en la bibliografía que las vesículas de clatrina tienen un rol importante en la internalización de TrkA, ya que mutantes de TrkA con la región del dominio carboxilo terminal truncada disminuyen la tasa de internalización y también la del ligando específico NGF. (Doherty y MacMahon 2009).

Aunque los Trks luego de la estimulación del ligando se han encontrado en dominios del tipo caveola y *lipid rafts* (dominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos), no hay evidencia que los Trks sean internalizados a través de un mecanismo independiente de clatrina o dependiente de colesterol.

Sin embargo, en contraste a lo que se observa con los receptores de factores de crecimiento epidermal (EGFR), los Trks exhiben una localización aumentada en los *lipid rafts* en las neuronas corticales e hipocámpales, lo cual es necesario para la modulación sináptica, requiriendo también de la fosforilación e internalización del receptor TrkB, lo que sugeriría una asociación con los *lipid rafts* que ocurre intracelularmente en las membranas (Assaife-Lopes *et al.* 2010). Por lo tanto, podría decirse que en general la vía más importante para la internalización de los receptores tirosina quinasa es la mediada por clatrina.

Aunque TrkA y los EGFR son dirigidos ambos hacia la vía degradativa, EGFR es orientado más eficientemente hacia la vía lisosomal, mientras que el receptor TrkA continúa señalando en los endosomas Rab5 positivos por un período más largo de tiempo.

En relación a las Rabs, se ha observado que la sobreexpresión de una forma dominante negativa de Rab7 induce la acumulación endosomal de TrkA y potencia la fosforilación de los ERK1/2 y el crecimiento neuronal (Liu *et al.* 2007; Saxena *et al.* 2005).

Al resaltar el rol funcional de la vía de reciclado en las neuronas hipocampales, se ha encontrado que el reciclaje de TrkB en las dendritas es mayormente mediado por Rab11, una GTPasa que regula el reciclaje del receptor hacia la membrana plasmática, y que la inhibición de su actividad reduce el direccionamiento de TrkB hacia las dendritas. Adicionalmente, se ha observado que la activación de TrkB aumenta la actividad de Rab11 y cambia la dinámica de esta pequeña GTPasa en las dendritas. Este es uno de los ejemplos que demuestran la regulación de TrkB mediada por Rab11, la cual es necesaria para la plasticidad estructural inducida por BDNF. (Lazo *et al.* 2013). Estas observaciones a su vez afianzan la idea de que el tráfico post endocítico del receptor TrkB es necesario para la señalización, y que la inhibición de la internalización de este receptor reduce la actividad de PI3K/Akt y el crecimiento neuronal en las neuronas hipocampales (Huang *et al.* 2009).

Transporte Anterógrado de las Neurotrofinas

En cuanto a la señalización anterógrada y el desarrollo de conexiones apropiadas, existen diferentes mecanismos que han sido desarrollados por las neuronas sensitivas para aumentar la sensibilidad hacia NGF una vez que se ha dado el transporte retrógrado mediado por NGF-TrkA.

La señalización inducida por el complejo ligando/receptor induce la transcitosis de las células. La transcitosis de TrkA hacia los axones resulta en un aumento en la sensibilidad hacia NGF. Adicionalmente, las respuestas mediadas por NGF-TrkA aumentan la expresión de TrkA y p75NTR, mientras que p75 aumenta la especificidad de TrkA para unirse a las neurotrofinas, de tal manera que

en la presencia de p75, NT3 ya no se une a TrkA. Otro efecto del NGF sobre la señalización retrograda es la expresión aumentada de BDNF y NT4, que a través del receptor p75 activan la muerte celular en las neuronas próximas asociadas con bajos niveles de señalización del complejo NGF-TrkA. (Ascaño *et. al* 2009).

Asimismo, hay al menos tres *loops* positivos que se retroalimentan, aumentando la sensibilidad al NGF en neuronas simpáticas, que se transforman en “ganadoras” en la competencia por la supervivencia.

Una pregunta que han generado todas estas observaciones es por qué la activación de TrkA por NT3 solo induce crecimiento axonal local, mientras que el NGF induce la internalización de TrkA y la señalización retrógrada.

El grupo de Ginty y colaboradores (Kuruville *et al.* 2004) ha propuesto recientemente una respuesta a esta pregunta, proponiendo dos explicaciones diferentes pero no mutuamente excluyentes: NGF, pero no NT3, promueve la endocitosis de TrkA a través de la desfosforilación mediada por calcineurina de la GTPasa dinamina-1. La capacidad de NGF de inducir una desfosforilación específica de la dinamina-1 conduce a un aumento de la internalización de TrkA y al mismo tiempo del transporte retrógrado asociado con la señalización de supervivencia, mientras que la interacción de NT3 con TrkA no tiene el mismo efecto.

Consistentemente, la delección condicionada de calcineurina en las neuronas simpáticas no permite la invasión dependiente de NGF de los blancos de tejido periféricos. Por otro lado, NGF, pero no NT3, es capaz de activar en los endosomas a los reguladores de actina Rac1-GTP-cofilina, permitiendo la señalización endosomal de NGF/TrkA para “escapar” de la red de actina durante el transporte retrógrado (Harrington *et al.* 2011).

Un concepto interesante que ha emergido a partir de las observaciones del grupo de Ginty y Segal (Ginty y Segal 2002) con respecto a la regulación del número de células neuronales que sobrevive. Según estos autores, la señalización de neurotrofinas a larga distancia puede regular el grado de conectividad dentro de las neuronas simpáticas preganglionares localizadas en el sistema

nervioso central. En las neuronas simpáticas, los endosomas que señalizan a través del complejo NGF-TrkA viajan desde los axones distales hacia los cuerpos celulares de las dendritas, donde promueven la formación de la densidad post sináptica (PSD). La presencia de p75 restringe la formación de las PSD, sugiriendo un rol importante para el antagonismo que existe entre NGF-TrkA y las vías de señalización de p75 durante el control retrógrado del establecimiento sináptico. Un modelo similar ha sido sugerido para las neuronas sensoriales, en el cual las señales retrógradas de BDNF y NGF inducen la activación de ERK5 de manera que se aumenta la supervivencia, lo cual es crítico para la morfología sináptica y la regulación del número de sinapsis.

En conclusión, la conectividad apropiada del sistema nervioso es alcanzada por la transducción de señales coordinada con los procesos intracelulares, como la secreción, endocitosis, y el transporte mediante motores moleculares, junto con la traducción local de mRNA localizado en los procesos distales neuronales. Para comprender los mecanismos moleculares que regulan estos eventos a través de moléculas extracelulares (por ejemplo, neurotrofinas) sería útil comprender de manera detallada cómo funciona el sistema nervioso e indagar con mayor profundidad cómo la perturbación del tráfico intracelular puede llevar a enfermedades neurodegenerativas.

En cuanto a la regulación por transcripción, traducción y demás modificaciones post-traduccionales de los factores de crecimiento en estudio, el NGF se expresa tanto en células neuronales como en células no neuronales de los sistemas nervioso periférico y central. NGF se expresa en los tejidos blancos de las neuronas que expresan TrkA, las cuales incluyen las neuronas de la raíz del ganglio dorsal (DRG), las neuronas sensoriales craneales que median el dolor y la temperatura, las neuronas simpáticas, las neuronas colinérgicas de la corteza basal, las neuronas colinérgicas estriatales y ciertas neuronas talámicas y del tronco encefálico. Las neuronas hipocámpicas y corticales que son blancos de las inervaciones colinérgicas expresan los niveles más altos de mRNA de NGF en el cerebro (Rocamora *et al.* 1996) e interesantemente, la mayoría de estas neuronas NGF positivas son interneuronas GABAérgicas.

En el caso de BDNF, éste tiene un patrón de expresión muy amplio que está conservado dentro

de las especies de mamíferos. Durante el desarrollo, la expresión de BDNF es más abundante en el sistema nervioso comparado con otros tejidos, y sus niveles se ven aumentados en el cerebro postnatal. En el sistema nervioso adulto, el BDNF tiene un patrón de distribución amplio, con los niveles más altos de mRNA y proteína en el hipocampo, amígdala, corteza cerebral, hipotálamo y septum en el cerebro, y en la raíz del ganglio dorsal en el sistema nervioso periférico. La expresión del mRNA de BDNF está mayormente confinada a las neuronas y hay solo algunas áreas donde los transcriptos de BDNF no son detectados. La expresión de BDNF en los tejidos adultos está también presente fuera del sistema nervioso. Estos mensajeros se han encontrado en menores niveles en el timo, hígado, bazo, corazón y músculo. Además, la señalización de Trk también ha sido reconocida dentro de la vasculatura (Kermani y Hempstead 2007).

Receptores Trk y desarrollo

Los receptores tirosina quinasas relacionados a tropomisina (Trk) fueron inicialmente descritos como una familia de factores de crecimiento requeridos para la supervivencia neuronal. Desde ese momento se conocen por influenciar muchos aspectos del desarrollo neuronal y la función -incluyendo diferenciación-, crecimiento y plasticidad sináptica.

Los programas de muerte celular que ocurren durante la formación del sistema nervioso vertebrado, determina el correcto número neuronal y la inervación apropiada hacia el tejido blanco y asegura el correcto desarrollo del sistema nervioso. La hipótesis de las neurotrofinas propone que durante el desarrollo las neuronas se aproximan al mismo blanco final, compitiendo por las neurotrofinas apropiadas, lo cual resulta en el correcto desarrollo neuronal (Levi-Montalcini 1987).

Esta hipótesis implica que la eficacia de la supervivencia neuronal depende no solo de la cantidad de factores tróficos producidos, sino también de la expresión específica de los receptores en las diferentes poblaciones celulares que confieren la responsividad neuronal.

Dentro del sistema nervioso periférico, las neurotrofinas y sus receptores Trk encajan bien

dentro de la hipótesis de las neurotrofinas, como así también muchas subpoblaciones neuronales periféricas que exhiben una dependencia predominante de las neurotrofinas específicas durante el período de la muerte celular que ocurre naturalmente. Sin embargo, en el sistema nervioso central, la expresión de múltiples receptores de neurotrofinas y sus ligandos específicos permite la creación de diversas conexiones, lo cual se extiende hasta la adultez. Sin embargo, las actividades de la señalización de neurotrofinas-Trk se prolongan bien dentro de la supervivencia neuronal, e incluye el mecanismo molecular en el que subyacen el crecimiento neuronal y la arborización, así como también el fortalecimiento de la transmisión sináptica.

En cuanto a la expresión pre y postnatal de BDNF y TrkB, en el trabajo de Ivanova y Beyer en 2001 se demostró que los niveles de BDNF aumentan gradualmente hasta el día 15 postnatal, mientras que la expresión de TrkB se mantiene estable durante todo el desarrollo. Tanto las neuronas hipocámpales como los astrocitos son productores y a la vez blanco de la acción de BDNF y TrkB.

Estructura de los receptores para las neurotrofinas

La familia de receptores Trk comprende a receptores transmembrana tipo I de simple paso. Sus dominios extracelulares están altamente glicosilados y cada uno contiene tres repeticiones ricas en leucinas, flanqueadas por dos repeticiones de cisteínas y dos dominios inmunoglobulinas-C2 (Ig) próximos a la región transmembrana. Intracelularmente, los receptores Trk poseen un dominio tirosina quinasa. Los Trk interactúan con sus ligandos usando el segundo dominio Ig, y la expresión del receptor confiere la responsividad a la célula (Figura 7).

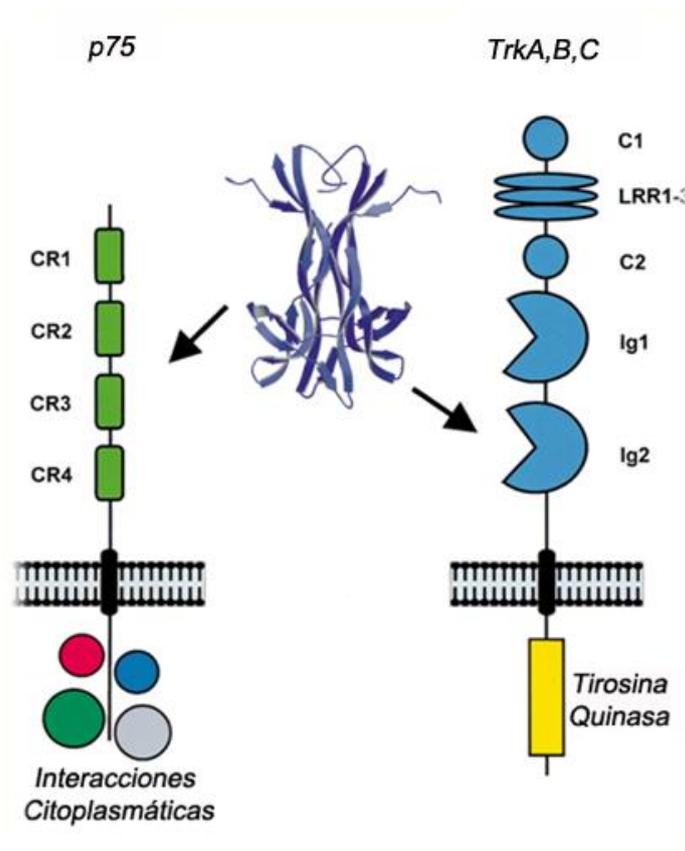


Figura 7. Dominios de los receptores de neurotrofinas p75NTR y Trk.

El *splicing* alternativo de los mRNA de los Trk resulta en la generación de las isoformas de Trk con diferentes dominios extracelulares, los cuales afectan la unión de los ligandos. (Wiesmann *et al.* 1999). Por ejemplo, un inserto corto en la región yuxtamembrana de TrkA aumenta la afinidad por NT-3 sin afectar la unión con el NGF. En el caso de TrkB, la presencia de un inserto similar permite la activación a través de NT-3 y NT-4, mientras que la ausencia de este inserto confiere la especificidad para el BDNF.

La unión de ligandos hacia los receptores Trk completos resulta en la dimerización del receptor y la subsecuente activación en trans del mismo. Los tres residuos de tirosina se encuentran dentro del *loop* autoregulatorio del dominio quinasa de los Trk, y la fosforilación en trans de estos sitios es responsable de la activación de las quinasas que se encuentran cascada abajo de las vías de señalización involucradas.

En cuanto a los ligandos de los receptores Trk, y como se señalara más arriba, estos son NGF,

BDNF, NT-3 y NT-4, los cuales se unen selectivamente y con afinidades del 10^{-9} a 10^{-10} a sus receptores Trk específicos, TrkA, TrkB y TrkC. (Figura 8)

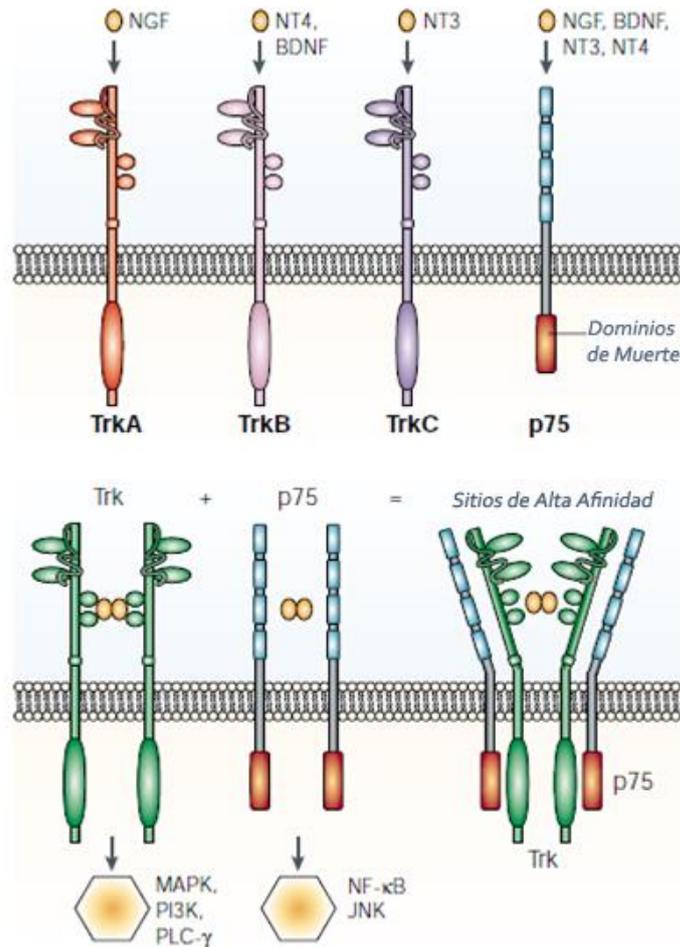


Figura 8. Modelo de las activaciones de los receptores Trk y p75. La unión de las NT resulta en la dimerización de cada receptor. Las NT se unen específicamente a cada receptor Trk, mientras que todas se unen a p75. Los receptores Trk contiene los dominios IgG para la unión del ligando y el dominio catalítico tirosina quinasa en la región intracelular. Cada receptor activa múltiples vías de transducción de señales. La porción extracelular de p75 contiene 4 repeticiones ricas en cisteína, y la porción intracelular contiene el dominio de muerte. La unión de las NT a p75 media la supervivencia, migración celular y mielinización a través de numerosas vías de señalización. Las interacciones entre los receptores Trk y p75 pueden llevar a cambios en la afinidad de unión a la NT.

Señalización de los Receptores Trk

Las vías de señalización activadas por los Trk impactan en muchas funciones neuronales, incluyendo la supervivencia celular y diferenciación, el crecimiento axonal y dendrítico y la arborización, formación de sinapsis y la plasticidad sináptica. Mucho de lo que se conoce en señalización fue inicialmente realizado en células de adrenofeocromocitoma de rata PC12, las cuales expresan TrkA y p75 y son usadas como una línea celular modelo para las neuronas simpáticas. Sin embargo, estas células difieren de las neuronas primarias en muchos aspectos, como la falta de especificación axonal y dendrítica y un ciclo celular continuado. Sin embargo, muchos estudios de investigación en señalización de neurotrofinas se han enfocado en NGF y TrkA.

Estos resultados han sido extrapolados hacia la señalización de TrkB y TrkC. Sin embargo, mas recientemente se ha estudiado la señalización de los Trk en una gran variedad de neuronas primarias, así como también fuera del sistema nervioso, y se ha vuelto evidente que mientras algunas vías son compartidas entre los receptores, otras son activadas en una manera Trk o tipo celular específica.

Los mecanismos de señalización de Trk involucran la fosforilación de tirosinas intracelulares específicas luego de la activación del sitio de unión a neurotrofinas que se encuentra en la porción extracelular. Estos sitios de tirosinas fosforiladas median la señalización a través de la creación de sitios de unión para las proteínas efectoras que inician la activación de las vías de señalización intracelular. Los residuos tirosina Y490 e Y785 en los receptores TrkA humanos, y sus residuos correspondientes en TrkB y TrkC, sirven como principales sitios de anclaje para iniciar la señalización cascada abajo, como la vía de señalización en la que participan la proteína adaptadora Shc, la quinasa regulada por la señal extracelular (*Extracellular signal-Regulated Kinase* o ERK) o la fosfolipasa C γ (PLC γ). Los residuos Y670, Y674 e Y675 se localizan dentro del dominio tirosina quinasa y pueden también reclutar proteínas después de la fosforilación, incluyendo a las proteínas adaptadoras Grb2 y SHP2.

La fosforilación de Trk en la porción C-terminal tirosina Y785 lleva al reclutamiento y activación de PLC γ , la cual hidroliza al fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) a diacilglicerol e inositol trifosfato (IP₃). IP₃ lleva a la liberación del Ca²⁺ intracelular, el cual a su vez activa las enzimas dependientes de Ca²⁺ como las quinasas reguladas por Ca²⁺-calmodulina (Ca²⁺/*calmodulin-dependent protein kinase* o CAMK) y la fosfatasa Calcineurina. Además, la liberación de Ca²⁺ y la producción de DAG activa a las PKC, las cuales estimulan la vía de señalización de las ERKs vía Raf, así como también ciertos canales proteicos que contribuyen al aumento de Ca²⁺ inducido por BDNF en los conos de crecimiento y en las sinapsis (Chuang *et al.* 2001). Otras actividades que son afectadas incluyen la formación del complejo TrkB-PSD95 en las sinapsis que responden a la transcripción mediada por la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (*cAMP response element-binding protein* o CREB). La señalización en la que interviene PLC γ en respuesta a las neurotrofinas NGF y BDNF, ha sido implicada en la quimioatracción de los conos de crecimiento axonales y en la actividad prolongada en respuesta al NGF, cuya transcripción es inducida por los pulsos que provienen de los canales de sodio.

La fosforilación de Trk en el residuo tirosina Y490 próximo al dominio transmembrana en TrkA y en Y515 en TrkB, crea el sitio de unión a Shc. Este a su vez lleva a la activación de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) vía Grb2 y Gab1 y a la fosforilación de los fosfolípidos de inositol en la posición 30, resultando en un cambio de la membrana plasmática local. Luego de eso, Akt transloca hacia la membrana plasmática y se activa, incrementando la traducción de proteínas a través de rapamicina (*mammalian target of rapamycin* o mTOR), la quinasa p70S6 y la vía del represor de traducción de ARNm 4E-BP1, aumentando el crecimiento axonal a través de la fosforilación y activación de GSK-3 β .

Con respecto a las ERKs, luego de la creación del sitio de unión Y490 se inicia la vía de señalización cascada debajo de Ras-ERK. Esta conduce a un crecimiento axonal local, así como también a la activación de la vía mediada por CREB y los eventos transcripcionales. (Figura 9)

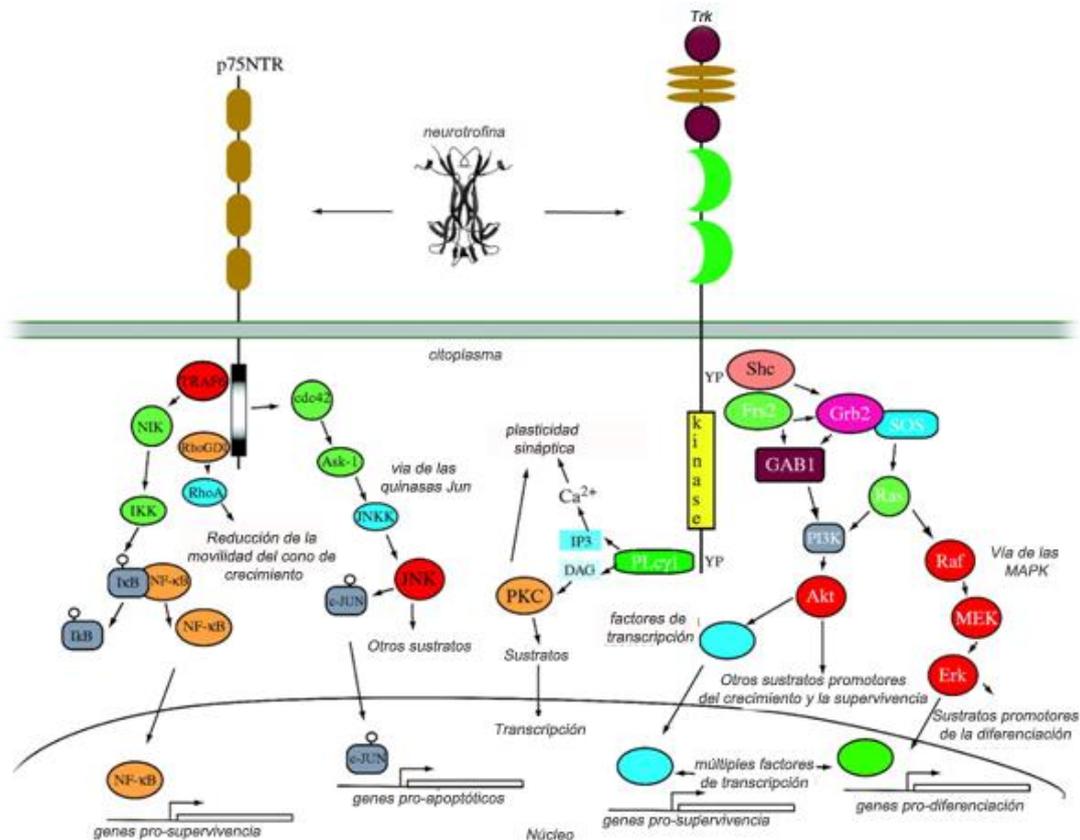


Figura 9. Señalización de las neurotrofinas y sus receptores (tomada de Reichardt 2006), en donde se puede observar el amplio espectro de funciones que son desencadenadas a través de la señalización de los complejos NT- p75NTR/Trk en el Sistema Nervioso.

Alternativas a la unión del ligando: transactivación de los receptores Trk

Además de la activación por medio de las neurotrofinas, los receptores Trk son similares a los EGF, ya que pueden transactivarse intracelularmente utilizando vías dependientes de neurotrofinas alternativas. La capacidad de transactivarse de los Trk fue demostrada por los polipéptidos activadores de adenosina y de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP), los cuales señalizan a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), un mecanismo que requiere la familia de quinasas Src (SFK) y el calcio intracelular (Lee *et al.* 2002).

En contraste a la activación directa mediada por neurotrofinas, la transactivación es un proceso relativamente lento que ocurre dentro de horas y no de minutos como la primera, y que ocurriría en

las membranas intracelulares, primariamente en el Golgi (Rajagopal *et al.* 2004).

La transactivación de los receptores no está restringida a los paradigmas *in vitro*, como sugieren los estudios recientes que demuestran que este mecanismo puede ocurrir también en neuronas corticales como respuesta al EGF (Puehringer *et al.* 2013). A su vez, ambos glucocorticoides (Jeanneteau *et al.* 2008) y zinc (Huang *et al.* 2008) son capaces de transactivar a los receptores Trk *in vivo*. Además, la transactivación mediada por TrkB afecta la transmisión sináptica a través de la modulación del LTP en las fibras musgosas (*mossy fibers*).

En cuanto al tráfico de membrana, una vez activados, los receptores Trk son endocitados como complejos ligando/receptor vía endocitosis mediada por clatrina (Zheng *et al.* 2008). Estos receptores continúan actuando tanto localmente como durante su transporte a lo largo de grandes distancias, llevando las señales a diferentes partes de las células. Eventualmente, los receptores endocitados pueden ser degradados o reciclados de regreso a la membrana plasmática.

Con respecto al reciclado del receptor y la degradación seguidos de la estimulación e internalización, es claro que todos estos procesos determinan la respuesta de la célula al ligando. Luego del *sorting* post-endocítico, los Trks controlan la fuerza y duración de la señalización del receptor intracelular. En general, los receptores Trk pueden atravesar reciclado o degradación o bien ingresar en el transporte retrogrado axonal para llevar señales tróficas a lo largo de grandes distancias. Sin embargo, existen diferencias entre los receptores Trk individuales en cuanto a que divergen las respuestas biológicas de los complejos NGF-TrkA si se las compara con las de BDNF-TrkB.

Efectos de la señalización Trk en el Sistema Nervioso Central

Los receptores Trk individuales son expresados en diferentes tipos de neuronas. Por ejemplo, TrkB se expresa predominantemente dentro del sistema nervioso central, mientras que ambos TrkA y TrkC son encontrados abundantemente en las poblaciones de las neuronas periféricas. Los análisis con ratones *knock-out* (KO) revelaron una sobreposición limitada entre los fenotipos de los ratones

Trk deficientes para los diferentes receptores (Snider 1994). Por ejemplo, los animales TrkA *null* tuvieron una función motora normal, pero desplegaron neuropatías severas sensoriales y simpáticas, muriendo dentro del primer mes de vida. Esto estuvo acompañado por una pérdida profunda de las neuronas de los ganglios superior cervical, de raíz dorsal y trigeminales, aunque estos ratones TrkA *null* tuvieron defectos limitados en el sistema nervioso central. (Smeyne *et al.* 1994).

Los animales TrkC *null* fueron más grandes al momento de nacer, pero luego presentaron defectos para desarrollarse y murieron a las tres semanas de edad. Durante el desarrollo postnatal, estos animales desarrollaron posturas y movimientos anormales, pero pudieron sentir el dolor, sugiriendo que la propiocepción estaría especialmente afectada. En estos ratones, las neuronas motoras aferentes eran menores en número, y una población de neuronas de la raíz del ganglio dorsal se encontraba ausente, mientras que el sistema nervioso central aparentaba ser normal (Klein *et al.* 1994).

En contraste, los animales deficientes para TrkB fallaron en su capacidad de alimentarse, muriendo unas horas después de su nacimiento. Estos animales carecieron de poblaciones de neuronas motoras así como también de neuronas de la raíz del ganglio dorsal y trigeminal. A pesar de la amplia expresión de TrkB a través del sistema nervioso central, no se observó pérdida neuronal profunda dentro del cerebro de los animales TrkB *null* e incluso aun en los cerebros de ratones doble KO para TrkB y TrkC. Estos hallazgos resaltan el efecto profundo de la diferencia entre las neuronas periféricas y centrales con respecto a la dependencia de los factores tróficos para la supervivencia.

La expresión de los receptores Trk no está solo restringida al sistema nervioso, observándose en estos animales *null* para Trk defectos severos en, por ejemplo, cardiovascular (Kermani y Hempstead 2007). TrkB se encuentra expresado en las células cardíacas endoteliales, por lo que los animales TrkB *null* mostraron un aumento en la apoptosis de estas células y una disminución de los vasos sanguíneos intramiocárdiales (Wagner *et al.* 2005). La expresión de TrkC se encontró en los cardiomiocitos en desarrollo, y consecuentemente los animales TrkC *null* mostraron deficiencias cardíacas severas en el septum ventricular y atrial, así como también a nivel de las válvulas. El rol

potencial de TrkA en el desarrollo cardíaco y vascular es un área aun poco estudiada. Sin embargo, al restablecer la expresión de TrkA en el sistema nervioso de los animales *null* para este receptor, los animales resultaron ser viables y mayormente normales, con defectos inmunes menores (Coppola *et al.* 2004).

Supervivencia neuronal

Los receptores Trk median la supervivencia de poblaciones específicas neuronales, y su ausencia resulta en una pérdida definida de células. Profundizando un poco más en el mecanismo molecular que se ha descrito para la señalización de NGF-TrkA en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG), los receptores Trk son activados por neurotrofinas derivadas de tejidos blanco y que atraviesan por transporte retrogrado desde el axón hacia el soma neuronal, el cual inicia la activación de la cascada de señalización PI3K-Akt y la activación de CREB, resultando en la supervivencia celular.

Dentro del mismo sistema, NT-3 -el cual es a su vez activado por TrkA- no puede ser sustituido por NGF para sostener la supervivencia desde el axón distal (Kuruvilla *et al.*2004), sugiriendo que no siempre la activación de los receptores Trk es similar.

Un estudio reciente realizado por el grupo de Nikolettou *et al.* 2010 sugirió que TrkA y TrkC, pero no TrkB, sean llamados receptores dependientes, porque *in vivo* e *in vitro* requieren una activación dependiente de ligando para promover la supervivencia neuronal, pero también pueden activar la muerte celular en ausencia de suficiente ligando. Estas observaciones pueden explicar en parte por qué las neuronas del sistema nervioso central, la cuales expresan mayormente TrkB, son menos sensibles a la apoptosis en ausencia de neurotrofinas.

Efectos morfológicos

Además de promover la supervivencia neuronal, la señalización de las NT-Trk aumenta el crecimiento neuronal y la arborización en un amplio rango de subtipos neuronales. A su vez, el complejo NGF-TrkA fue inicialmente descrito como un factor soluble que promueve el crecimiento axonal desde los explantos de embrión de pollo (Levi-Montalcini 1987a). Dentro del sistema nervioso, donde las neuronas no son dependientes de la señalización NT-Trk para su supervivencia, el aumento del crecimiento neuronal y la fortaleza sináptica parecen las primeras funciones de la señalización con los Trk.

Se ha demostrado que al interferir con la señalización de BDNF-TrkB se producen defectos en el crecimiento axonal y dendrítico y en la arborización en muchos modelos animales desde los sapos hasta los ratones (Chen *et al.* 2006 y Hu *et al.* 2005). Los mecanismos moleculares que llevan al crecimiento neurítico dependiente de Trk y a la ramificación incluyen la señalización vía las proteínas de anclaje ARMS/Kiddins220 (Wu *et al.* 2009), la ubiquitinación y la desregulación del activador de RhoA (Lin *et al.* 2011) y la inducción de la fosfatasa de MAPK para regular la dinámica microtubular (Jeanneteau *et al.* 2010). Además de participar en el crecimiento dendrítico y axonal y en la arborización, el complejo BDNF-TrkB también participa en el establecimiento de las espinas dendríticas así como el desarrollo de las sinapsis.

Durante el desarrollo de las neuronas simpáticas, TrkA media la extensión inicial del axón hacia un tejido blanco y luego la invasión de la ramificación terminal y la invasión sináptica una vez que el blanco es alcanzado. El pasaje desde la extensión de la ramificación hacia la invasión es realizada por el cambio de los ligandos desde NT-3 a NGF que acompaña la señalización vía los TrkA (Kuruvilla *et al.* 2004), demostrando a su vez que los receptores Trk pueden responder diferencialmente dependiendo del estímulo provisto.

En el sistema nervioso central, el receptor TrkA se expresa primariamente en las neuronas colinérgicas que están implicadas en el aprendizaje espacial y en la memoria. Pero también tiene una participación en hipocampo, en donde se ha observado que el agregado de agonistas para TrkA aumenta la actividad de Akt, la síntesis del precursor de BDNF, el aumento del receptor para

neurotrofinas homólogo 2 (proteína relacionada a p75) y en la depresión a largo plazo (LTD). Se supone que el hipocampo es esencial durante la formación de la memoria espacial (Broadbent *et al.* 2006) y que la LTD colabora en este proceso (Brigman *et al.* 2010). En el trabajo de Aboukassim y colaboradores del año 2011, ellos sostienen que un tratamiento a largo plazo con agonistas del receptor TrkA produce LTD en el hipocampo, lo que conductualmente en animales de experimentación se refleja en efectos a corto plazo y déficit en la memoria a largo plazo.

Plasticidad sináptica

El rol de las NT en la modulación de la transmisión sináptica está mejor descrito para la señalización BDNF-TrkB, quien no solo tiene un rol establecido en la promoción de la formación de las espinas dendríticas, sino también en proveer la base estructural para la formación de las sinapsis, aumentando a su vez la transmisión sináptica en el paradigma del LTP (Cohen-Cory *et al.* 2010; Minichiello 2009).

Una sinapsis es típicamente definida por la presencia de una zona activa presináptica con vesículas sinápticas, una cisura sináptica bien definida y la densidad postsináptica (PSD). (Harris *et al.* 1992), mientras que el LTP (*Long Term Potentiation*) es una intensificación duradera de la señal entre dos neuronas, que resulta de la estimulación sincrónica de ambas, lo cual es una forma bien caracterizada de plasticidad sináptica.

El LTP es el resultado de la actividad coincidente de los elementos pre- y post-sinápticos, llevando a la facilitación de la transmisión química que dura cuatro horas *in vitro*, y que puede persistir por períodos de semanas o meses *in vivo*. (Cooke y Bliss 2006).

Existen diferentes formas de inducir LTP en cultivo hipocampal (Molnár 2011) entre las que se encuentran: estimulación de alta frecuencia (*High-Frequency Stimulation* o HFS), la cual es una estimulación postsináptica de alta frecuencia, acoplada con un estado de depolarización en la neurona postsináptica, que genera un potencial de acción y la consecuente transmisión, teniendo en cuenta

que el potencial postsináptico puede ser excitatorio o inhibitorio. La inducción de LTP por estimulación química puede ser inducida por glutamato, Ca^{2+} , rolipram/forskolina, con ácido aminofosfoalérico (APV), con Glicina y con KCL.

El LTP inducido por glutamato (Glu-LTP) ($50\mu\text{M}$, 30 seg) genera pequeños potenciales postsinápticos excitatorios (mEPSC=*miniature excitatory post-synaptic current*). La exocitosis dendrítica evocada por Ca^{2+} se induce mediante la aplicación del ionóforo de Calcio A23187 (1mM, 1 min). Esta es dependiente de la activación de CAMKII. No sólo el Ca^{2+} puede utilizarse para evaluar el LTP sino también el KCL (90mM), el cual depende de los NMDAR, Ca^{2+} , y que es capaz de aumentar la frecuencia de los mEPSC.

En el caso del LTP inducido por Rolipram (inhibidor de PDE, $0,1\mu\text{M}$)/Forskolina (inhibidor de cAMP, $50\mu\text{M}$) no existe necesidad de actividad sináptica pero sí de señalización de NMDAR y CAMKII. También se pueden realizar pre-acondicionamientos con ácido aminofosfoalérico (APV), el cual se incubaba con el antagonista de NMDA en medio libre de Mg^{2+} , aumentando el número de sinapsis silenciosas sin AMPAR.

En esta tesis trabajamos con el LTP inducido por glicina (Gly-LTP) ($100\text{-}200\mu\text{M}$, 5-10 min), la cual aumenta la frecuencia y amplitud de los mEPSC, la autofosforilación de CAMKII, la expansión de las espinas dependientes de NMDAR y la formación de sinapsis.

En los últimos años se ha indagado acerca del bloqueo de la activación de TrkB dependiente de BDNF, el cual lleva a una disminución del LTP hipocampal, tanto en la respuesta temprana como en la tardía. Muchas de las cascadas de transducción de señales disparan la señalización del complejo BDNF-TrkB para el mantenimiento del LTP, como las vías Erk y Ca^{2+} /CAM, quienes a su vez proveen el mecanismo molecular de cómo esta señalización puede influenciar la fortaleza sináptica.

Los estudios que se han realizado en cultivos organotípicos de hipocampo *in vivo* o *in vitro* han mostrado que el umbral para inducir LTP es menor en las dendritas basales en comparación con las dendritas apicales. Aun dentro de las dendritas apicales, los umbrales de plasticidad para inducir LTP y LTD son diferentes en las regiones proximales y distales. La aplicación exógena de agonistas

de dopamina o de dopamina en sí misma puede modular la persistencia del LTP en dendritas apicales (Navakkode et al. 2012).

Los defectos en los eventos postsinápticos durante la transmisión sináptica y la plasticidad son observados en un modelo de ratón con secreción reducida de BDNF (Ninan *et al.* 2010; Patwell *et al.* 2012). A su vez se ha observado que el BDNF es capaz de regular tanto los eventos pre como postsinápticos en el sistema nervioso central. Estos efectos se producen sin consecuencias en la conducta, ya que estos animales desarrollan un aumento en la ansiedad y una disminución en la respuesta al tratamiento antidepressivo.

En cuanto a la aplicación terapéutica en humanos, el LTP sináptico puede ser inducido en el SNC y actuaría a través de mecanismos similares a los de los roedores. Se están probando aplicaciones no invasivas de técnicas de estimulación que despiertan a los sujetos humanos para inducirles cambios en el LTP de larga duración, los cuales pueden ser beneficiosos en el tratamiento de la depresión, enfermedad de Parkinson, epilepsia y miedo neuropático. (Cooke y Bliss 2006).

Receptores TrkB truncados

Más allá de los receptores de secuencia completa, existen además las isoformas truncadas de los receptores Trk (TrkT), las cuales carecen del dominio quinasa intracelular. Estas isoformas cortas son expresadas en altos niveles a través del sistema nervioso maduro. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de su función biológica. En mamíferos, las isoformas completas de TrkB (TrkB *full-length* o TrkBFL) y la truncada TrkBT2 son detectadas solo en neuronas, mientras que TrkBT1 se expresa en células neuronales y no neuronales. (Yacoubian y Lo 2000).

Las isoformas T1 y T2 truncadas se vuelven abundantes en los últimos estadios del desarrollo postnatal. En el trabajo de y colaboradores se demostró que la sobreexpresión de TrkBT1 en neuronas hipocampales indujo la formación de filopodios dendríticos, los cuales ocurrieron de manera independiente a la unión de las NT y de la actividad quinasa del TrkBFL. Cuando se coexpresó un

p75NTR sin su dominio intracelular, se inhibió la actividad del TrkB1 induciendo un efecto de manera dominante negativa (Hartman *et al.* 2004).

Inicialmente, se pensaba que estas formas truncadas actuaban como dominantes negativos, que secuestraban a las NT libres de los receptores completos. Sin embargo, más recientemente se ha vuelto evidente que estas versiones truncadas no son solo secuestradores de NT, sino que también serían moléculas señalizadoras activas (Fenner 2012).

Los TrkB truncados interactúan con el inhibidor de la disociación del nucleótido de guanina de la pequeña G Rho (*Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor* o Rho-GDI), haciendo que la unión de BDNF a la forma de TrkB truncada lleve a la liberación de Rho-GDI y a la inhibición de Rho (Ohira *et al.* 2005). Un análisis realizado en ratones que carecen de la forma truncada de TrkB mostró una disminución en la complejidad sináptica, específicamente dentro de la amígdala, mientras que el área del giro dentado del hipocampo no fue afectada.

En cuanto a los efectos sobre la arborización dendrítica en la corteza, se ha observado que mientras la isoforma completa de TrkB aumentó la ramificación proximal, las formas truncadas promovieron la elongación neta de las dendritas distales. A su vez, los receptores TrkB no regularon el crecimiento dendrítico *per se*, pero sí el modo de dicho crecimiento (Yacoubian y Lo 2000), es decir la arborización y la distancia al *tuft* en donde existe una regulación mediada por determinados receptores y vías de señalización.

La señalización de Trk en la enfermedad

Las NT se han propuesto como tratamiento para enfermedad de Alzheimer, Huntington, Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la neuropatía periférica. Existe evidencia considerable en ratones y en primates que ha demostrado la eficacia de las NT, como NGF y BDNF, en la

prevención de la muerte neuronal y en la mejora de la señalización; en la recuperación de la memoria y la prevención de la declinación cognitiva relacionada con la edad.

Las NT llevan su función trófica a través de la señalización con los receptores Trk. Sin embargo, muchas pruebas clínicas con NGF y BDNF han arrojado resultados poco eficientes, en parte debido a las dificultades para el transporte de las NT y su farmacocinética. Las NT son proteínas que no difunden bien dentro de los tejidos y no cruzan con facilidad la barrera hematoencefálica. Los problemas en el manejo de la dosis y la farmacocinética de estas proteínas han hecho que los factores neurotróficos no puedan ser utilizados en muchas enfermedades neurodegenerativas o causadas por la edad. A pesar de ello, se han efectuado numerosas pruebas preclínicas en los pasados veinticinco años que indicarían que las NT pueden revertir déficits en los desórdenes de memoria y aprendizaje (tal es el caso del Alzheimer; Nagahara *et al.* 2009) A la vez que promueven la regeneración neuronal (Lu y Tuszynski 2008). A su vez, la activación de los receptores Trk resultó en efectos neuroprotectivos dentro de las neuronas motoras, colinérgicas del tallo encefálico basal, estriado, hipocampo y corteza. (Lee y Chao 2001; Rajagopal *et al.* 2004). La activación de los receptores TrkB evita que las neuronas motoras entren en muerte celular luego de una lesión, existiendo asimismo evidencia que confirmaría la participación de BDNF con un rol causal en la enfermedad de Huntington (Zuccato y Cattaneo 2009).

La activación de los receptores Trk resulta un aumento en la actividad de Akt, CREB y ERK, así como también en la fosforilación de los lípidos fosfoinosítidos y la activación de GTPasas como Ras y Rap1 que promueven la supervivencia celular neuronal y la diferenciación (Chao 2003). La transactivación de los receptores Trk no solo es un mecanismo potencial que previene la degeneración relacionada con la edad, sino que también se podría aplicar a desordenes del tipo ansiedad y depresión. La disminución en los niveles de BDNF se ha observado en los comportamientos depresivos inducidos por el estrés, existiendo a su vez una atrofia hipocampal y un aumento en los comportamientos relacionados a la ansiedad. De allí la importancia de identificar nuevos agonistas de los receptores Trk, no solo para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la edad sino también

para las condiciones de miedo, ansiedad y depresión.

En contraste con el dramático efecto que tienen las NT sobre el desarrollo y la supervivencia de las neuronas periféricas, también se pueden encontrar efectos más modestos en el desarrollo de las neuronas del sistema nervioso central. (Reauskolb *et al.*2010). Esto es bastante sorprendente, dado que las NT pueden sostener la supervivencia de muchos tipos de neuronas primarias del SNC *in vitro*, y a su vez también colaborar en la inervación hacia el blanco y los contactos sinápticos, que son elementos claves para la supervivencia en el SNC. Con la excepción del NGF, cada una de las NT promueve la supervivencia de las neuronas motoras *in vitro* (Sendtner *et al.* 1996). A pesar de esto, la mayoría de las motoneuronas tiene un desarrollo normal en ausencia de algunos de estos factores (BDNF, NT-3 o NT4/5) *in vivo* y son solo ligeramente afectadas -déficit en motoneuronas faciales y espinales- en ratones *triple null* (Agerman *et al.* 2000). También se ha observado que los ratones TrkA y TrkC *null* no tienen una reducción significativa en el número de motoneuronas, mientras que en cambio, los ratones TrkB *null* sí muestran una disminución en el núcleo facial y en el tronco espinal lumbar.

Debido a que el BDNF es la NT más abundante en el cerebro, es un candidato fuerte como factor de supervivencia crítico y factor de crecimiento para las neuronas del SNC. El rol del BDNF en el cerebro no puede ser explorado con los ratones mutantes *null* para esta NT, ya que estos mueren antes de que ocurra el aumento de la expresión postnatal de BDNF (Zafra *et al.* 1992). A través de la expresión de Cre recombinasa desde el locus de tau, Reauskolb y sus colaboradores (2010) fueron capaces de cortar los alelos de BDNF desde todas las neuronas diferenciadas en el cerebro y cordón espinal. Este estudio confirmó que BDNF no es un factor de supervivencia específico para la mayoría de las neuronas del SNC, y consistentemente con los estudios tempranos, se demostró que el BDNF se requiere para el crecimiento postnatal de las neuronas estriatales, revelándose además, a partir de análisis de células únicas, una marcada disminución en la complejidad dendrítica y en la densidad espinal de los ratones Tau-Cre:BDNF. Los estudios que analizaron las deleciones condicionales de TrkB dentro del SNC complementan de manera coherente con aquellos que investigaron el

direccionamiento de BDNF.

Se han realizado estudios de deleciones condicionales de TrkB dentro del SNC para evaluar el direccionamiento de BDNF. Cuando CAMKII-Cre fue usado para producir la deleción de TrkB, las neuronas piramidales dentro de las capas corticales II/III y V mostraron una arborización dendrítica reducida y unas capas mas delgadas en los estadios postnatales posteriores (Xu *et al.*2000). En los estadios más tardíos del desarrollo, la pérdida de trkB también resultó en una eliminación progresiva de las neuronas en las cortezas visual y somatosensora. Por lo tanto, el eje BDNF-TrkB funcionaría para sostener el tamaño de las neuronas corticales y estriadas y la estructura dendrítica, en lugar del desarrollo inicial de estas características. De esta manera, el eje BDNF-TrkB jugaría un rol en la estabilización del circuito de supervivencia durante la reorganización de la actividad dependiente de la conectividad cortical (Gorski *et al.*2003).

Rol del tráfico de TrkB

A medida que nos vamos adentrando en el ligando BDNF surgen numerosos interrogantes, uno de ellos es el que tiene que ver con su modulación sinapto específica, ya que es BDNF es un factor difusible cuyo destino final se encuentra en toda la neurona. Un mecanismo de regulación propuesto es el de la síntesis local y/o secreción de BDNF en la sinápsis, donde una vez que la misma se dispara se produce la síntesis de novo de BDNF y su secreción en el espacio sináptico, mientras que a su vez se ha supuesto y aun se continúa indagando acerca de que aquellas sinapsis que se encuentran activas son mejores respondedoras al BDNF. Por otro lado, otro mecanismo de regulación del BDNF es la actividad neuronal/sináptica, la cual a su vez puede aumentar la señalización de TrkB de manera selectiva en las sinapsis activas, todo esto sin afectar a las vecinas menos activas. Estudios múltiples han revelado muchos mecanismos de modulación del ligando BDNF, definiendo principalmente a la actividad de este ligando como dependiente de la regulación de la señalización de su receptor TrkB.

Primero, el mRNA de TrkB se encuentra localizado en las sinapsis, especialmente en las regiones dendríticas y en la fracción sinaptosomal, sugiriendo que de modo similar a BDNF, el mRNA de TrkB puede ser localmente traducido (Righi *et al.* 2000; Simonato *et al.* 2002; Tongiorgi *et al.* 1997). Tongiorgi y colaboradores en 1997 demostraron que la actividad neuronal induce la translocación del mRNA de TrkB dentro de las dendritas *in vitro*. El BDNF también induciría la translocación dendrítica del mRNA de TrkB, sugiriendo que la actividad dependiente de la secreción local de BDNF podría movilizar al mRNA de TrkB dentro de las dendritas.

Segundo, al contrario del transporte del mRNA de TrkB dentro de las dendritas, el cual ocurre en horas, los niveles de proteínas dendríticas de TrkB aumentaron dentro de los primeros diez minutos aproximadamente. La traducción local del mRNA de TrkB podría servir como el primer nodo de regulación de la actividad neuronal.

Tercero, en suma a la traducción local, la regulación de BDNF en las sinapsis activas puede ser también mediada a través de la inserción selectiva de los receptores TrkB, proveyendo una regulación positiva. Corroborando estas observaciones, existen resultados que demostraron que la estimulación tetánica fisiológica, pero no la estimulación de baja frecuencia, aumentaría el número de los receptores TrkB de superficie (Du *et al.* 2000). La actividad neuronal o la estimulación de BDNF llevaron a la rápida inserción de los receptores TrkB en menos de treinta minutos, y mostró ser dependiente del aumento intracelular en los niveles de Ca^{2+} y la activación de CAMKII. Sin embargo, la expresión en superficie de TrkB se vió altamente regulada de manera dependiente a como TrkB se encontraba expuesto al BDNF.

La exposición aguda de BDNF aumentaría rápidamente la expresión de superficie, mientras que la exposición crónica resultaría en una disminución de los niveles de TrkB de superficie (Haapasalo *et al.* 2002), posiblemente debido a la endocitosis de TrkB y a la degradación mediada por el proteasoma. Sin embargo, si la actividad neuronal aumenta significativamente los niveles de superficie de TrkB en un modo azaroso, no quedaría claro cómo se regula la señalización BDNF-TrkB que provee la regulación específica de sinapsis. Un mecanismo que podría restringir la

regulación de las sinapsis altamente activas, sería el movimiento lateral que llevan a cabo los receptores TrkB de membrana insertos en los sitios extrasinápticos para moverse dentro de las sinapsis activas (espinas/zonas activas). La presencia de los *lipid rafts* (colesterol y los microdominios ricos en esfingolípidos) en las sinapsis ofrecería plataformas de señalización especializadas para la regulación de TrkB (Assaife-Lopes *et al.* 2010). La translocación de TrkB dentro de los *lipid rafts* activaría selectivamente la vía de las Ras/MAPK/Erk, pero no la de las PI3k/Akt, sugiriendo que los *lipid rafts* serían capaces de compartimentalizar los eventos de señalización cascada abajo. (Suzuki *et al.* 2004). Sin embargo, al bloquear la translocación de TrkB dentro de los *lipid rafts* disminuyeron los efectos potenciadores de BDNF en las transmisiones sinápticas evocadas en cultivo, y se bloquearon las respuestas sinápticas en cultivos organotípicos hipocampales en respuesta a la estimulación tetánica.

Finalmente, existen mecanismos alternativos que pueden regular específicamente las responsividad a los receptores TrkB en las sinapsis. A lo largo de la secreción de BDNF, la actividad neuronal también aumentaría la concentración intracelular de cAMP *in situ* en las espinas y zonas activas, lo cual regularía la fosforilación de TrkB inducida por BDNF, así como también facilitaría el movimiento de TrkB dentro de las espinas de la densidad postsináptica (Ji *et al.* 2005).

Objetivo general

A partir del marco teórico desarrollado, decidimos investigar el rol de PKD1 y sus efectores inmediatos en la distribución de los receptores de neurotrofinas TrkA y TrkB y su efecto en la actividad de dichos receptores.

Para ello nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Estudiar si la Proteína Quinasa D1 (PKD1) está involucrada en la regulación de la **distribución de receptores neurotróficos TrkA y TrkB.**

- II. Examinar el rol en estos procesos de otras **proteínas de la vía de activación de PKD1 caracterizada por nuestro laboratorio** involucradas en el tráfico intracelular, como ser **Fosfolipasas C β (PLC β) y Proteínas Quinasa C (PKC)**, utilizando para ello inhibidores farmacológicos de los mismas y formas mutantes de las PKCs.

- III. Evaluar la **funcionalidad de los receptores, especialmente TrkB que es el más abundante en SNC**, a través del análisis de la **respuesta de los receptores a sus ligandos**, al **cLTP** y al **Status Epiléptico en ausencia de la actividad de PKD1.**

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

El modelo de estudio que utilizamos para realizar los experimentos de esta Tesis Doctoral fueron cultivos primarios de neuronas hipocampales embrionarias de ratas de 7 DIV (estadio 3), 9-10DIV (estadio 4, Figura 10) cuyo protocolo de cultivo de baja densidad se basó en el capítulo correspondiente del libro editado por Banker y Goslin en 2002.

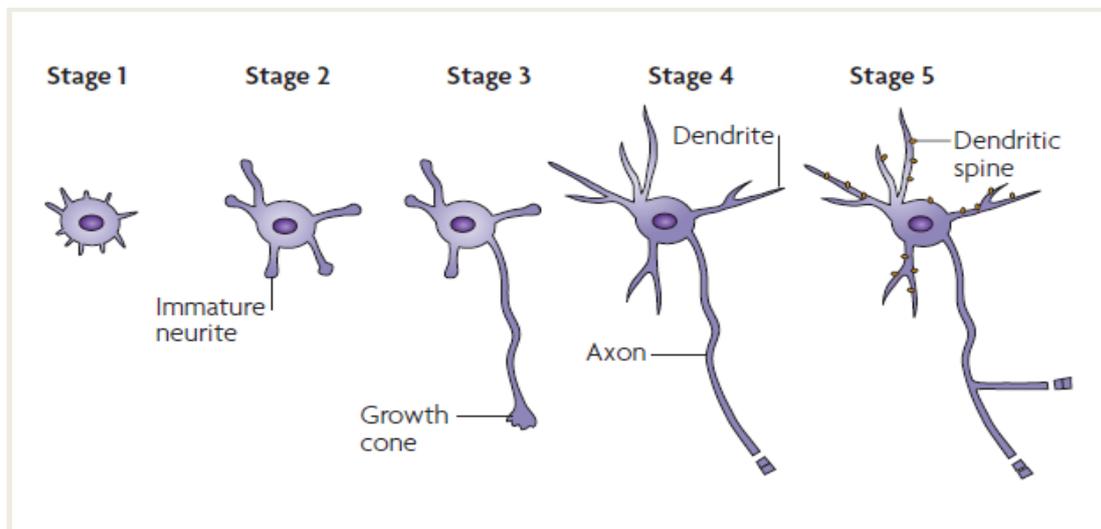


Figura 10. Esquema representando las características del desarrollo neuronal. Estadio 1, Aquí no se encuentran determinadas cuáles de las neuritas primarias serán axón o dendritas. Estadio 2. Las neuritas inmaduras comienzan el proceso de diferenciación. De todas ellas una será el axón e iniciará el proceso de alejarse del soma neuronal avanzando distalmente hacia el cono de crecimiento. Las restantes serán dendritas bien definidas. Estadio 4. Aquí tanto el compartimiento axonal como el dendrítico han establecido sus mecanismos de síntesis, tráfico y regulación establecidos, anterógradamente y retrógradamente. Estadio 5. Ya se formaron las espinas dendríticas en las neuronas maduras y comienza la actividad sináptica y la conducción de los impulsos sinápticos entre las neuronas.

Para llevar a cabo este protocolo se utiliza hipocampo debido a que es una fuente de neuronas piramidales bien caracterizada del SNC, encontrándose en alrededor del 85 al 90% de la población neuronal total. Además, tienen una forma y características bien definidas, con un axón y dendritas bien diferenciados, un árbol dendrítico distintivo que consiste de una sola dendrita apical larga y muchas dendritas basales cortas, todas altamente ramificadas y con espinas dendríticas. Conjuntamente, estas neuronas realizan conexiones directas entre ellas y con las interneuronas endógenas.

Como fuente de los hipocampos, en nuestro laboratorio utilizamos ratas preñadas E18-E19, porque en este estadio la generación de neuronas piramidales (que se inicia alrededor del E15) ya está completo y las células del giro dentado que se desarrollan post-natalmente no han comenzado su desarrollo por completo aún. El tejido es fácil de disociar, las meninges son fácilmente removidas y el número de células gliales es modesto.

Preparación de vidrios

Los cubreobjetos donde se crecerán las neuronas (Cubreobjetos circulares de vidrio de 12 mm de diámetro. Assistent, Sondheim, Alemania) se colocan en *rack* de porcelana (capacidad máx. 23 vidrios redondos; Fisher Scientific, cat No. 12-545-100). Previamente, se los lava dos veces con agua destilada por 10 min para remover tierra y detergente residual del proceso de manufactura.

Los mismos son transferidos a HNO₃ (c), quedando allí por un lapso de 18 a 36 hs. Luego son lavados ocho veces (cuatro con agua mili-Rho y cuatro con agua mili-Q durante 20 minutos cada uno). Finalmente son secados en estufa a 225°C y enfriados a temperatura ambiente.

A continuación se aplica polilisina (hidrobromuro de poli-L-lisina, Sigma cat. No. P2636), la cual es disuelta en buffer borato 0.1 M, pH 8.5, que es preparado con agua miliRho doblemente autoclavada para ser posteriormente filtrada. Se cubre cada vidrio con 6 gotas de solución y se los deja durante toda la noche.

Al día siguiente los vidrios son lavados cinco veces por 20 minutos con agua mili-Q autoclavada. Al finalizar se coloca el medio de plaqueo (MEM-10 HS) y se ubica a las placas que contienen los vidrios a 37°C en el incubador hasta el momento de la siembra de las neuronas.

Medios de cultivo

Las células son plaqueadas en un medio conteniendo suero, y luego son transferidas a un medio libre de suero una vez que se han unido al sustrato.

Los medios que se utilizan y la forma de prepararlos es la siguiente:

MEM-10 (HS) (Volumen final de 100 ml)

MEM with Earle's salts conteniendo glucosa extra (600 mg/l) y 10% de HS

50 ml D-MEM 2X.

10 ml Suero de caballo (HS).

1 ml Estreptomicina (25mg). Cada 15 días volver a agregar y filtrar.

1 ml Piruvato (sal sódica) (11mg, 100X).

Agregar agua mili-Q sin autoclavar para llevar a volumen final.

Filtrar.

BUFFER BORATO (400 ml)

1.9 gr Bórax.

1.4 gr Ácido Bórico.

Llevar a volumen final con agua mili-Q. Filtrar con papel de filtro. Llevar a pH=8.5.

N2-NEUROBASAL

1 ml Suplemento N-2

0.1 gr Ovoalbúmina

29 mg Glutamax (1 ml de 100X)

2 ml Suplemento B27

Filtrar. Los stock de los suplementos N2 y B27 son mantenidos a -20 °C.

BUFFER HANKS (200 ml)

20 ml HANKS 10X

2 ml Bicarbonato de Sodio 100X (1.75 gr/50 ml de agua mili-Q)

Llevar a Volumen final con agua mili-Q sin autoclavar. Ajustar pH=7.4 para disgregar con Tripsina

10X. Filtrar.

Dissección y Cultivo de Neuronas Hipocámpicas

Se eutanizar la rata preñada con halotano u otros anestésicos aprobados, se remueve el útero y se ubica en una placa de petri estéril. Continuar en flujo laminar (A los E18 los fetos miden alrededor de 25mm).

Se decapitan los fetos para disectarles el cerebro y ubicarlos en HANKS 1X. Se remueve el hipocampo bajo un microscopio de disección. Se sacan las meninges y luego se colecta el hipocampo en una placa de petri pequeña.

Los hipocampos son colocados en tubos de 1.5 ml, llevándose a un volumen final de 4.5 ml con HANKS 1X. Luego se agregan 0.5 ml de tripsina 2.5% y se incuba a 37° C por 15 minutos. Para una placa de 35 mm con 3 cerebros disectados se deben utilizar 300 µl de tripsina 10X, llevando a un volumen final de 3 ml.

Se remueve la tripsina y se agregan 5 ml de HANKS 1X (esperar 5 minutos). Repetir este paso dos veces más llevando a un volumen final de 3 a 5 ml.

Se disocian las células pipeteando hacia arriba y abajo con una pipeta Pasteur de poro normal y luego con dos de poro menor alterado por exposición al fuego. Continuar pipeteando hasta que no queden más trozos de tejido.

Se determina la densidad de las células en un hematocitómetro. El rendimiento debe ser de aproximadamente 500.000 células/hipocampo. También debe determinarse la fracción de células viables mediante el método de tinción por exclusión con trypan-blue.

Se agrega el número deseado de células viables a cada una de las placas conteniendo cubreobjetos tratados con polilisina en MEM 10% HS. La densidad de plaqueo estándar utilizada es de 150.000 células por cada placa de 60 mm.

Después de 2 a 3 horas, se cambia el medio por N2-Neurobasal. Una vez por semana debe removerse aproximadamente 2 ml de medio y reemplazarlo con medio fresco.

Transfeccion con Lipofectamina 2000

Se realiza en placas de 35mm, en las que se pueden colocar hasta 4 vidrios de 1mm de espesor c/u. Antes de iniciar el proceso se agrega 1.5ml de OPTI-MEM en las placas y se las coloca en el incubador a 37°C. Este medio no posee factores de crecimiento y es el indicado para realizar el ensayo de transfección. Se preparan las mezclas de lipofectamina (5 µl para una placa de 35mm), incubando 5 minutos a temperatura ambiente la mezcla de Lipofectamina y Opti-MEM. En paralelo se prepara la mezcla de ADN (hasta 12 µg para una placa de 35mm). Ambas mezclas se combinan e incuban de 20-30 minutos a temperatura ambiente. El volumen de esta combinación de Lipofectamina más ADN debe ser de 300µl por placa (Volumen final=1,5ml). El tiempo de incubación de los cultivos neuronales con la Lipofectamina fue de 40 minutos a una hora. Luego de ese tiempo se realiza el cambio de medio y se coloca N2-Neurobasal, dejando que las células expresen las nuevas proteínas alrededor de 16 a 24 horas.

Ensayos de Inmunofluorescencia (IF)

Luego de períodos de expresión que van desde las 16 a las 24 horas según los diferentes plásmidos utilizados, se da inicio al ensayo de inmunofluorescencia para la detección de las proteínas transfectadas. En primer lugar, se lavan las células con PBS 1X (37°C), luego se las fija utilizando PFS al 4% (paraformaldehído-sacarosa a 37°C, por 20 minutos), se lavan las células con PBS 1X (temperatura ambiente) 3 veces, se permeabilizan utilizando tritón al 0.2% por 6 minutos (con el cuidado de no exceder este tiempo para no dañar la membrana celular), se lava otras 3 veces con PBS 1X, y posteriormente se bloquea con 50 µl por vidrio de BSA al 5% en PBS 1X (*Bovine Serum Albumin*=Albúmina Sérica Bovina), durante 40 minutos a 1 hora.

Inmediatamente se realiza la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes, preparados en BSA al 1% en PBS 1X y centrifugados a 4°C (por 10 minutos a máxima velocidad), se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno entre un anticuerpo y el otro. Luego

de estos lavados se realiza el montaje de los vidrios en un portaobjeto, utilizando la solución de montaje *Fluor-Save Reagent* (Calbiochem). El objetivo de este ensayo es visualizar posteriormente las muestras en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss) y capturarlas en un microscopio confocal (ver materiales y métodos).

En determinados experimentos, y una vez finalizado el tiempo de sobreexpresión (16 a 24 horas) se realizó el fijado e inmunofluorescencia para la proteína MAP-2, la cual es utilizada frecuentemente en neurobiología como marcadora de procesos dendríticos.

En los experimentos de inmunofluorescencia se utilizaron anticuerpos primarios específicos contra los tag no fluorescentes (HA-, GST-, MAP2), mientras que en el caso de aquellas proteínas fluorescentes (HcRed-, GFP-, RFP-) se realizó directamente el fijado de las neuronas y el bloqueo para detectar a los tag no fluorescentes con los cuales se hacían los experimentos de co-transfección.

Anticuerpos primarios

En este trabajo se han utilizado los siguientes anticuerpos primarios:

- Anticuerpo monoclonal de ratón MAP2, dirigido contra la proteína MAP2 vacuna, clon AP14 (Sigma-Aldrich Co., USA), dilución 1:400 para inmunofluorescencia (IF).
- Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra un epítopo de la proteína fluorescente GFP, Santa Cruz Biotechnology, Inc USA, para IF dilución 1/300.
- Anticuerpo monoclonal de conejo frente a la proteína Hemaglutinina (HA), Santa Cruz Biotechnology, Inc USA, para IF dilución 1/100.
- Anticuerpo monoclonal de conejo frente al TrkB total, Santa Cruz Biotechnology, Inc USA, para IF dilución 1/200.

Anticuerpos secundarios

En este trabajo se han utilizado los siguientes anticuerpos secundarios:

- Anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Inc., USA) dilución 1/500.
- Anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Inc., USA) dilución 1/500.
- Anti-IgG de ratón conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 633 (Molecular Probes, Inc., USA) dilución 1/300.

Ensayo con inhibidores de PKCs y PI-PLCs

Se preparan las células en placas de 35mm, se las transfecta con Lipofectamina y los correspondientes plásmidos. Al finalizar la transfección y hacer el cambio de medio se agrega N2-Neurobasal condicionado más los inhibidores, y luego de 16 a 24 horas de expresión se efectúa la IF de los vidrios tratados y sus respectivos controles.

Uno de los inhibidores de PKCs utilizado fue el Gö6983 (Calbiochem, Cat #365251), un potente inhibidor de este tipo de quinasas, permeable en las células y de acción reversible, que inhibe numerosas isoenzimas de PKC (IC₅₀ = 7 nM para PKC α y PKC β ; 6 nM para PKC γ ; 10 nM para PKC δ ; 60 nM para PKC ζ). Gö 6983 no inhibe específicamente a la PKC μ (PKD1) (IC₅₀ = 20 μ M) y puede ser usado para diferenciar PKD1 de otras isoenzimas de PKC. Este inhibidor se prepara en DMSO (100 mg/ml), utilizando una concentración final de 10 μ M.

El otro inhibidor de PKCs empleado fue el Gö6976, el cual también es permeable en las células, reversible e inhibidor competitivo de algunas isoenzimas de PKC. Actúa selectivamente sobre la isoenzima Ca²⁺-dependiente PKC α (IC = 2.3 nM) y PKC β I (IC = 6.2 nM). No afecta la actividad quinasa de las isoenzimas PKC δ -, ϵ -, and ζ Ca²⁺-independientes aun a niveles micromolares. Se ha reportado que inhibe PKC μ a concentraciones levemente mayores (IC₅₀ = 20 nM). (Calbiochem, Cat #365250). Su preparación se realiza en DMSO (100 mg/ml), utilizando una concentración final de

10 μ M.

El inhibidor de PI-PLCs utilizado fue el U73122, el cual inhibe la activación de fosfolipasas C (PLC) inducida por agonista (IC₅₀ = 1-2.1 μ M) en plaquetas y neutrófilos humanos. (Calbiochem, Cat #662035). Como control se utilizó un análogo estructural de U7312, el U73343. Ambos compuestos fueron preparados en cloroformo a una concentración experimental de 5 μ M final, a partir de una solución 5mM que se prepara previamente y a la cual se le evapora el cloroformo antes de almacenarla a -20°C. Antes de cada experimento se reconstituye la alícuota en cloroformo para su uso inmediato.

Captura y Procesamiento de Imágenes por Microscopia Confocal

La misma se efectuó en el Laboratorio de Microscopia Confocal de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC), integrante del Sistema Nacional de Microscopía, para lo cual se utilizaron microscopios Pascal de Zeiss, FV300 y FV1000, efectuándose capturas en 488, 555 y 647 nm de longitud de onda, con un aumento de 60X o 100X según el diseño experimental, con un objetivo de inmersión en aceite, NA=1,4. Posteriormente, las imágenes fueron procesadas utilizando los programas LSM-Zeiss, Fiji of ImageJ, Photoshop CS6, Statistica y Sigma Plot 10 para realizar las cuantificaciones, preparación de imágenes y de gráficos pertinentes.

Se realizaron cuantificaciones del largo y número de los procesos dendríticos, a través del uso del software LSM-Zeiss, también se efectuaron medidas de intensidad de fluorescencia, deconvolución y colocación con el software ImageJ. Estos datos fueron estadísticamente analizados a través del programa Statistica, utilizando un p=0,05. Los resultados obtenidos de este proceso fueron posteriormente graficados mediante Photoshop CS6, Fiji of ImageJ y/o Sigma Plot 10.

cLTP en neuronas hipocampales en cultivo

Para evaluar la funcionalidad de los receptores en ausencia de actividad de PKD1 mediante el uso de LTP (*Long Term Potentiation* o potenciación a largo plazo) químico (Zhao *et al.* 2009), utilizamos neuronas hipocámpales en cultivo de 10DIV, a las cuales se las co-transfectó con el plásmido control (HcRed) o con el shPKD1 junto con el receptor TrkB en estudio. Se escogió al receptor TrkB debido a que el BDNF es muy abundante en el SNC y porque TrkA promueve mayormente LTD (*Long Term Depression* o depresión a largo plazo).

Una vez finalizada la co-transfección del receptor, se dividió el experimento en cuatro grupos diferentes: **control** (HcRed/shPKD1); **LTP** (HcRed/shPKD1 con glicina, (Gly, 100µm, 10min); **Cicloheximida** (CHX 200µm, 30min); y **CHX+Gly** (HcRed/shPKD1 con CHX 200µm, 30min, añadiéndose luego glicina (Gly 100µm, 10min). Al finalizar el experimento se fijaron las neuronas para inmunofluorescencia con el anticuerpo HA de conejo (1/100) en condiciones no permeabilizantes, para detectar el receptor a nivel de la membrana plasmática y se procedió luego a la captura de las imágenes en el microscopio confocal.

Para realizar las cuantificaciones se utilizó la medición de la fluorescencia de la célula total corregida (*Corrected Total Cell Fluorescence* o CTFT) en el soma, otra dendrita (a la izquierda de la dendrita apical) y en la dendrita apical en un n=30 por cada tratamiento.

La fórmula para calcular la CTFT es:

CTFT= Densidad Integrada x (Media del Area de Interés- Media del Ruido de Fondo) para medir co-expresión en todos los tratamientos realizados (Gavet y Pines, 2010)

En estos experimentos se busca medir la intensidad de fluorescencia corregida al eliminar el ruido que puede haberse producido por la misma captura, o autofluorescencia, pudiéndose determinar desde este valor cuánto del receptor o proteína en estudio se encuentra inserto en la membrana plasmática. A partir del índice de las medidas en las diferentes secciones evaluadas (soma, apical y otra dendrita) es posible corroborar si se afectó o no la plasticidad sináptica al modificar la actividad de PKD1 y el reclutamiento del receptor TrkB en la membrana plasmática.

En el caso que se produzca cLTP, se debería observar un aumento en el tráfico de proteínas hacia las sinapsis, que en nuestro caso sería el del receptor TrkB sobreexpresado, comparando su fluorescencia previa y posterior a los diferentes tratamientos ya mencionados. Un aumento del receptor TrkB inserto en membrana plasmática nos estaría señalando un rol significativo de la PKD1 en su transporte y localización en la membrana sináptica, como facilitadora del proceso de sinapsis y plasticidad neuronal. Mientras que una disminución nos indicaría que PKD1 no tendría un rol significativo en el *sorting* o distribución del receptor y en su funcionalidad a nivel sináptico.

Status epilepticus (SE) en cultivo

El fenómeno conocido como *Status Epiléptico* (SE) se observa en neuronas en cultivo cuando se retira el Mg^{2+} del medio de cultivo. Debido a que este catión es necesario para regular la función del receptor NMDA ubicado en las sinapsis, su ausencia produce lesiones prolongadas que finalmente llevan a una neurodegeneración, dando lugar al SE.

Los experimentos se realizaron partiendo de cultivos de neuronas hipocampales de 9DIV, ya sea transfectadas con el plásmido control (HcRed) o con el bloqueante de la actividad de PKD1 (shPKD1), o directamente sin transfectar. Al finalizar las transfecciones, se añadió *buffer* con o sin Mg^{2+} , se incubó durante tres horas y luego se procedió a realizar la fijación con PFS 4% y la posterior inmunofluorescencia, con el anticuerpo primario anti-TrkB de Santa Cruz, y el secundario Alexa fluor 488 anti-conejo, para luego evaluar mediante microscopía confocal la intensidad de fluorescencia en el soma y en la dendrita apical del receptor TrkB endógeno en los diferentes tratamientos.

Resultados:

Objetivo específico I

Estudiar el papel de la proteína quinasa D1 en la regulación de la distribución de los receptores neurotróficos TrkA y TrkB.

Resultados: Receptor TrkA

Silenciamiento y dominante negativo de PKD1 en presencia o ausencia de NGF

Es sabido que TrkA posee una localización activa en el terminal del axón, llegando a esa región de la neurona por transcitosis desde las dendritas (similar a VAMP2), para lo que depende del estímulo de su ligando específico, el NGF (Ascaño *et al.* 2009). En las condiciones en las que estudiamos a estos receptores, es decir **en presencia o ausencia** de su ligando específico NGF, la distribución de TrkA en toda la neurona fue mayoritariamente somato-dendrítica (observada por fusión del receptor a GFP en su porción C-terminal).

Ante una disminución de la expresión de la PKD1, ya sea a través de la expresión de un sh-PKD1 o de la sobreexpresión de la PKD1-KD, esta localización se vio claramente afectada, pero de manera diferente a lo que se había observado tanto para mGluR1, mGluR5 y NR2A (Fraire, Masseroni *et al.* 2014 y trabajo de Tesis de María Luján Masseroni en nuestro laboratorio), como para TfR y LRP (Bisbal *et al.* 2008). Al procesar las imágenes, se visualizó una acumulación de TrkA en vesículas localizadas en el cuerpo neuronal, con la consecuente disminución de su distribución en los procesos neuronales, además de observarse una disminución en el largo de los procesos dendríticos sin cambios significativos en su número (Figura 13, Gráfico3).

Para confirmar en qué tipo de estructura membranosa era retenido el TrkA en ausencia de

actividad PKD1, se realizaron experimentos de co-transfección con la proteína residente del Golgi, SialT2 (Sialiltransferasa 2) acoplada a la proteína fluorescente roja (RFP= *Red Fluorescence Protein*) (Figura 14). En estos experimentos, realizados con neuronas hipocampales de 7 DIV, se pudo determinar que existía co-localización del receptor TrkA con la proteína SialT2 en el Golgi solamente cuando la actividad de PKD1 era anulada, lo cual implicaría que existe un defecto en el transporte del receptor en dichas condiciones experimentales, similar a lo que fuera observado para otros marcadores de membrana en células no polarizadas (Díaz Añel y Malhotra 2005, Díaz Añel 2007, Coria *et al.* 2014), y no a un cambio en la distribución del receptor como fuera descrito para otro tipo de marcadores neuronales (Bisbal *et al.* 2008, Fraire, Masseroni *et al.* 2014). Estos resultados estarían señalando que la PKD1, al igual que lo observado en células HeLa, también participaría en la regulación de la fisión de vesículas que llevan como cargo al receptor de NGF hacia la membrana neuronal.

El resultado obtenido con TrkA, nos permitiría asumir que en neuronas la PKD1 podría estar involucrada por un lado en la regulación de la distribución a nivel del Golgi o del reciclado en la membrana plasmática de determinados receptores, y por el otro que participaría, al igual que en células no polarizadas, en el tráfico de otras proteínas de membrana como TrkA, a través de la regulación de la fisión de las vesículas que transportan esos cargos desde el Golgi hasta la superficie celular.

Estos resultados con el receptor TrkA no hacen más que demostrar la complejidad de la regulación del transporte intracelular en neuronas, el cual dependería del tipo de proteína que es transportada y de su localización final, sumando a ello el hecho que muchas de estas proteínas deben su último destino a la presencia de su ligando específico, lo que supondría decir que en esos casos dependerían de las condiciones del medio externo y de la interacción con las células vecinas.

En relación a la respuesta del receptor a su ligando específico, el NGF, pudo observarse en las neuronas control (transfectadas con HcRed o PKD1wt) un aumento significativo en las ramificaciones dendríticas en comparación a aquellas células que no fueran estimuladas con el NGF.

Como era de esperarse, este efecto no pudo visualizarse en aquellas neuronas donde la actividad de la PKD1 fue inhibida (shPKD1 o PKD1wt) en ausencia de NGF (Figura 11,13,14, Gráfico 1) y en presencia de NGF (Figura 12, Gráfico 2), confirmando que el bloqueo del TrkA en el Golgi afectaría de manera significativa su respuesta al ligando específico, y que esa retención del receptor en la organela podría contribuir de manera importante como una de las causas del desarrollo dendrítico más lento que se ha observado en los diferentes experimentos en donde la actividad de esta quinasa fue bloqueada.

Sobreexpresión de TrkA-GFP+HcRed/shPKD1 sin NGF

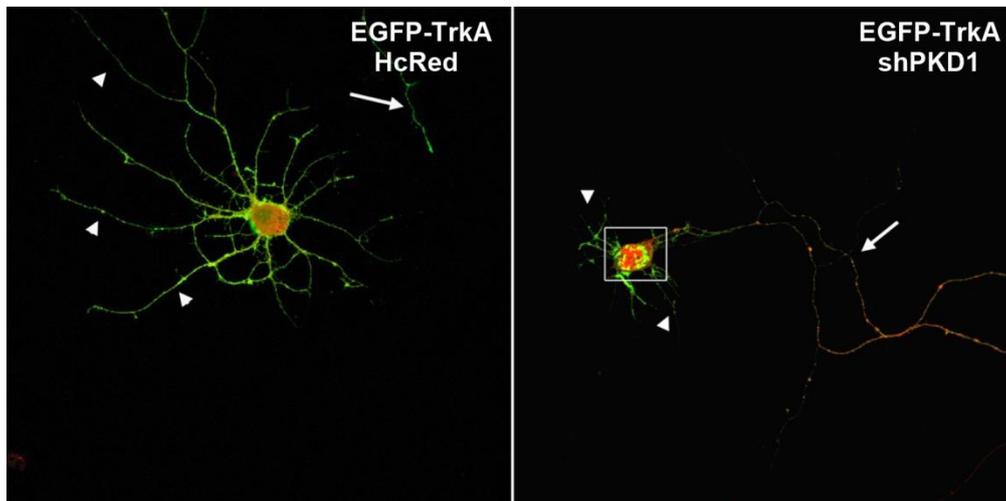


Figura 11. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkA unido a GFP en ausencia del ligando específico NGF. A la izquierda se observa el control transfectado con la proteína roja fluorescente **HcRed**, la cual se distribuye por toda la neurona, al igual que TrkA (verde), que puede observarse localizado tanto en la región somato-dendrítica (cabezas de flecha) como axonal (flecha). En la derecha se ha co-transfectado el receptor neurotrófico con el *short-hairpin* ARN para PKD1 (**shPKD1**), observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos (cabezas de flecha), y una reducción notoria de la distribución de TrkA en toda la célula (flecha), a excepción de una gran acumulación del receptor en estructuras vesiculares localizadas en el soma neuronal (recuadro).

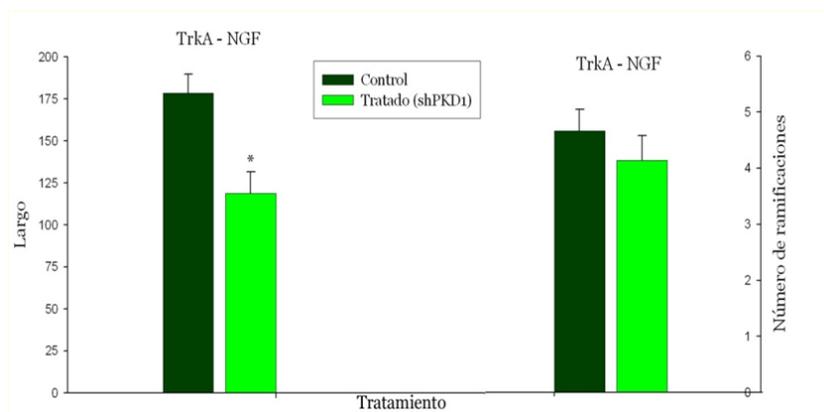


Gráfico 1. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (HcRed) y tratado (shPKD1) en ausencia del ligando NGF en los grupos en donde se sobreexpresó TrkA-GFP, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Sobreexpresión de TrkA-GFP+HcRed/shPKD1 con NGF

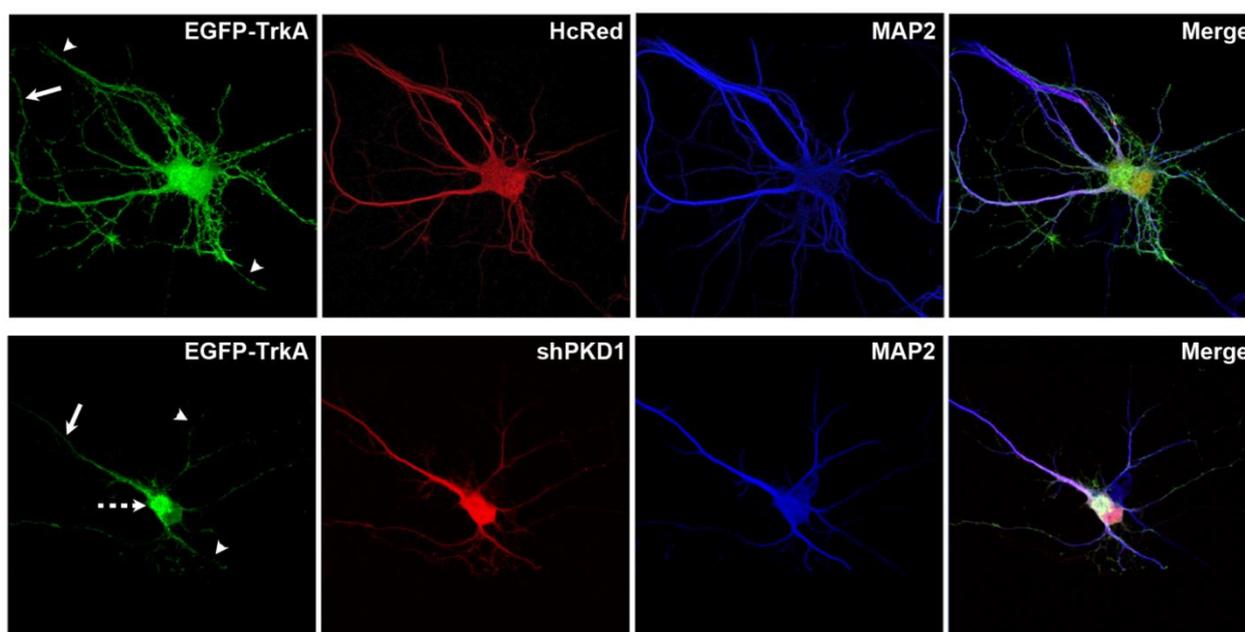


Figura 12. Neuronas de hipocampo de rata de 7DIV transfectadas con TrkA unido a GFP en presencia del ligando específico NGF. En la figura superior se observa el control co-transfectado con HcRed (rojo), observándose que TrkA (verde) se localiza tanto en la región somato-dendrítica (cabezas de flecha) como axonal (flecha). El anticuerpo frente a la proteína dendrítica MAP2 (azul) fue utilizado a modo de control. En la parte inferior se ha co-transfectado el receptor neurotrófico con el *short-hairpin* ARN para PKD1 (**shPKD1**), observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos (cabezas de flecha), y una reducción notoria de la distribución de TrkA en toda la célula (flecha), a excepción de una gran acumulación del receptor en estructuras perinucleares en el soma neuronal (flecha punteada).

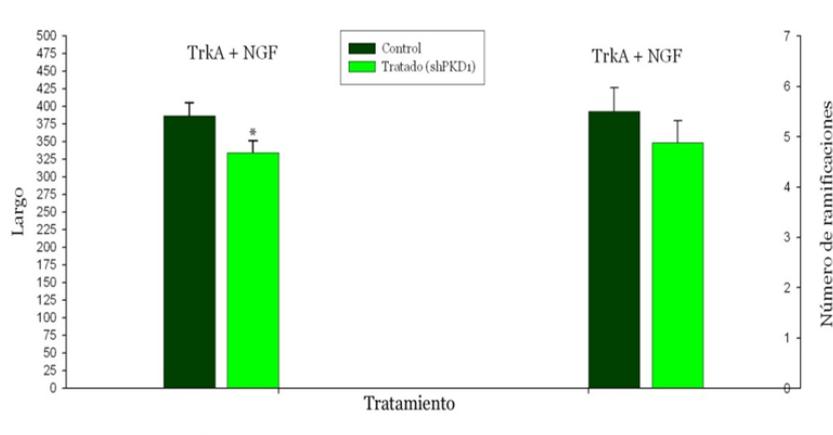


Gráfico 2. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (HcRed) y tratado (shPKD1) en presencia del ligando NGF en los grupos en donde se sobreexpresó TrkA-GFP, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Sobreexpresión de TrkA-GFP con GST-PKD1 wt/kd sin NGF

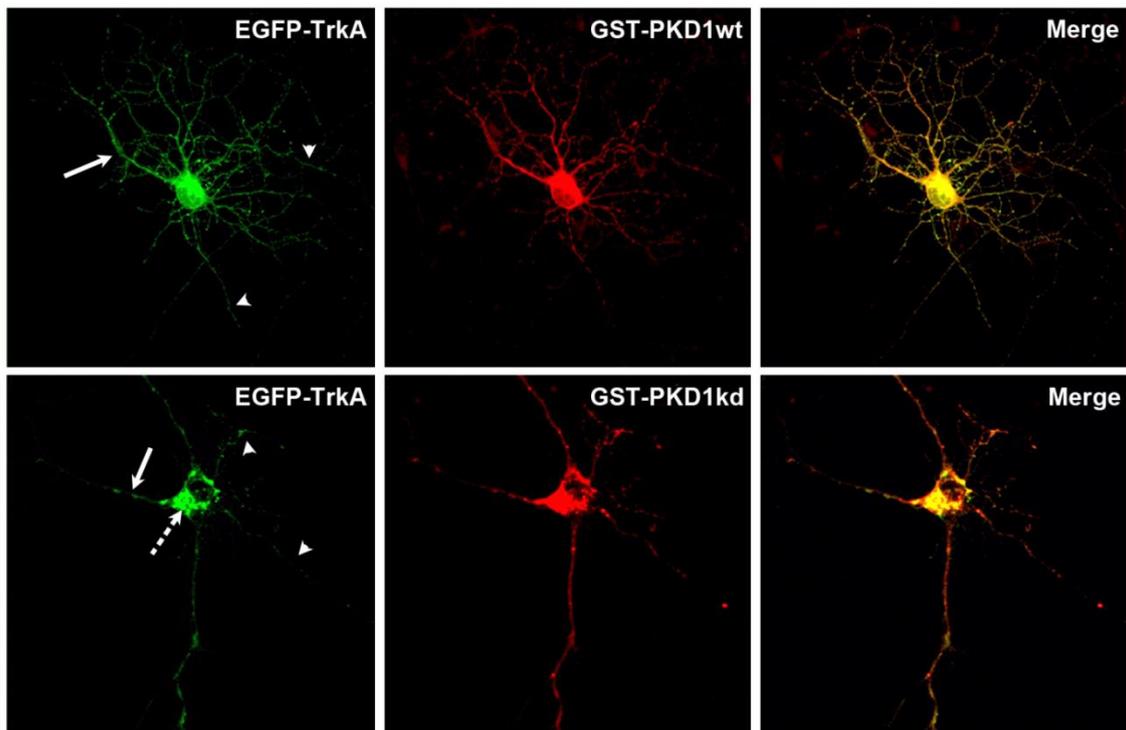


Figura 13. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con TrkA unido a GFP y la versión dominante negativa de PKD1 en ausencia del ligando específico NGF. En la figura superior se observa el control co-transfectado con la versión salvaje (*wild type* o WT) de la PKD1 acoplada al tag GST (rojo), observándose que TrkA (verde) se

localiza tanto en la región somato-dendrítica (cabezas de flecha) como axonal (flecha). En la figura inferior se ha co-transfectado el receptor neurotrófico con la mutante dominante negativa de PKD1 (*kinase dead* o KD) (rojo), observándose nuevamente la disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos, y una reducción notoria de la distribución de TrkA en toda la célula, a excepción de una gran acumulación del receptor en estructuras vesiculares localizadas en el soma neuronal (flecha con puntos).

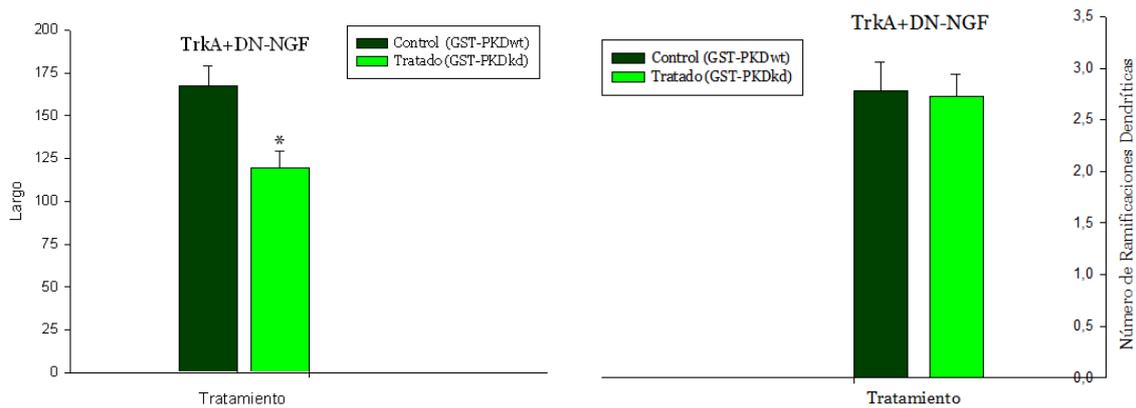


Gráfico 3. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (GST-PKDwt) y tratado (GST-PKDkd) en ausencia del ligando NGF en los grupos en donde se sobreexpresó TrkA-GFP, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Sobreexpresión de TrkA-GFP con GST-PKD1wt y kd y RFP-SialT2

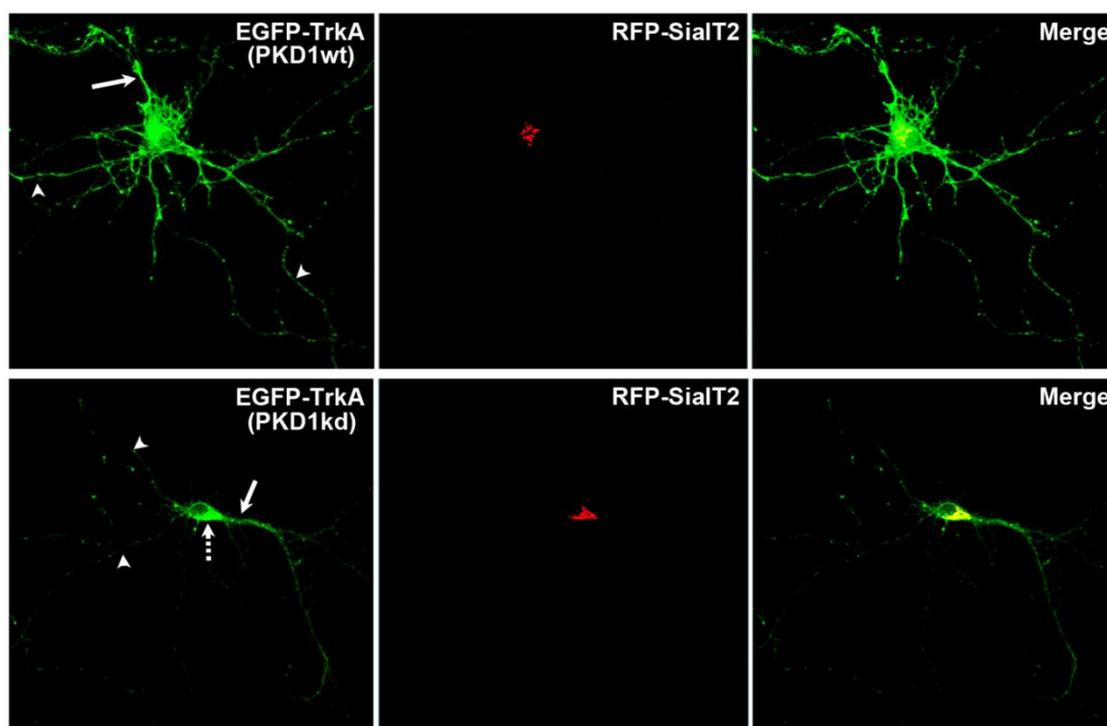


Figura 14. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con TrkA unido a GFP, la versión dominante negativa de PKD1 y el marcador de TGN, SialT2 unido a RFP en ausencia del ligando específico NGF. En la figura superior se observa el control co-transfectado con la versión salvaje (*wild type* o WT) de la PKD1 acoplada al tag GST, y en rojo se observa el marcador del aparato de Golgi SialT2 acoplado a RFP (rojo), observándose que TrkA (verde) se localiza tanto en la región somato-dendrítica (cabezas de flecha) como axonal (flecha). En la figura inferior se ha co-transfectado el receptor neurotrófico con la mutante dominante negativa de PKD1 (*kinase dead* o KD), y en rojo se observa el marcador del aparato de Golgi, SialT2 acoplado a RFP (rojo), viéndose nuevamente la disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos, y una reducción notoria de la distribución de TrkA en toda la célula, a excepción de una gran acumulación del receptor en estructuras vesiculares localizadas de forma perinuclear en el soma neuronal (flecha con puntos), que se correspondería con el aparato de Golgi debido a su colocación con SialT2.

Silenciamiento de PKD1 y co-transfección con la mutante constitutivamente activa HA-TrkAca

En busca de dilucidar si existe una relación entre la actividad quinasa del receptor TrkA y el transporte mediado por PKD1, se realizaron experimentos de co-transfección de la forma mutante constitutivamente activa de TrkA acoplada al tag-HA (HA-TrkAca) con el shPKD1.

Al bloquear la actividad de esta quinasa, se observó que la localización del receptor mutante

cambia de manera similar a la observada con la versión salvaje del mismo. Lo mismo sucede con los defectos observados en el compartimiento somatodendrítico, en donde al igual que con la versión salvaje disminuye el largo pero no el número de los procesos dendríticos, acumulándose el receptor mutante mayormente en el compartimiento somático neuronal y disminuyendo su distribución en el árbol dendrítico (Figura 15, Gráfico 4). Este resultado nos permitió demostrar que el transporte mediado por PKD1 de TrkA sería independiente de la actividad quinasa del receptor.

Sobreexpresión de HA-TrkACA con HcRed/shPKD1 en ausencia de NGF

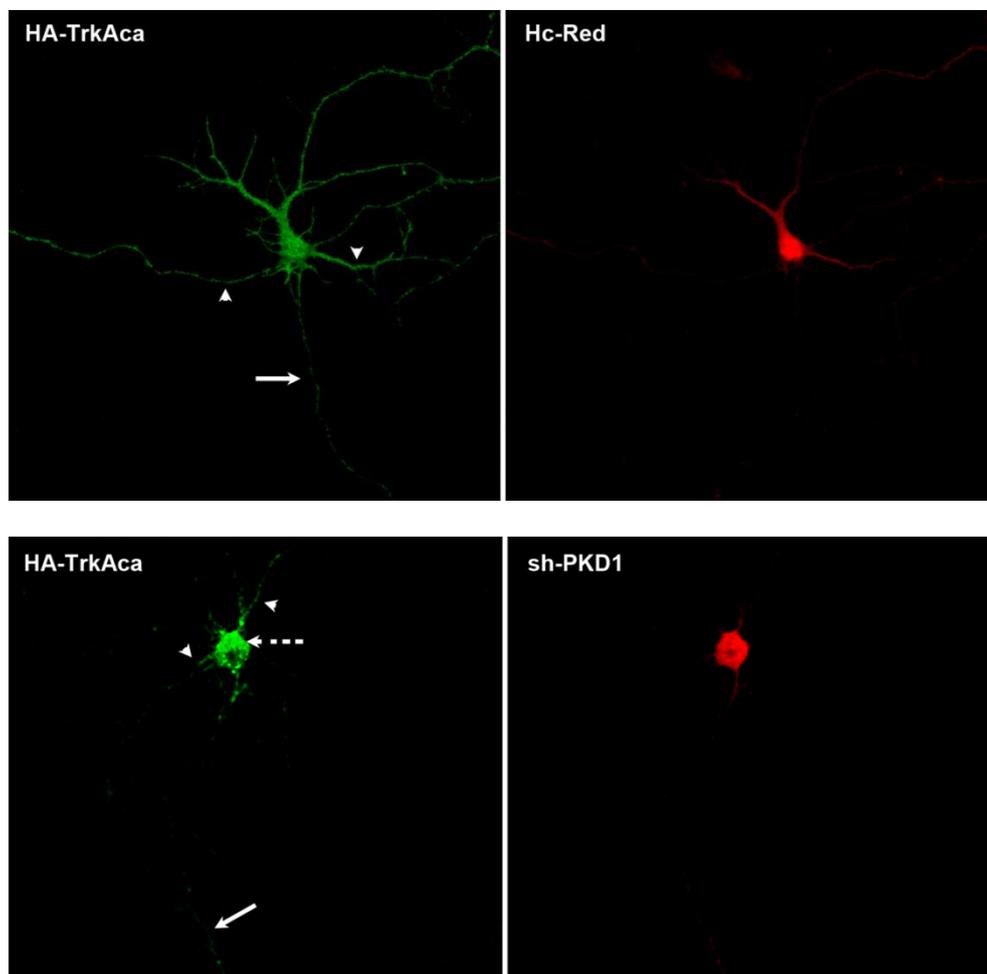


Figura 15. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkA mutante constitutivamente activo unido a HA (TrkAca) en ausencia del ligando específico NGF. En la parte superior se observa el control transfectado con la proteína roja fluorescente **HcRed** (rojo), la cual se distribuye por toda la neurona, al igual que TrkAca (verde), que puede observarse localizado tanto en la región somato-dendrítica (cabezas de flecha) como axonal (flecha). En la parte inferior se ha co-transfectado el receptor neurotrófico con el *short-hairpin* ARN para

PKD1 (**shPKD1**), observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos (cabezas de flecha), y una reducción notoria de la distribución de TrkAca en toda la célula (flecha), a excepción de una gran acumulación del receptor en estructuras vesiculares localizadas en el soma neuronal (flechas con puntos).



Gráfico 4. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (HcRed) y tratado (shPKD1) en ausencia del ligando NGF en los grupos en donde se sobreexpresó HA-TrkAca, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Resultados: Receptor TrkB

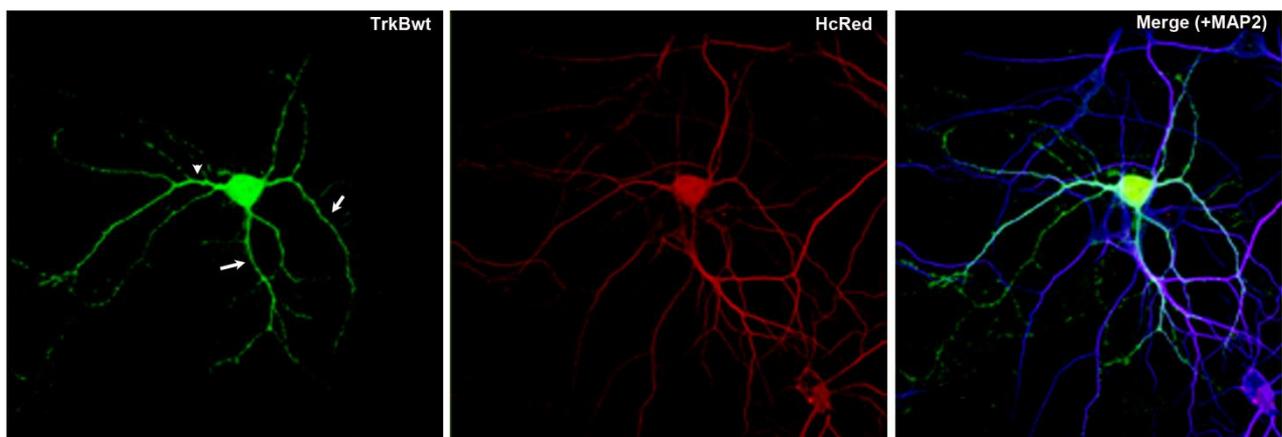
Silenciamiento de PKD1, en presencia o ausencia de BDNF

Con el objetivo de estudiar la influencia de la ausencia de una PKD1 activa en el tráfico y distribución del receptor TrkB (fusionado al tag-HA en su porción N-terminal), se realizaron experimentos de silenciamiento con el HcRed-shPKD1 en presencia o ausencia del ligando BDNF específico, para proceder luego al análisis de las neuronas por inmunofluorescencia de la proteína de fusión HA y del marcador de procesos dendríticos MAP2, tanto en condiciones permeabilizantes con Tritón 0,2% como sin permeabilizar. Estas últimas condiciones experimentales permiten analizar aquellos receptores que se insertaron en la membrana plasmática, ya que en este caso el dominio N-

terminal (HA) queda expuesto en el exterior de la superficie celular, pudiéndose comparar de esta forma la distribución de TrkB y su efecto en la polaridad y en su funcionalidad, tanto en presencia como en ausencia de su ligando específico BDNF.

En la Figura 16, Gráfico 5 se observa que en ausencia de BDNF, tanto en las neuronas permeabilizadas como sin permeabilizar, en condiciones normales existe una distribución homogénea de TrkB tanto en los compartimientos somatodendrítico como en el axonal. En cambio, cuando se bloqueó la actividad de PKD1, el receptor se localizó principalmente en el soma neuronal y en la dendrita apical. Además, se continuó observando el efecto ya descrito en la polaridad de las ramificaciones dendríticas, las cuales disminuyeron significativamente su largo pero no así su número. Lo mismo fue observado en presencia del ligando específico BDNF para el receptor TrkB en condiciones permeabilizantes (Figura 17, Gráfico6).y no permeabilizantes (Figura 19), cuando se bloquea la actividad PKD1, la localización del receptor es somática y en la dendrita apical mayormente. En aquellas neuronas en las que se realizó inmunofluorescencia sin permeabilizar en las membranas (Figura 18, Gráfico 7), se observó una menor inserción de este receptor en la superficie celular, confirmando que los defectos observados en la distribución se reflejan directamente en el destino final del receptor.

Sobreexpresión de HA-TrkB con HcRed/shPKD1 en ausencia de BDNF



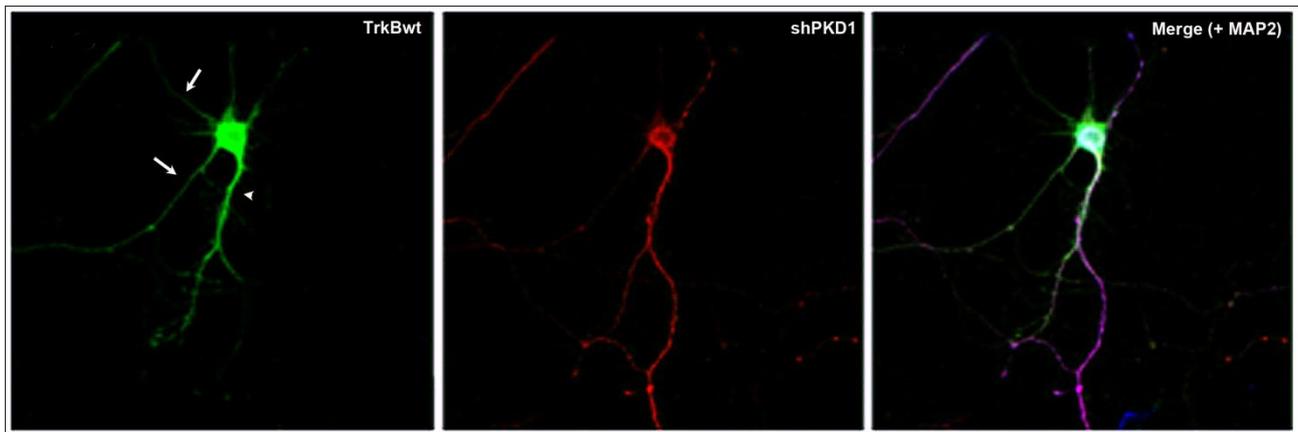


Figura 16. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB unido a HA en ausencia del ligando específico BDNF. En la parte superior se observa el control transfectado con la proteína roja fluorescente HcRed (rojo), la cual se distribuye por toda la neurona, al igual que TrkB (verde), que puede observarse localizado tanto en la región somato-dendrítica (cabezas de flecha) como axonal (flecha). En la parte inferior se ha cotransfectado el receptor neurotrófico con el *short-hairpin* ARN para PKD1 (shPKD1), observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos (cabezas de flecha), y una reducción notoria de la distribución de TrkB en toda la célula (flecha), a excepción de una gran acumulación del receptor en la dendrita apical y el soma neuronal (flechas con puntos). Como control de la distribución dendrítica se utiliza el anticuerpo frente a MAP2 (azul).

Sobreexpresión de HA-TrkB con HcRed/shPKD1 en ausencia de BDNF

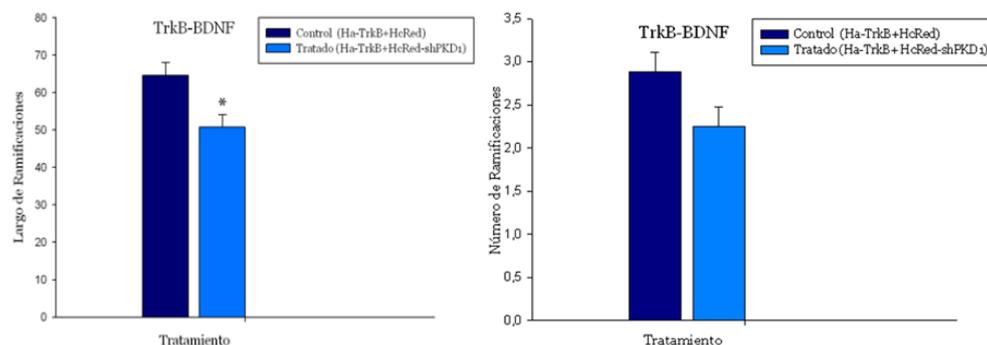


Gráfico 5. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (HcRed) y tratado (shPKD1) en ausencia del ligando BDNF en los grupos en donde se sobreexpresó HA-TrkB, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Sobreexpresión de HA-TrkB con HcRed/shPKD1 en presencia de BDNF

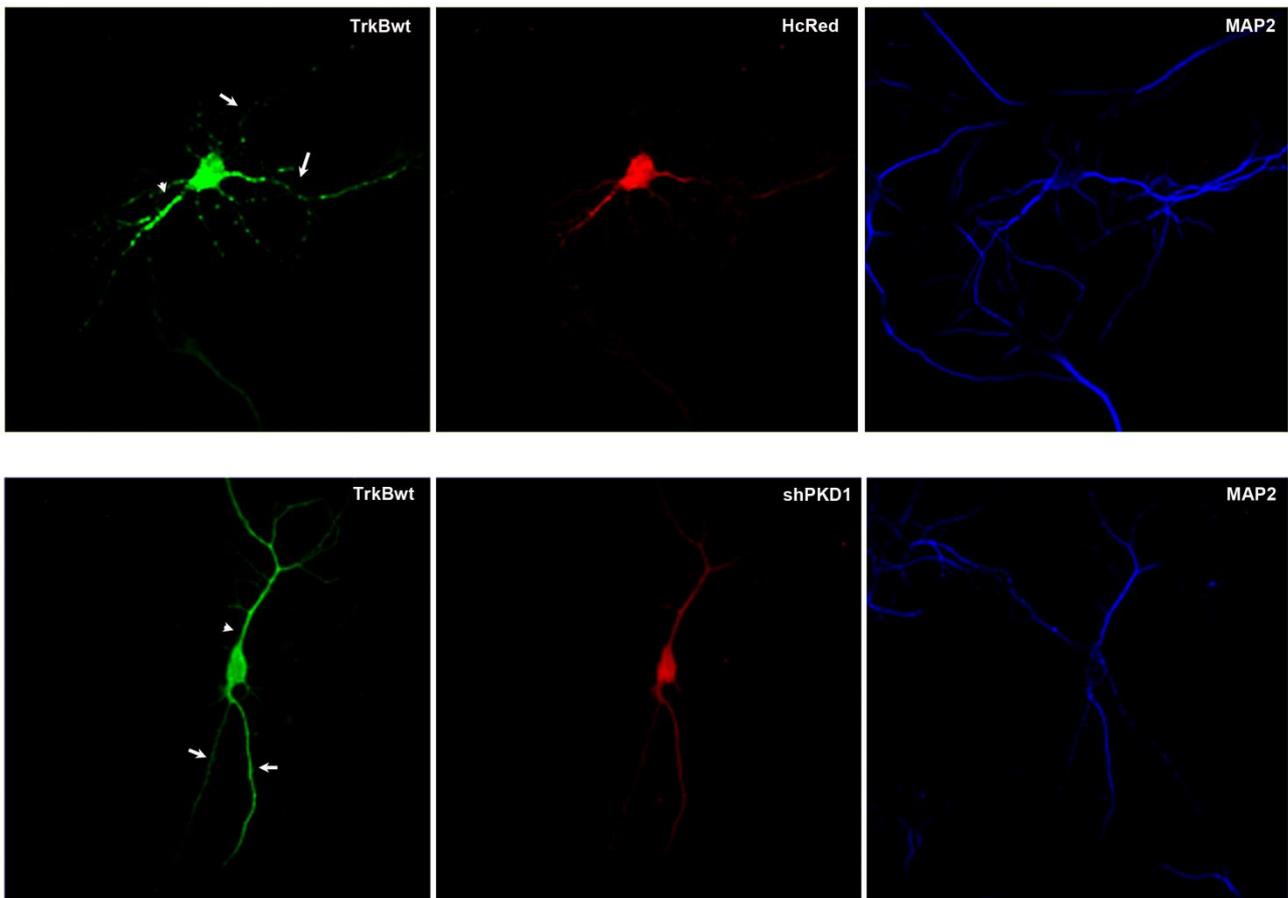


Figura 17. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB unido a HA en presencia del ligando específico BDNF. En la parte superior se observa el control transfectado con la proteína roja fluorescente **HcRed (rojo)**, la cual se distribuye por toda la neurona, al igual que TrkB (verde), que puede observarse localizado tanto en la región somato-dendrítica (cabezas de flecha) como axonal (flecha). En la parte inferior se ha co-transfectado el receptor neurotrófico con el *short-hairpin* ARN para PKD1 (**shPKD1**), observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos (cabezas de flecha), y una reducción notoria de la distribución de TrkB en toda la célula (flecha), a excepción de una gran acumulación del receptor en la dendrita apical y el soma neuronal (flechas con puntos). Como control de la distribución dendrítica se utiliza el anticuerpo frente a MAP2 (azul).

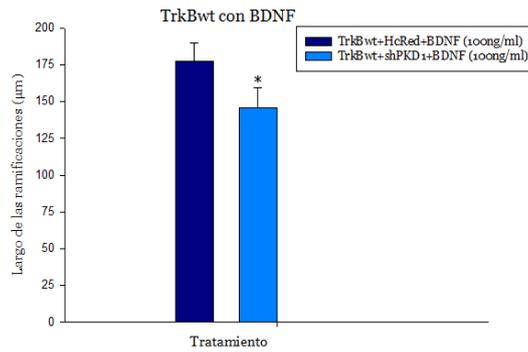


Gráfico 6. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (HcRed) y tratado (shPKD1) en ausencia del ligando BDNF en los grupos en donde se sobreexpresó HA-TrkB, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm). El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Sin Permeabilizar HA-TrkB con HcRed/shPKD1 sin BDNF

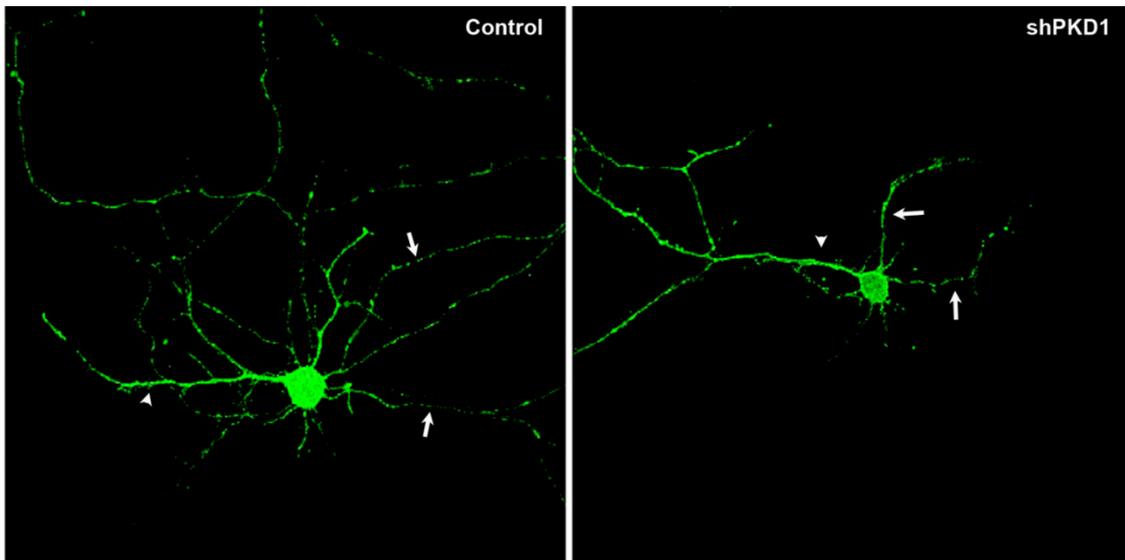


Figura 18. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB unido a HA sin permeabilizar en ausencia del ligando específico BDNF. Hacia la izquierda se observa el control transfectado con la proteína roja fluorescente **HcRed**, la cual se distribuye por toda la neurona, al igual que **HA-TrkB** (verde), que puede observarse localizado tanto en la membrana de la dendrita apical (cabezas de flecha) como en las otras dendritas (flecha). En el lado derecho se ha co-transfectado el receptor neurotrófico con el *short-hairpin* ARN para PKD1 (**shPKD1**), observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos (flechas), y una reducción

notoria de la distribución de HA-TrkB en la membrana plasmática de toda la célula, a excepción de una gran acumulación del receptor en la membrana de la dendrita apical (cabeza de flecha).

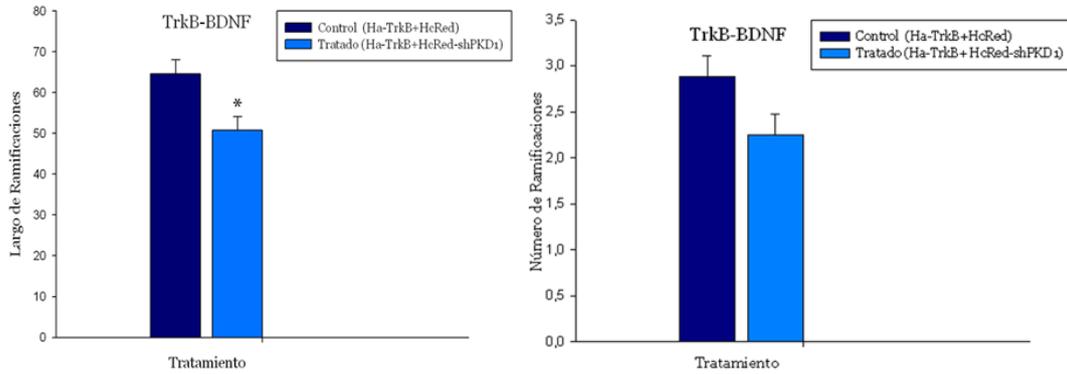
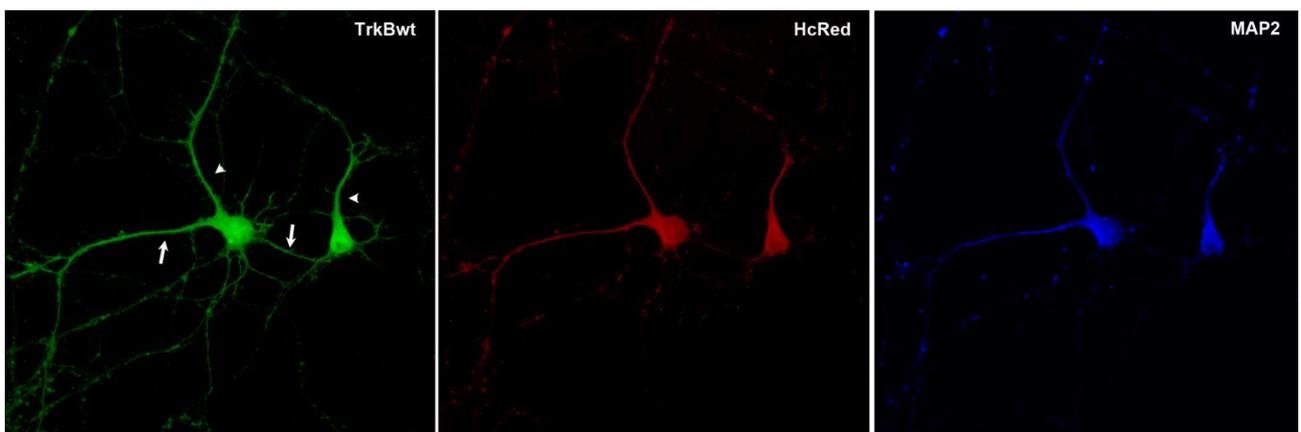


Gráfico 7. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (HcRed) y tratado (shPKD1) en ausencia del ligando BDNF en los grupos en donde se sobreexpresó HA-TrkB sin permeabilizar, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Sin Permeabilizar HA-TrkB con HcRed/shPKD1 con BDNF



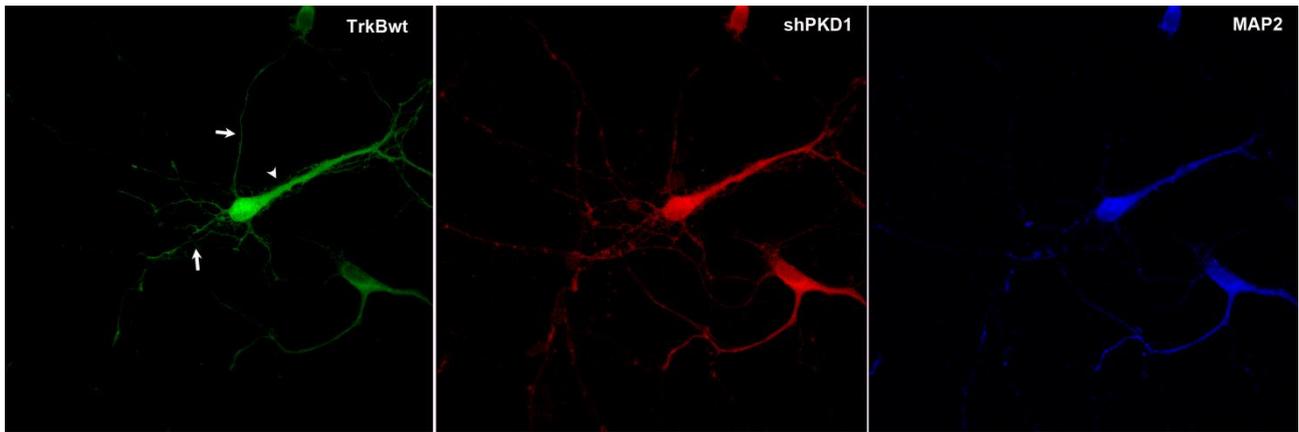


Figura 19. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB unido a HA sin permeabilizar en presencia del ligando específico BDNF. En la figura superior se observa el control transfectado con la proteína roja fluorescente **HcRed (rojo)**, la cual se distribuye por toda la neurona, al igual que **HA-TrkB (verde)**, que puede observarse localizado tanto en la membrana de la dendrita apical (cabezas de flecha) como en las otras dendritas (flecha). En la figura inferior se ha cotransfectado el receptor neurotrófico con el *short-hairpin* ARN para PKD1 (**shPKD1, rojo**), observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos (flechas), y una reducción notoria de la distribución de HA-TrkB en la membrana plasmática de toda la célula, a excepción de una gran acumulación del receptor en la membrana de la dendrita apical (cabezas de flecha).

Silenciamiento de PKD1 y co-transfección con mutante HA-TrkBkd

Cuando se efectuó el experimento de silenciamiento de PKD1 cotransfectando con la forma quinasa inactiva del receptor TrkB (HA-TrkBkd) y se comparó con la forma salvaje del mismo, en condiciones permeabilizantes (Figura 20, Gráfico8) y no permeabilizantes (Figura 21) los resultados en cuanto a distribución no variaron para ninguna de las dos variantes, indicando que la localización de este receptor no dependería de su actividad quinasa intrínseca, al menos en lo que respecta a la vía de señalización en la que participa la PKD1.

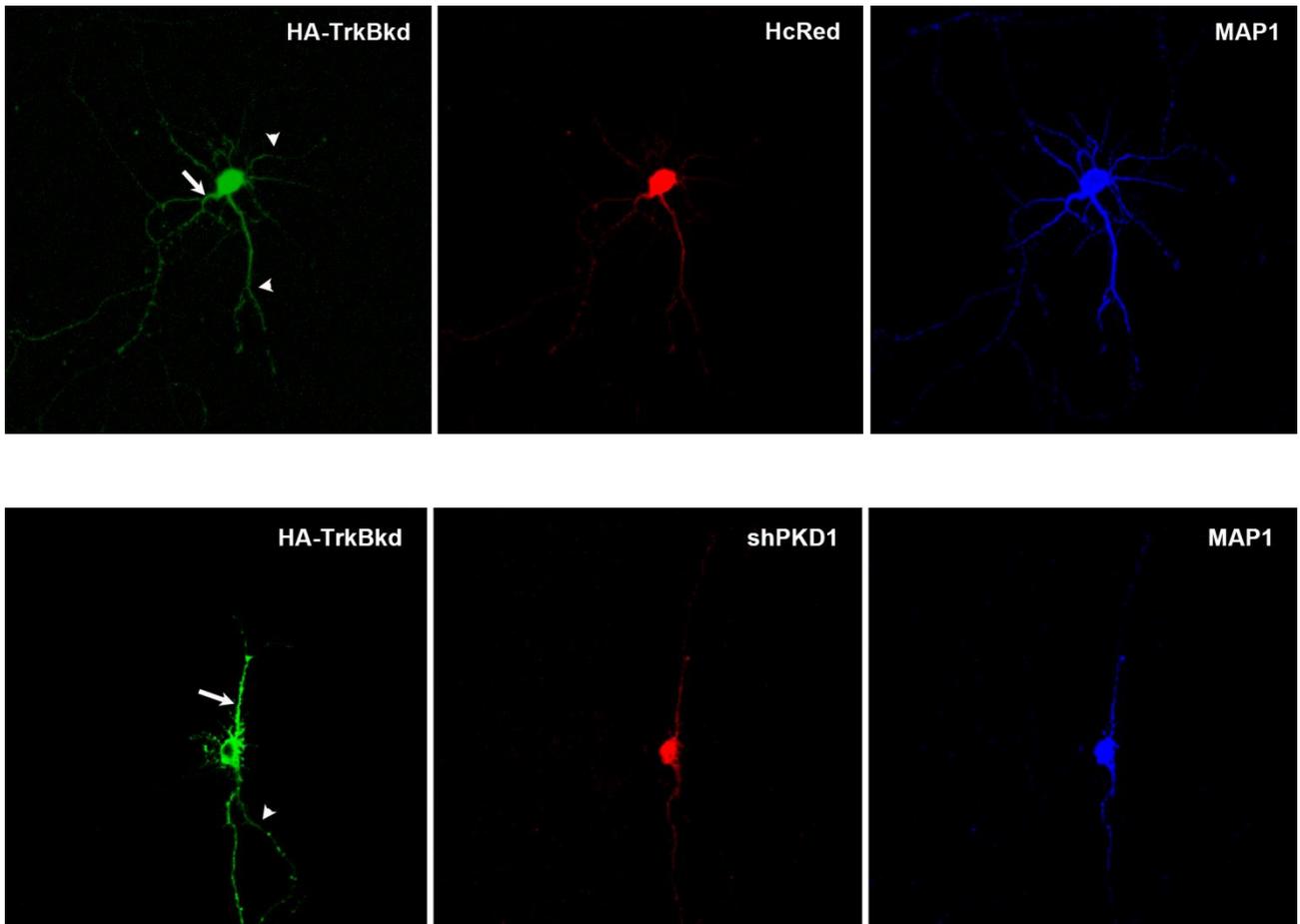


Figura 20. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB mutante en sitio de unión a ATP (TrkBkd) unido a HA en condiciones permeabilizantes y en presencia del ligando específico BDNF.

En la figura superior se observa el control transfectado con la proteína roja fluorescente **HcRed (rojo)**, la cual se distribuye por toda la neurona, al igual que **HA-TrkBkd (verde)**, que puede observarse localizado tanto en la membrana de la dendrita apical (flecha) como en las otras dendritas (cabezas de flecha). En la figura inferior se ha co-transfectado el receptor neurotrófico con el *short-hairpin* ARN para PKD1 (**shPKD1, rojo**), observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos (cabeza de flecha), y una reducción notoria de la distribución de HA-TrkBkd en la membrana plasmática de toda la célula, a excepción de una gran acumulación del receptor en la membrana de la dendrita apical (flecha). Como control del árbol dendrítico hemos utilizado anticuerpo primario frente a MAP2 (azul).

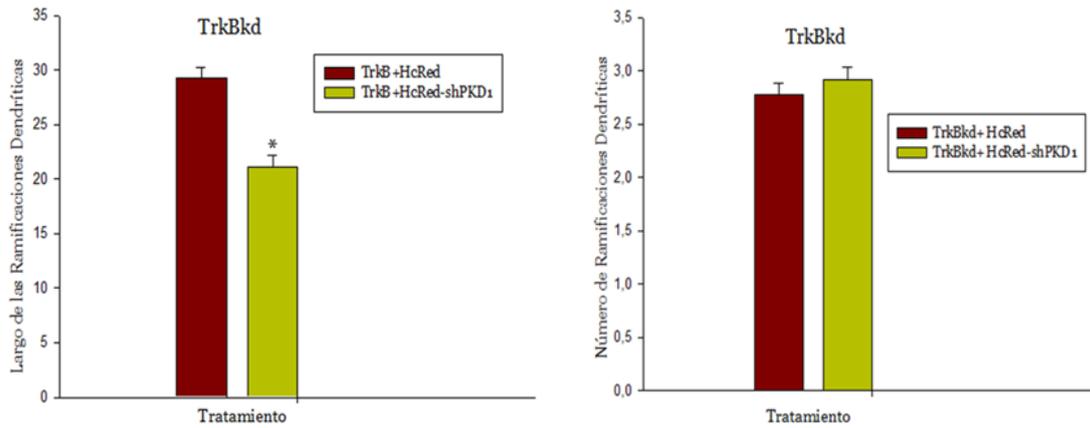
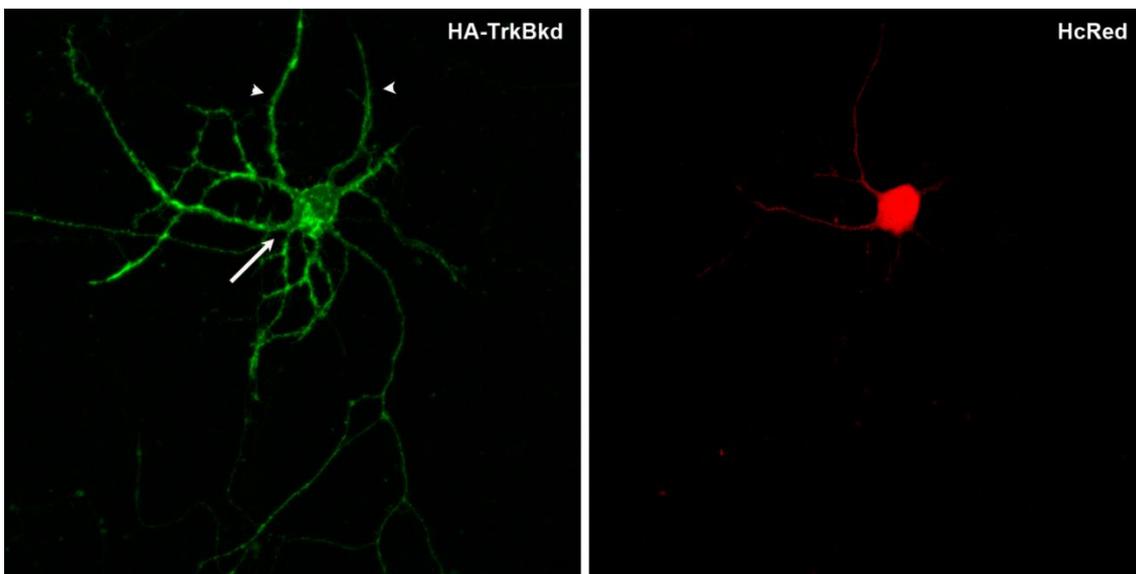


Gráfico 8. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (HcRed) y tratado (shPKD1) en ausencia del ligando BDNF en los grupos en donde se sobreexpresó HA-TrkBkd (mutante en sitio de unión a ATP) en condiciones permeabilizantes, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Sobreexpresión de HA-TrkBkd con HcRed/shPKD1 en ausencia de BDNF en condiciones no permeabilizantes



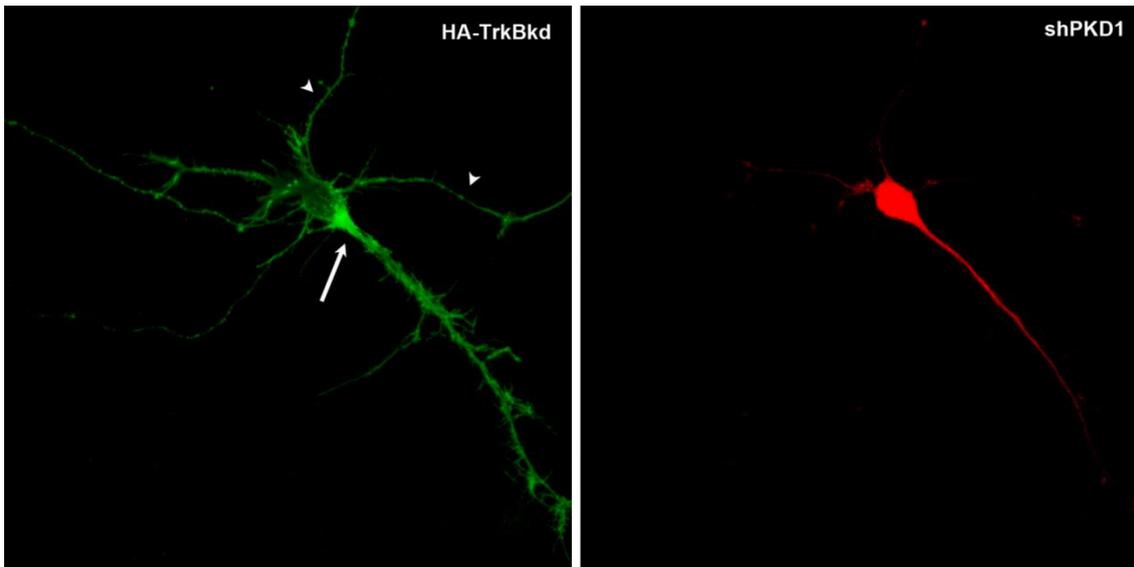


Figura 21. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB mutante en sitio de unión a ATP (TrkBkd) unido a HA en condiciones no permeabilizantes y en presencia del ligando específico BDNF. En la figura superior se observa el control transfectado con la proteína roja fluorescente **HcRed (rojo)**, la cual se distribuye por toda la neurona, al igual que **HA-TrkBkd (verde)**, que puede observarse localizado tanto en la membrana de la dendrita apical (flecha) como en las otras dendritas (cabezas de flecha). En la figura inferior se ha co-transfectado el receptor neurotrófico con el *short-hairpin* ARN para PKD1 (**shPKD1, rojo**), observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos (cabeza de flecha), y una reducción notoria de la distribución de HA-TrkBkd en la membrana plasmática de toda la célula, a excepción de una gran acumulación del receptor en la membrana de la dendrita apical (flecha).

Conclusiones Objetivo específico I

1. El bloqueo de la actividad de PKD1 alteró el transporte y/o la normal distribución de los receptores para neurotrofinas. Esto se observó tanto en presencia como en ausencia de los ligandos específicos.
2. En presencia de la dominante negativa de PKD1 o del shPKD1, el receptor TrkA se acumuló en la región trans del aparato de Golgi, lo cual pudo ser corroborado mediante su colocalización con la proteína residente del TGN SialT2. En estas condiciones, la respuesta de las neuronas al

ligando específico NGF se vio afectada de manera notoria.

3. La distribución del receptor TrkB en ausencia de la actividad de PKD1 mostró cambios notorios, ya que pasó de localizarse somatodendríticamente a hacerlo principalmente en el compartimento somático y en la dendrita apical.
4. El estudio de la expresión de las mutantes TrkAca (constitutivamente activa) y TrkBkd (dominante negativa) sugiere fuertemente que el transporte de TrkA y la distribución de TrkB mediados por PKD1 serían independientes de la actividad quinasa intrínseca de ambos receptores.

Objetivo específico II

Determinar si en células polarizadas otros componentes de la vía de señalización que estudiamos, como proteínas quinasa C noveles y fosfolipasas C del tipo β , se encuentran involucrados en la regulación mediada por PKD1 del transporte de TrkA y Trk B.

Para evaluar la participación de las proteínas de la vía de activación de PKD1, utilizamos inhibidores farmacológicos específicos, tanto para las PKCs como para las PLC β , así como formas mutantes de algunas proteínas quinasas de la familia de las PKCs.

En el primer caso, llevamos a cabo experimentos de transfección de los receptores en estudio (GFP-TrkAWT y HA-TrkBWT) con lipofectamina. Al finalizar la transfección, y en el momento de cambiar el medio y agregar el N2-Neurobasal, añadimos diferentes inhibidores específicos de PKCs, Gö6983 y Gö6976, y un bloqueante de la actividad de las PI-PLCs, el U73122 (ver diagrama de acción de estos inhibidores en el Gráfico 9).

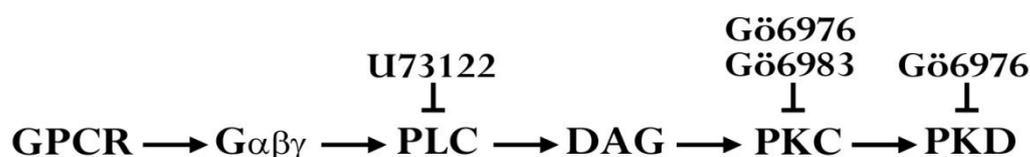


Gráfico 9. Representación de la acción de los inhibidores utilizados sobre los componentes de la vía reguladora del transporte mediada por PKD1.

En el caso del Gö6983, (2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-5-methoxyindol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl) maleimide), se trata de un potente inhibidor de PKCs que no es capaz de bloquear a la PKD1. Este inhibidor es reversible y permeable, y ejerce su acción a través de la competencia con el ATP disponible para las quinasas. Junto con el Gö6976 (12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole) suele utilizarse para diferenciar la acción de PKD1 de la de las PKC en diferentes vías de señalización, ya que este último además de bloquear la actividad de varias isoformas específicas de las PKCs, puede también inhibir a la PKD1 en altas concentraciones.

El U73122 (1-[6-((17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione), inhibe la activación de las PI-PLCs, en particular las PLC β , inducida por agonista.

Resultados: Receptor TrkA

Cuando los inhibidores farmacológicos fueron incubados por 24 horas en neuronas que sobre-expresaban a los receptores estudiados, se observó una disminución en el largo y número de las ramificaciones dendríticas estadísticamente significativo con Gö6983, mientras que con Gö6976 y U73122 sólo disminuyó el largo de las dendritas de manera significativa, no así su número.

El uso del inhibidor Gö6983 (Figura 22, Gráfico 10) estaría inhibiendo las PKCs noveles no así a PKD1, reproduciendo la reducción morfológica del árbol dendrítico neuronal (largo y número) y la acumulación en el compartimiento somático del receptor TrkA en estudio, tal cual fuera demostrado en los resultados anteriormente expuestos en el objetivo I con la versión salvaje del receptor en ausencia del ligando NGF específico. Esto nos estaría indicando la participación de las PKC noveles en la vía de transducción en la que participan los receptores TrkA y PKD1.

En el caso de Gö6976 (Figura 23, Gráfico 11) y U73122 (Figura 24, Gráfico 12), el receptor TrkA también mostró retención en el compartimiento somático, observándose la esperada retracción

en el largo de los procesos dendríticos de las neuronas de 7DIV estudiadas. Estos resultados confirmarían la participación de PKD1, y posiblemente otras PKCs, y de las PLCβs en la vía que regula el transporte de TrkA desde el TGN hacia la superficie de los procesos neuronales.

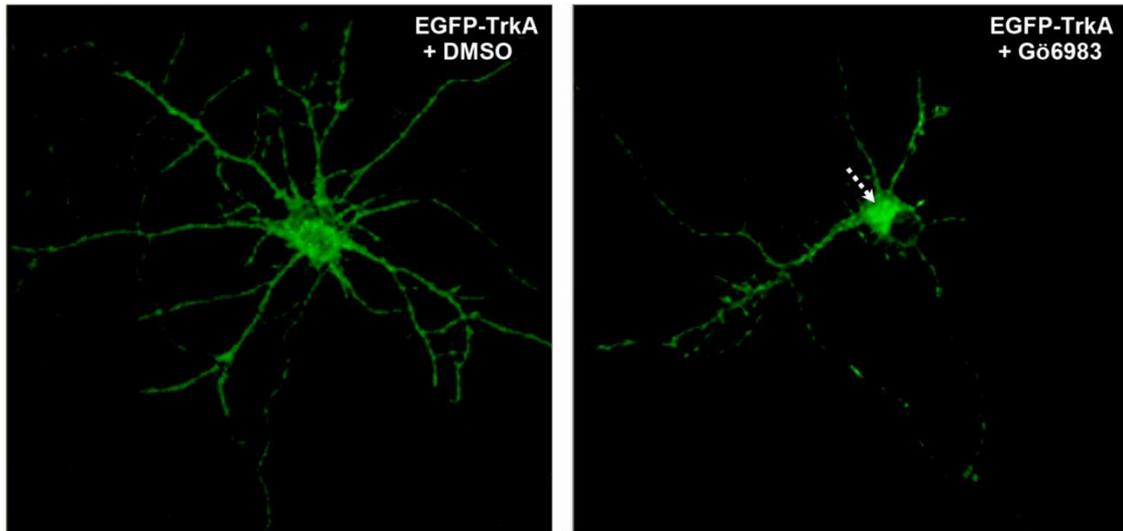


Figura 22. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkA en ausencia del ligando específico NGF y en presencia del inhibidor Gö6983. En la figura izquierda se observa el control transfectado con **EGFP-TrkA (verde)**, que se encuentra localizado tanto en el compartimiento somato-dendrítico como en el axonal con el agregado de DMSO como control al finalizar la transfección. En la figura derecha se ha transfectado el receptor EGFP-TrkA, incubándose luego a las neuronas con el inhibidor Gö6983, observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos, y una reducción notoria de la distribución de EGFP-TrkA en toda la célula, a excepción de una gran acumulación del receptor en el compartimiento somático (flecha punteada).

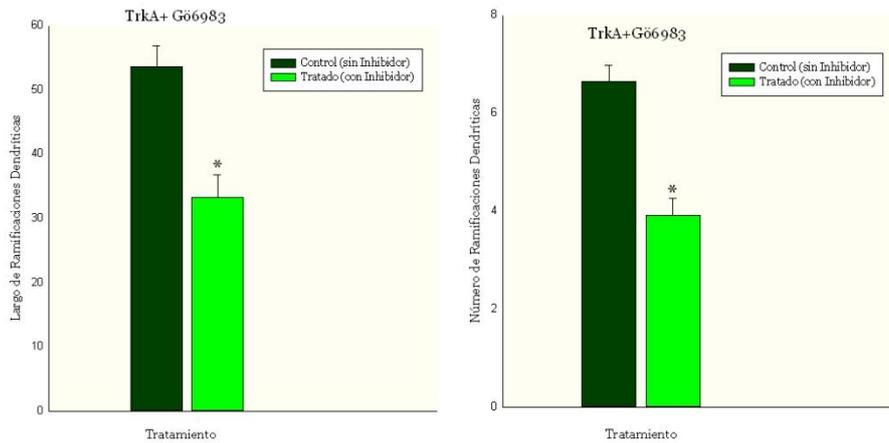


Gráfico 10. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (con DMSO) y tratado (Gö6983) en ausencia del ligando NGF en los grupos en donde se sobreexpresó EGFP-TrkA, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades.

El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

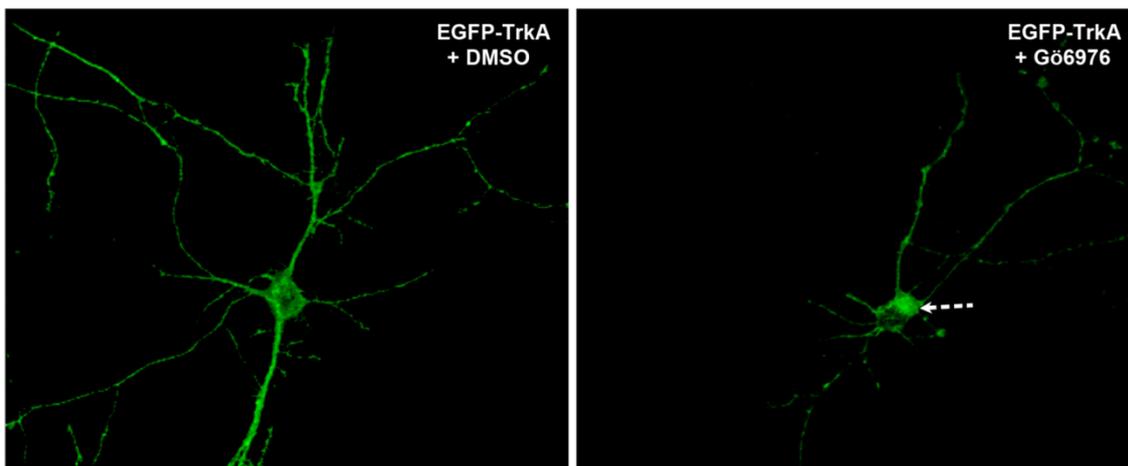


Figura 23. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkA en ausencia del ligando específico NGF y en presencia del inhibidor Gö6976. En la figura izquierda se observa el control transfectado con EGFP-TrkA (verde), que se encuentra localizado tanto en el compartimiento somato-dendrítico como en el axonal con el agregado de DMSO como control al finalizar la transfección. En la figura derecha se ha transfectado el receptor EGFP-TrkA, incubándose luego a las neuronas con el inhibidor Gö6976, observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos, y una reducción notoria de la distribución de EGFP-TrkA en toda la célula, a excepción de una gran acumulación del receptor en el compartimiento somático (flecha punteada).

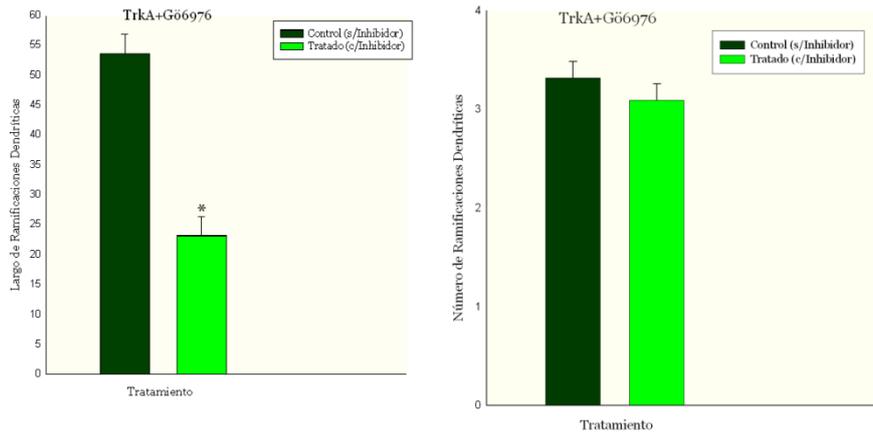


Gráfico 11. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (con DMSO) y tratado (G66976) en ausencia del ligando NGF en los grupos en donde se sobreexpresó EGFP-TrkA, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades.

El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

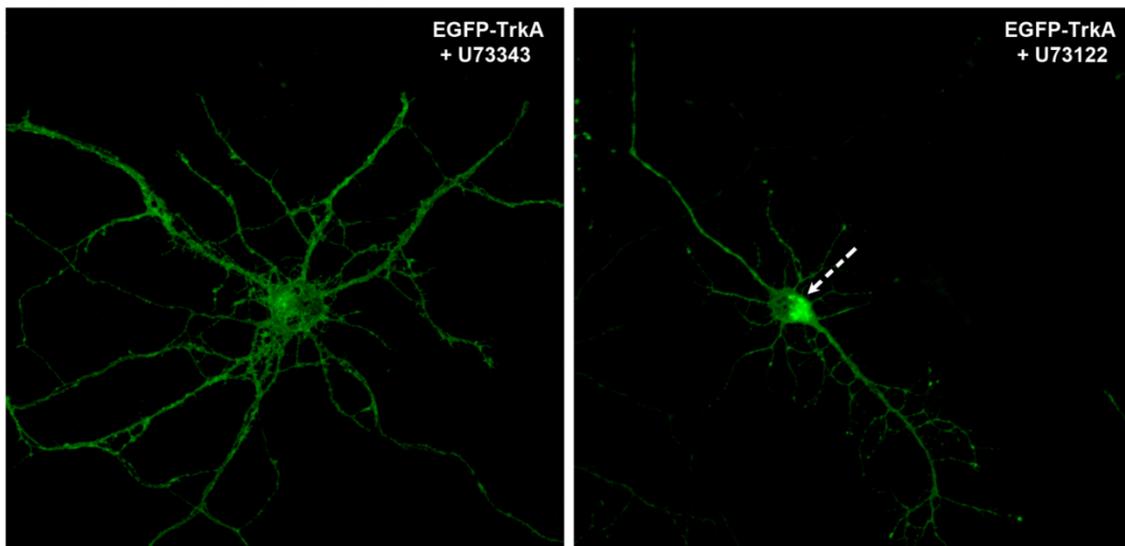


Figura 24. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkA en ausencia del ligando específico NGF y en presencia del inhibidor U73122. En la figura izquierda se observa el control transfectado con EGFP-TrkA (verde), que se encuentra localizado tanto en el compartimento somato-dendrítico como en el axonal con el agregado de DMSO como control al finalizar la transfección. En la figura derecha se ha transfectado el receptor EGFP-TrkA, incubándose luego a las neuronas con con el inhibidor U73122, observándose disminución en el número y tamaño de los procesos dendríticos, y una reducción notoria de la distribución de EGFP-TrkA en toda la célula, a excepción de una gran acumulación del receptor en el compartimento somático (flecha punteada).

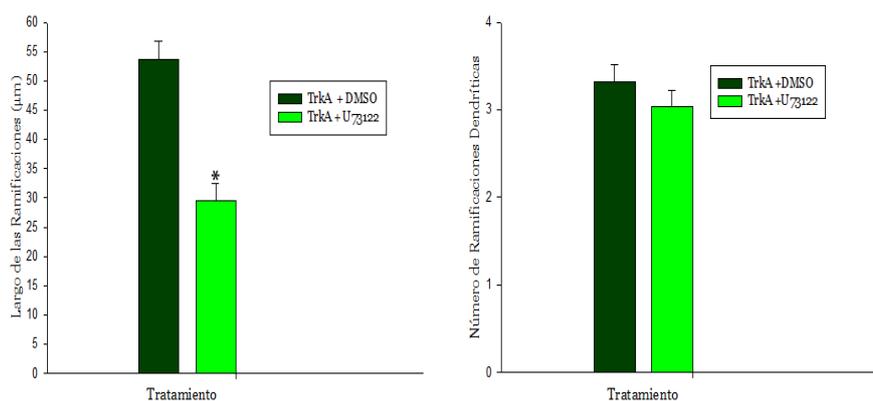


Gráfico 12. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (con DMSO) y tratado (U73122) en ausencia del ligando NGF en los grupos en donde se sobreexpresó EGFP-TrkA, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades.

El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Debido a la especificidad de los dos inhibidores de PKC (ver Materiales y Métodos), y a través de una colaboración iniciada con la Dra. Alexandra Newton (Universidad de California San Diego), una de las máximas autoridades en el estudio de estas quinasas, decidimos indagar si una de las PKCs candidatas para activar PKD1, la convencional α , podría estar participando en la regulación del tráfico de TrkA, ya que la actividad de esta quinasa es fuertemente bloqueada por los inhibidores utilizados y es uno de los pocos miembros de esta familia que puede traslocarse al aparato de Golgi. Para ello, se realizaron experimentos de co-transfección del EGFP-TrkAWT con las formas salvaje (wt) y quinasa inactiva (kd) de PKC α (controles Figura 25), las cuales fueron generosamente cedidas por la Dra. Newton.

La elección de esta isoforma para llevar a cabo nuestros experimentos se encuentra directamente relacionada con un trabajo publicado por el grupo de la Dra. Newton (2013), en donde se demostró que las isoenzimas convencionales de PKC para ser activadas precisan que el dominio C2 sea reclutado a membranas, lo cual se logra a través de la unión directa del dominio C1 al DAG, resultando esto en la activación final de la PKC. Este grupo exploró el mecanismo molecular por el

cual el dominio C2 controla el paso inicial de la activación de PKC. Para ello, a través de la medición por espectroscopía de fluorescencia de las constantes de radios de asociación y disociación, demostraron que las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas mayores para la unión del dominio C2 a las membranas aniónicas, mientras que las interacciones electrostáticas dominan la retención en membrana. Al realizar mutaciones específicas en los residuos hidrofóbicos o básicos del dominio de unión a Ca^{2+} se redujo la afinidad de la membrana por distintos mecanismos, mientras que en los residuos hidrofóbicos alteró los radios de las constantes de asociación. Por otro lado, la mutación en los residuos cargados alteró las constantes de disociación. Esto vía *live cell imaging* indicaría que no solo se reduciría la translocación en membrana dependiente de Ca^{2+} , sino que también la membrana dejaría de sensar al dominio C2, causando que los ésteres de forbol redistribuyan a la PKC hacia otras membranas, como las del aparato de Golgi. Estos datos demostrarían la importancia de los dominios C2 para conducir a las isoenzimas de PKC hacia la membrana plasmática, y revelarían que no solo la amplitud sino también la localización subcelular de las PKC convencionales podrían ser alteradas al modificar la afinidad de los módulos de membrana (Gráfico 14).

A raíz del cambio en la localización subcelular que fuera observado por el grupo de la Dra. Newton con estas formas mutantes de $\text{PKC}\alpha$, las cuales pierden su localización en membrana plasmática para reubicarse en el aparato de Golgi, es que nos propusimos explorar la relación entre $\text{PKC}\alpha$ y PKD1 en la vía de regulación del transporte del receptor TrkA , ya que durante el bloqueo de esta vía de señalización pudimos demostrar que se producía una retención del tráfico de este receptor en el Golgi, tanto en presencia como en ausencia de su ligando específico.

Cuando se analizó el largo y el número de las ramificaciones dendríticas al co-transfectar $\text{HA-PKC}\alpha_{\text{wt}}$ y/o kd con el receptor TrkA acoplado a GFP, pudimos observar una disminución estadísticamente significativa en el grupo que fue co-transfectado con la $\text{PKC}\alpha_{\text{kd}}$, la cual fue de alrededor del 50-60% en el largo de las ramificaciones y del 80% para su número.

Por otro lado, pudo observarse la retención de TrkA en el aparato de Golgi, que es característica del bloqueo de la vía de señalización dependiente de PKD1 , cuando se expresó la

versión dominante negativa de PKC α (kd), no así cuando se transfectó con su versión salvaje (wt) (Figura 26).

Teniendo en cuenta que esta quinasa es un efector cascada arriba de PKD1, todas estas observaciones nos estarían confirmando la participación de esta quinasa en la vía de regulación del transporte de TrkA mediada por PKD1 en neuronas.

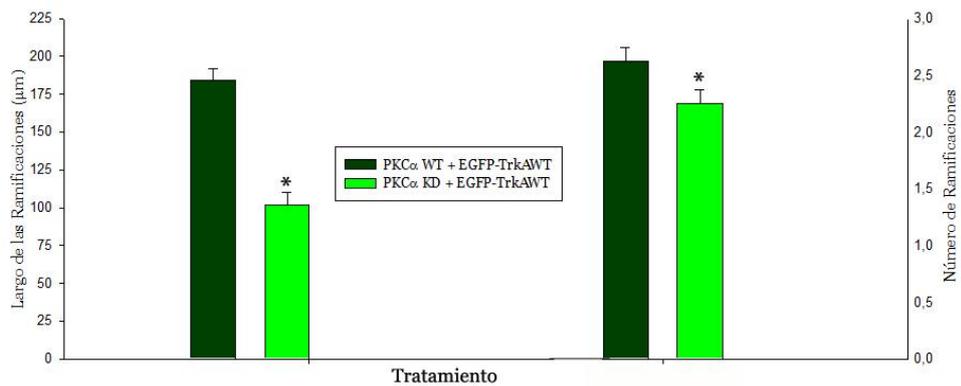


Gráfico 13. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en el grupo control (HA-PKC α wt) y tratado (HA-PKC α kd) en ausencia del ligando NGF en los grupos en donde se sobreexpresó EGFP-TrkAwt, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

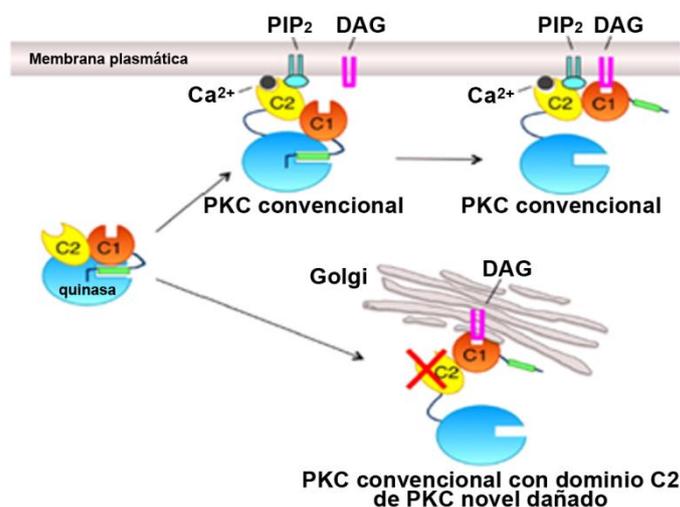


Gráfico 14. Figura tomada de Scott *et al.* 2013 en donde se demuestra que al realizar mutaciones específicas en los residuos hidrofóbicos o básicos del dominio de unión a Ca^{2+} se redujo la afinidad de la membrana. Esto indicaría que no solo se reduciría la translocación en membrana dependiente de Ca^{2+} , sino que también la membrana dejaría de sensar al dominio C2, causando que los ésteres de forbol redistribuyan a la PKC hacia otras membranas, como la del aparato de Golgi. Estos datos demostrarían la importancia de los dominios C2 para conducir a las isoenzimas de PKC hacia la membrana plasmática, y revelarían que no solo la amplitud sino también la localización subcelular de las PKC convencionales podrían ser alteradas al modificar la afinidad de los módulos de membrana.

Sobreexpresión de PKC α en neuronas

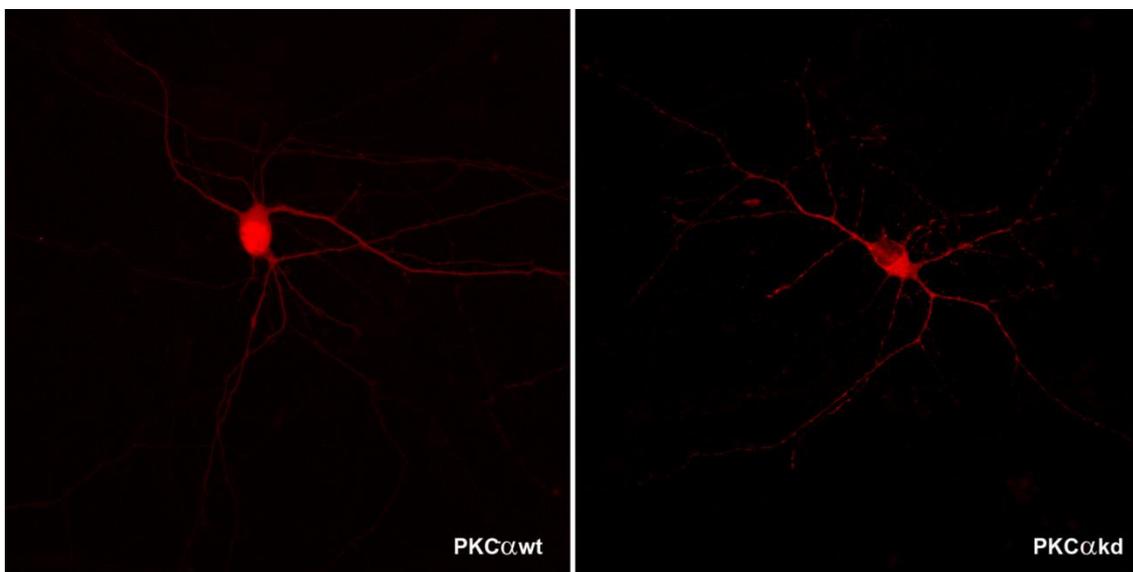


Figura 25. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con la proteína quinasa C α (PKC α) fusionada al tag HA- tanto en la versión salvaje como quinasa inactiva. En la figura izquierda se observa el control transfectado con HA-PKC α wt (rojo), que se encuentra localizado tanto en el compartimiento somato-dendrítico como en el axonal. En la figura derecha se ha transfectado HA- PKC α kd control, mostrando la localización de esta mutantes en neuronas.

Co- transfección del receptor TrkA con PKC α wt/kden ausencia de ligando

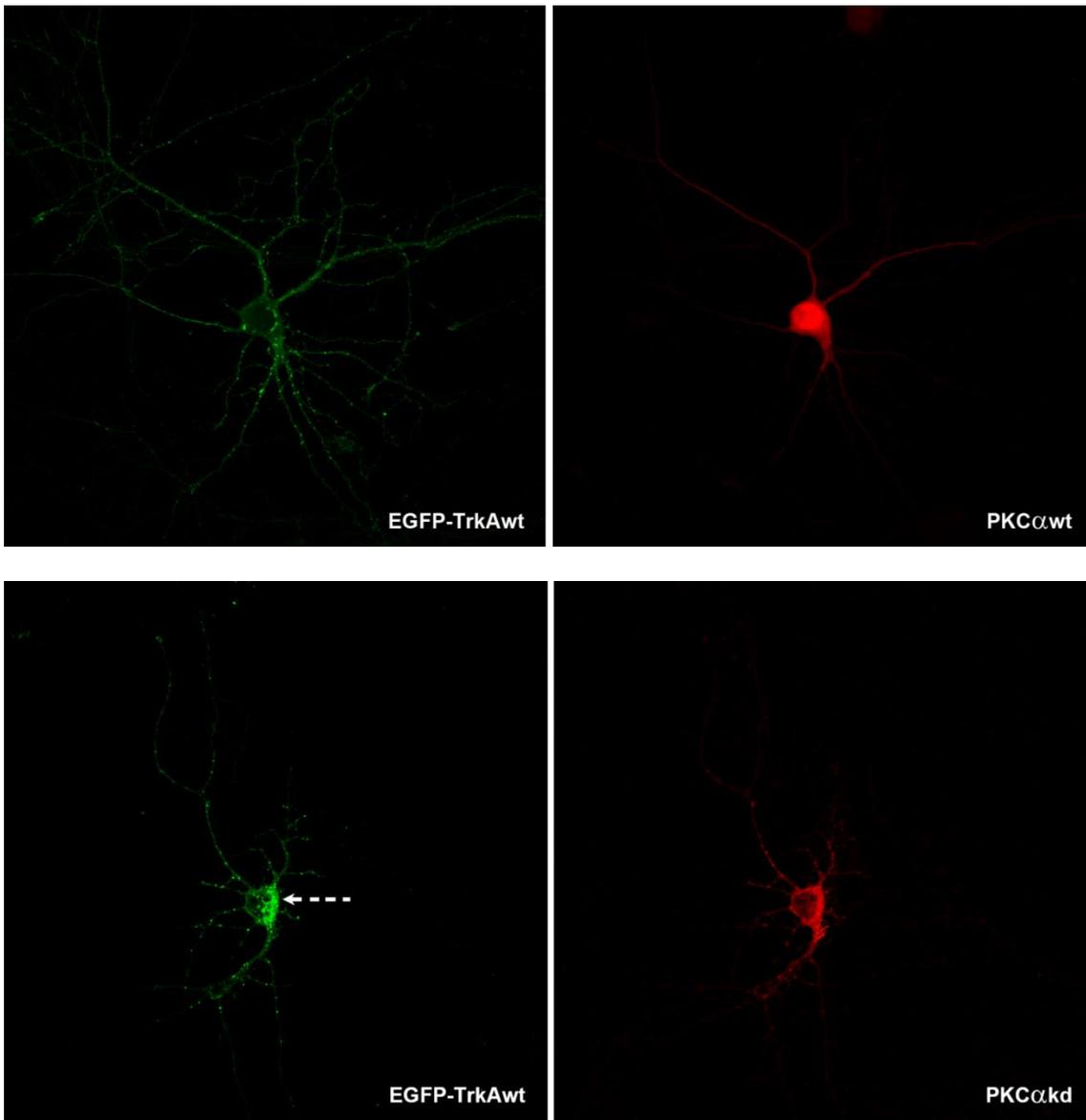


Figura 26. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV co-transfectadas con la proteína quinasa C α (PKC α) fusionada al tag HA- tanto en la versión salvaje como quinasa inactiva y el receptor TrkA. En la parte superior se observa al receptor EGFP-TrkA (verde) transfectado con HA-PKC α wt (rojo), que se encuentra localizado tanto en el compartimiento somato-dendrítico como en el axonal. En la parte inferior se ha cotransfectado el receptor EGFP-TrkA (verde) con el mutante quinasa inactivo HA- PKC α kd (rojo). En este caso, al igual que lo observado con la ausencia de una PKD1 activa, el receptor se encuentra disminuido en el árbol dendrítico y acumulado en el soma neuronal (flecha punteada). Al ser PKC α una quinasa que se ubica cascada arriba en la vía de señalización de PKD1, esto nos estaría demostrando que la misma participaría en la vía en estudio.

Resultados: Receptor TrkB

En los experimentos que fueron realizados luego de transfectar PKD1 con el receptor HA-TrkBwt en presencia de los inhibidores farmacológicos, se pudo determinar que en el caso de aquellas neuronas hipocampales en cultivo tratadas con Gö6976 (Figura 27, Gráfico16) y U73122 (Figura 29, Gráfico 18) disminuyeron su largo dendrítico en un 30% aproximadamente y conservaron el patrón de localización somático y apical, mientras que con Gö6983 (Figura 28, Gráfico 17), la disminución del largo dendrítico se acentuó aún más hasta alrededor del 40%. Si tenemos en cuenta las diferencias de especificidad de ambos inhibidores de quinasas, y que Gö6983 no es capaz de bloquear PKD1, estos resultados podrían indicar la intervención de más de una isoforma PKC cascada arriba de PKD1 en la vía de señalización que regula la localización de TrkB. Lo descripto en estos resultados se expone en el Gráfico 15 a continuación:

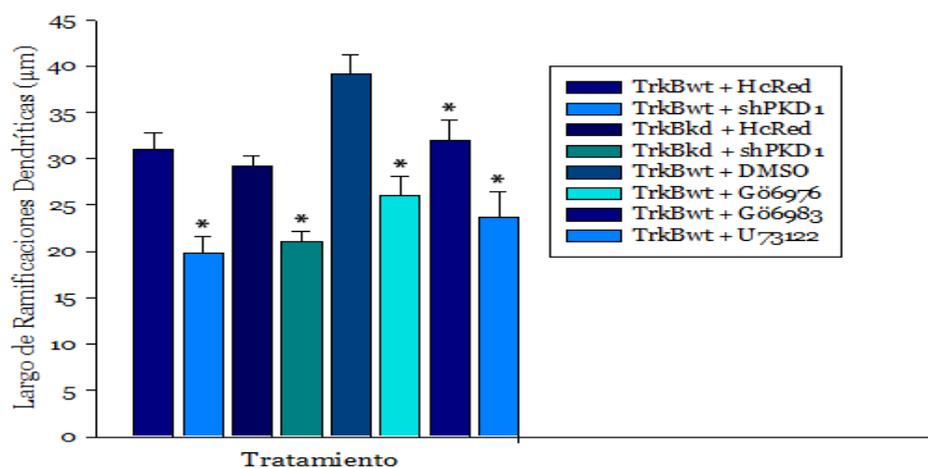


Gráfico 15. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en los grupos control (HcRed o DMSO) y tratado (shPKD1/Gö6976/Gö6983/U73122) en ausencia del ligando BDNF al sobreexpresar el receptor TrkB en sus variantes wt/kd, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Con miras a seguir indagando la participación de algunas isoformas de PKC en el tráfico y distribución de los receptores de neurotrofinas, se escogió realizar experimentos con la proteína quinasa $C\epsilon$ (PKC ϵ) dado que es activada por DAG y los ácidos grasos, participa en el crecimiento neurítico, apoptosis, movilidad y adhesión, tiene un rol neuroprotector frente al Alzheimer. (Akita

2002). Además ha sido demostrado que esta quinasa puede activar PKD1 (Rey *et al.* 2004) y, al igual que otros miembros de la subfamilia de las PKC noveles como δ y η , es capaz de traslocarse al aparato de Golgi (Peterson y Stamnes 2013).

Por otro lado, se ha demostrado que esta isoforma tendría en la neurodegeneración como uno de sus substratos cascada abajo al BDNF, que lleva a la reducción neuronal patológica que acompaña a la enfermedad de Alzheimer, en donde se ha observado que se reduce la expresión de las isoenzimas PKC ϵ y PKC α a la vez que se produce el aumento de la proteína soluble amiloide β en ratones transgénicos Tg2576AD, uno de los modelos animales más utilizados de la enfermedad familiar de Alzheimer. El tratamiento con briostatina, un potente activador de las PKCs que está siendo considerado como terapia contra el Alzheimer, mostró el restablecimiento de los niveles normales de estas PKCs acompañado por una reducción en el nivel de A β soluble, evitando o revirtiendo la pérdida de sinapsis hipocampales y la deficiencia de la memoria que habían sido observadas cinco meses después del parto en esta cepa de ratones (Hongpaisan *et al.*, 2011).

Expresión de TrkBwt y tratamiento con los diferentes inhibidores de los efectores de la vía de PKD1

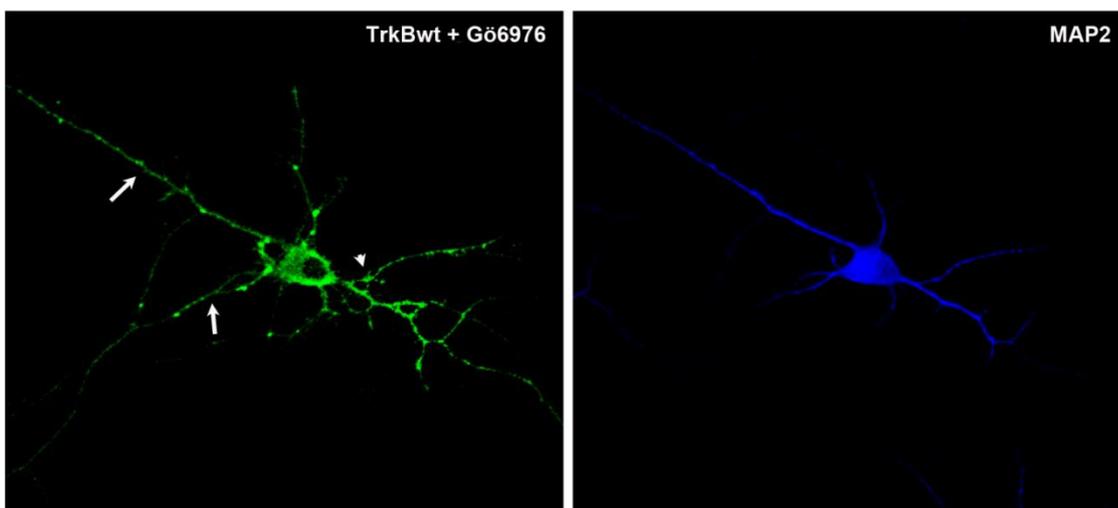


Figura 27. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB en ausencia del ligando específico BDNF y en presencia del inhibidor Gö6976. En la figura de la izquierda se observa el grupo transfectado con HA-TrkB (verde) luego de la incubación con Gö6976, en donde puede observarse al receptor localizado en las dendritas (flechas), principalmente en la apical (cabeza de flecha), En la figura de la derecha se muestra la

immunofluorescencia frente a la proteína **MAP2 (azul)** como control de las arborizaciones dendríticas.

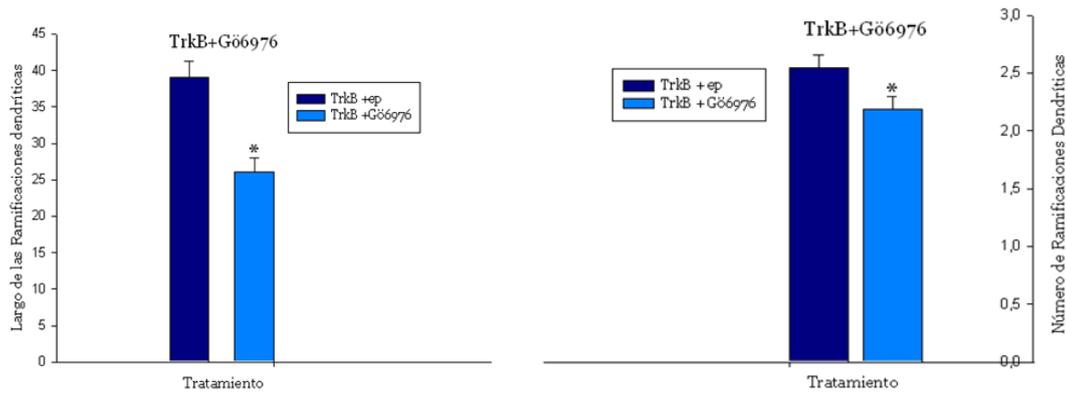


Gráfico 16. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en los grupos control (DMSO) y tratado (Gö6976) en ausencia del ligando BDNF al sobreexpresar el receptor TrkB, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

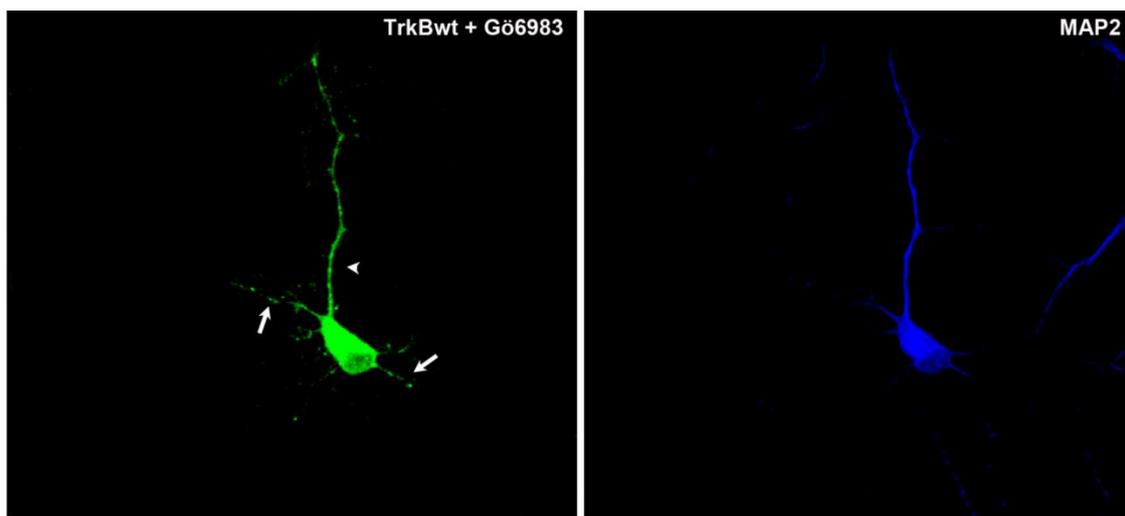


Figura 28. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB en ausencia del ligando específico BDNF y en presencia del inhibidor Gö6983. En la figura de la izquierda se observa el grupo transfectado con HA-TrkB (verde) luego de la incubación con Gö6983, en donde puede observarse al receptor localizado en las dendritas (flechas), principalmente en la apical (cabeza de flecha) y una marcada retracción del árbol dendrítico. En la

figura de la derecha se muestra la inmunofluorescencia frente a la proteína **MAP2 (azul)** como control de las arborizaciones dendríticas.

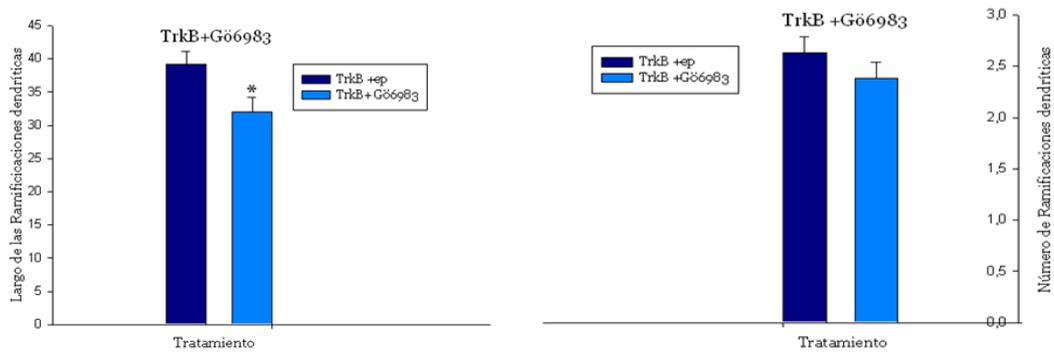


Gráfico 17. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en los grupos control (DMSO) y tratado (Gö6983) en ausencia del ligando BDNF al sobreexpresar el receptor TrkB, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

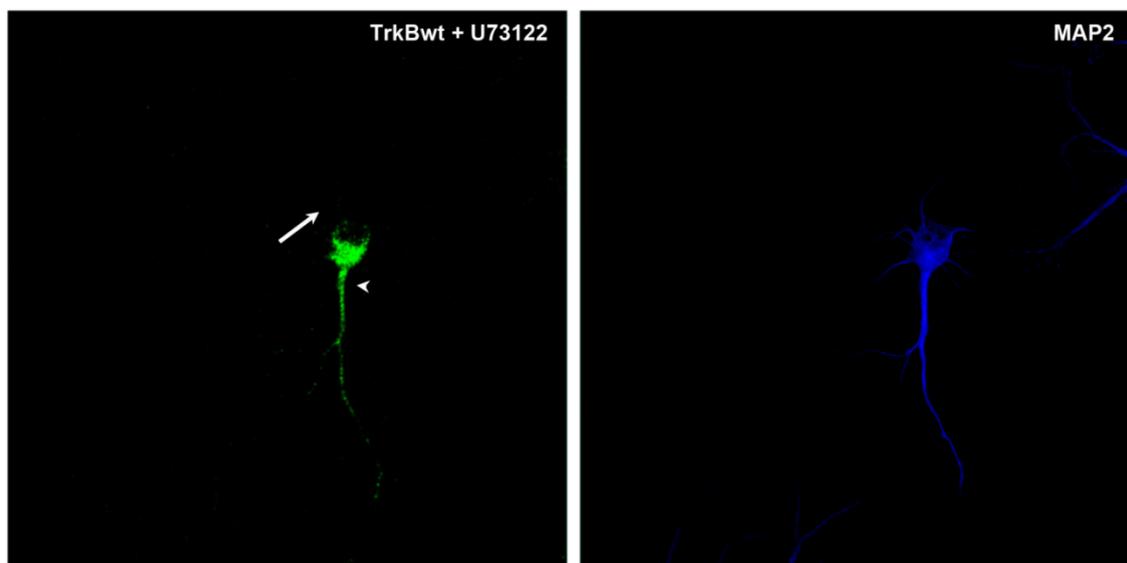


Figura 29. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB en ausencia del ligando específico BDNF y en presencia del inhibidor U73122. En la figura de la izquierda se observa el grupo transfectado con HA-TrkB (verde) luego de la incubación con U73122, en donde puede observarse al receptor localizado en las dendritas (flechas), principalmente en la apical (cabeza de flecha) y una marcada retracción del árbol dendrítico. En la figura de la derecha se muestra la inmunofluorescencia frente a la proteína MAP2 (azul) como control de las arborizaciones dendríticas.

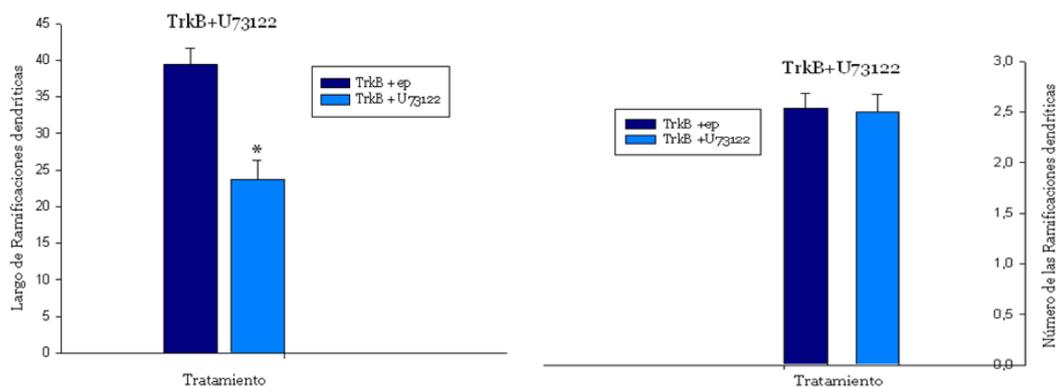


Gráfico 18. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en los grupos control (DMSO) y tratado (Gö6983) en ausencia del ligando BDNF al sobreexpresar el receptor TrkB, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. El (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

En cuanto a la evaluación de la participación de las PKC ϵ en la señalización mediada por TrkB y PKD1, pudimos evaluar al co-transfectar las neuronas hipocampales en cultivo con las formas wt, kd y ca de PKC ϵ con el receptor TrkBwt, que estas isoformas no participarían en la vía en estudio, ya que la distribución del receptor TrkBwt no se vió modificada ante la sobreexpresión de esta quinasa en ninguna de sus variantes (Figura 30, Gráfico19).

Una posible explicación a este resultado podría encontrarse en el hecho que los efectos de PKC ϵ son más notorios en los axones que en el árbol dendrítico, lo cual ha sido demostrado en estudios de memoria en neuronas piramidales. (Hongpaisan, J et al. 2013).

Sobreexpresión de PKCε en sus variantes wt, kd y ca junto al receptor TrkBwt

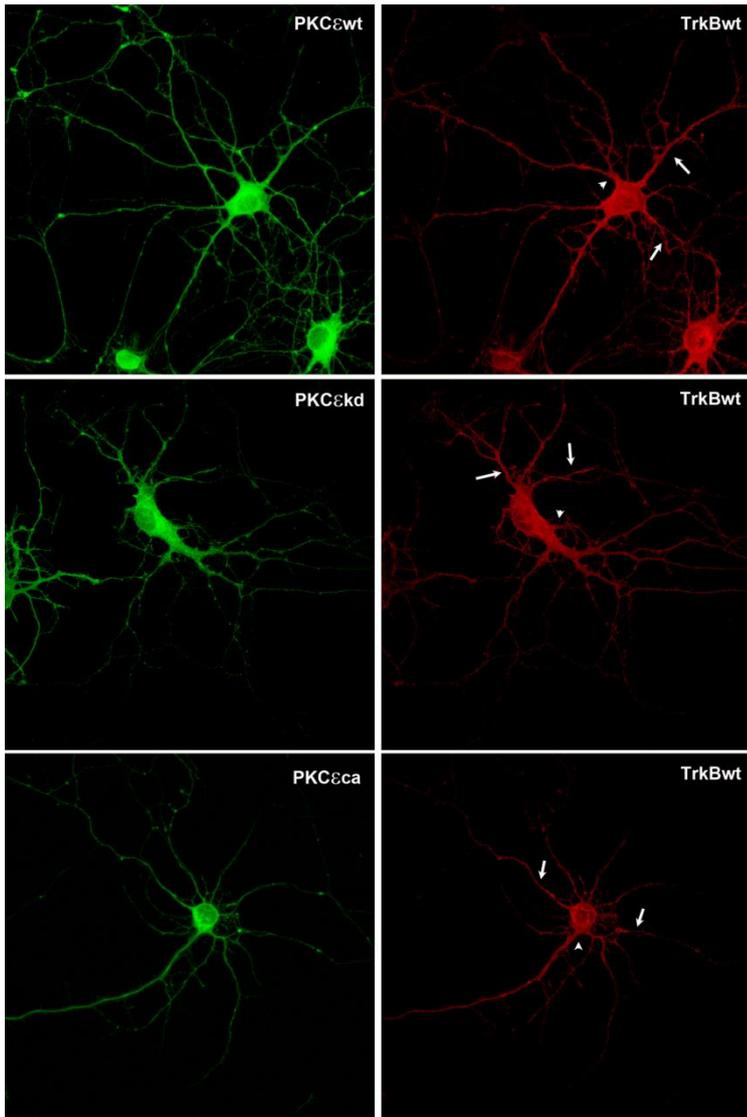


Figura 30: Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB en ausencia del ligando específico BDNF y en presencia de PKCε wt, kd y ca. En las figuras superiores se observa el grupo co-transfectado con HA-TrkB (rojo) y PKCεwt (verde). En las figuras centrales puede verse el grupo co-transfectado con HA-TrkB (rojo) y PKCεkd, **quinasa inactivo** (verde) y en las figuras inferiores se encuentra el grupo en donde se cotransfectó al receptor HA-TrkB (rojo) y PKCεca, **constitutivamente activa** (verde). En todos los grupos puede observarse al receptor localizado tanto en las dendritas (flechas) como en la dendrita apical (cabeza de flecha), por lo tanto esta isoforma de PKC no estaría participando en la vía mediada por PKD1.

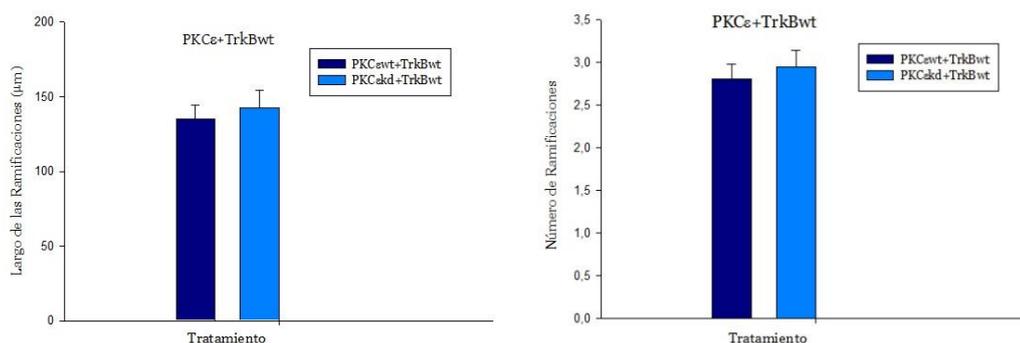


Gráfico 19. En el gráfico se observan las medias \pm SEM utilizadas para el ANOVA de una vía, del largo y del número de procesos dendríticos en los grupos control (PKCεwt) y tratado (PKCεkd. Solo mostramos los de la quinasa inactiva) en ausencia del ligando BDNF al sobreexpresar el receptor Trk, en donde el largo está expresado en micrómetros (μm) y el número en unidades. En este caso no hay diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso que las hubiese el (*) indica las diferencias significativas ($p < 0.005$), según el test Newman-Keuls para grupos independientes.

Conclusiones Objetivo Específico II:

1. Para el receptor TrkA, pudimos observar que la acción de los inhibidores farmacológicos Gö6983, Gö6976 y U73122 estaría confirmando la participación de las PKCs y las PLCs en la vía mediada por PKD1.
2. En presencia de cada uno de estos tres inhibidores se pudo observar que el largo de las ramificaciones dendríticas disminuyó de manera similar al observado cuando se bloqueó la actividad de PKD1, acompañado en todos los casos por una acumulación del receptor TrkA en el aparato de Golgi, de manera similar a como se describiera en los experimentos correspondientes al primer objetivo de este capítulo. En cuanto al número de las ramificaciones no siempre se observó la misma disminución, excepto en presencia de Gö6983.
3. En el caso del receptor TrkB, cuando se realizaron los experimentos con los inhibidores Gö6976 y U73122 disminuyeron su largo dendrítico y conservaron el patrón de localización somático y apical, observándose un efecto más notorio al añadir Gö6983, lo cual podría deberse a una inhibición de otros miembros no estudiados de la familia de las PKCs.
4. Al analizar la relación entre PKC α y TrkAwt pudimos observar una disminución estadísticamente significativa en el grupo que fue co-transfectado con la PKC α kd, la cual fue de alrededor del 50-60% en el largo de las ramificaciones y del 80% para su número. Teniendo en cuenta que esta quinasa es un efector cascada arriba de PKD1, estas observaciones nos estarían confirmando la participación de esta quinasa en la vía de regulación del transporte mediada por PKD1. Esto también estaría confirmado a través de la correspondencia con la retención en el Golgi del receptor TrkA en presencia de la versión dominante negativa de PKC α utilizada en estos estudios.
5. Al realizar los experimentos de co-transfección con las isoformas de PKC ϵ wt, kd y ca, no se

observaron diferencias significativas entre los grupos controles que sobreexpresaban a la versión salvaje de esta PKC ϵ y los mutantes quinasa inactivo y constitutivamente activo, descartando la participación de esta quinasa en la vía en la que PKD1 regularía la localización de TrkB.

Objetivo específico III

Evaluar la funcionalidad y la respuesta a ligandos específicos de TrkA y TrkB, en condiciones de una potencial deslocalización inducida por el bloqueo de la vía reguladora del transporte mediada por PKD1.

A su vez, a este objetivo lo podemos dividir en tres sub-objetivos de acuerdo al tipo de evaluación realizada:

1. Analizar la respuesta de los receptores Trk a sus neurotrofinas específicas cuando la distribución de los mismos se ve alterada por la ausencia de actividad PKD1.
2. Investigar la funcionalidad del receptor TrkB en ausencia de actividad de PKD1 mediante la medición de su reclutamiento luego de la inducción de cLTP (*chemical Long Term Potentiation*)
3. Estudiar el comportamiento de los receptores TrkB frente al Status Epiléptico inducido por un medio con ausencia de Mg²⁺.

Resultados Objetivo Específico III

Cuando realizamos la evaluación de la respuesta de los receptores a sus ligandos específicos,

podimos corroborar que para TrkA la misma se encontraba significativamente alterada luego de que la distribución de estos receptores fuera modificada por la ausencia de una PKD1 activa (Figura 31,32).

En todos los cultivos de hipocampo de rata de 7 DIV en donde se llevaron adelante estas pruebas, observamos que en presencia de la neurotrofinas específicas NGF se produjeron los efectos esperados relacionados con el desarrollo neuronal, lo cual ha sido descrito en la bibliografía anteriormente. (Deinhardt y Chao 2010).

Según estos autores, las neurotrofinas maduras promueven la supervivencia celular y la diferenciación durante el desarrollo neuronal. Esto con las pro-NT no sucede, ya que estas pueden inducir muerte neuronal a través de la activación del receptor p75 NTR. (Lee *et al.* 2001).

No solo las NT son importantes para el correcto desarrollo y la diferenciación neuronal, sino también lo son los receptores que determinan el tipo de desarrollo que tendrán las neuronas de acuerdo a su patrón de expresión.

Tanto su procesamiento como su direccionamiento serán los determinantes de la función de estos receptores. Por ejemplo, si comparamos a los receptores TrkA y TrkB, observamos que TrkA cuando se une a NGF más bien colabora en el reciclaje a nivel intracelular, mientras que TrkB favorece el ciclo de estos receptores en torno a la membrana plasmática.

Luego de unirse a los receptores de membrana en los terminales presinápticos, las neurotrofinas activan numerosas vías de señalización que median la habilidad de las neuronas para conectarse a un tejido blanco y sostener la supervivencia neuronal, diferenciación y mantenimiento.

Los ARN mensajeros de NGF y BDNF están altamente regulados por estimulación eléctrica y actividad epiléptica, y en el caso de BDNF es liberado rápidamente por la actividad neuronal durante los períodos de remodelamiento sináptico (Chao *et al.*, 2003).

Estudios en ratones que expresan niveles reducidos de las neurotrofinas, han demostrado que los niveles reducidos de las mismas tienen efectos bien sorprendentes en el comportamiento del cerebro adulto en cuanto a su función y comportamiento.

Los ratones que carecen completamente de neurotrofinas durante las primeras semanas que siguen al nacimiento son viables sólo en un 50%, y aquellos que sobreviven muestran déficits a muy temprana edad. Por ejemplo, bajos niveles de NGF llevan a numerosos defectos en la adquisición y retención de memoria. Por otro lado, en ausencia de niveles normales de BDNF, los ratones muestran agresividad extrema, hiperactividad e hiperplasia (Chao *et al.* 2003).

Una delección condicional de BDNF en el cerebro de los ratones postnatales también lleva a hiperplasia e hiperactividad, así como también a altos niveles de ansiedad que han sido medidos en test de exploración luz/oscuridad. La falta de BDNF también causa déficits en los test de memoria. Por ejemplo, en los ratones *BDNF*^{+/-} se observaron impedimentos en la memoria espacial, lo cual es consistente con los defectos en LTP que se detectan en hipocampo en este tipo de ratones. Interesantemente, los ratones *BDNF*^{-/-} y *BDNF*^{+/-} muestran el mismo déficit en LTP, indicando que no sólo la disponibilidad de BDNF, sino también sus niveles pueden profundizar su plasticidad.

Como hemos descrito en otras secciones de esta tesis, NGF se une a TrkA y BDNF a TrkB, pero esta unión no es de alta afinidad sino que es regulada por la dimerización del receptor, las modificaciones estructurales o las asociaciones con el receptor p75 (Arevalo, J. *et al.* 2000; Esposito, D. *et al.* 2001), ya que el receptor p75 puede unirse a cada neurotrofina y también actuar como correceptor de los receptores Trk.

La capacidad de los receptores Trk y p75 tiene que ver con la presentación de diferentes sitios y afinidades a las neurotrofinas particulares, lo cual determina tanto su responsividad como su especificidad. La proporción de los receptores es importante en la determinación del número de células supervivientes y las interacciones entre p75 y Trk, generando gran discriminación entre las neurotrofinas.

Como se explicara anteriormente, algunas neurotrofinas se unen a los receptores como dímeros. Esta dimerización se complementa con la transautofosforilación entre ambos receptores, lo que iniciará las cascadas de señalización intracelular. La proteína de colágeno homóloga de Src (Shc o *Src homology/collagen protein*) une a los receptores Trk activados en dos cascadas de señalización.

La supervivencia neuronal requiere de la unión de Shc al receptor Trk, lo cual resulta en un aumento de la actividad de Fosfoinositol 3-quinasa (PI3K o *Phosphoinositide 3-kinase*) y Akt/PKB. También se produce un aumento en la actividad de la pequeña G Ras y en las quinasas reguladas por señal extracelular (ERK o *Extracellular-signal-Regulated Kinases*). Estos cambios influyen a su vez a eventos transcripcionales, como la inducción del elemento de respuesta a AMPc (CREB o *cAMP Response Element-Binding*). Se ha descrito que este factor de transcripción posee efectos en el ciclo celular, crecimiento neurítico y plasticidad sináptica. Por otro lado, se ha postulado que CREB es un efector cascada abajo de PKD1, y que de esa manera regula la actividad en el núcleo celular. De cualquier forma, en neuronas aun no existen estudios que demuestren un vínculo entre CREB y PKD1 en relación al desarrollo neuronal.

Otras pequeñas G como Rap1 permiten que las neurotrofinas señalicen por largos períodos a través de las ERK. A su vez, la Fosfolipasa C gama (PLC γ o *Phospholipase C gamma*) se une a los receptores Trk activados, lo que inicia las cascadas de señalización intracelular que resultan en la liberación de diacilglicerol (DAG) e inositol trisofato (IP₃) y la posterior activación de la PKC.

Muchos de los componentes de la vía que median la señalización de las neurotrofinas, como las ERK, Akt, PLC, PKC, Ras, JNK y NF κ B no son únicos para las neurotrofinas y sus receptores, sino que cada componente de la señalización es usado en diferentes contextos por otros factores de crecimiento y citoquinas. Esto complica el problema de circunscribirnos a una respuesta específica, que posea un mecanismo exclusivo que sucede en base a una respuesta particular. Claramente, los efectos de las neurotrofinas y sus receptores dependen de varios factores, como sus niveles, la afinidad de los receptores para unirse a los dominios transmembrana, y la duración de la intensidad de la señal de las cascadas de señalización río abajo luego de la activación del receptor. Tomando en cuenta estas consideraciones, los cambios en el comportamiento y en la actividad neuronal pueden ser explicados en un 50% por la reducción de los niveles de las neurotrofinas o de sus componentes de señalización.

Evaluación de la respuesta de los receptores a sus ligandos

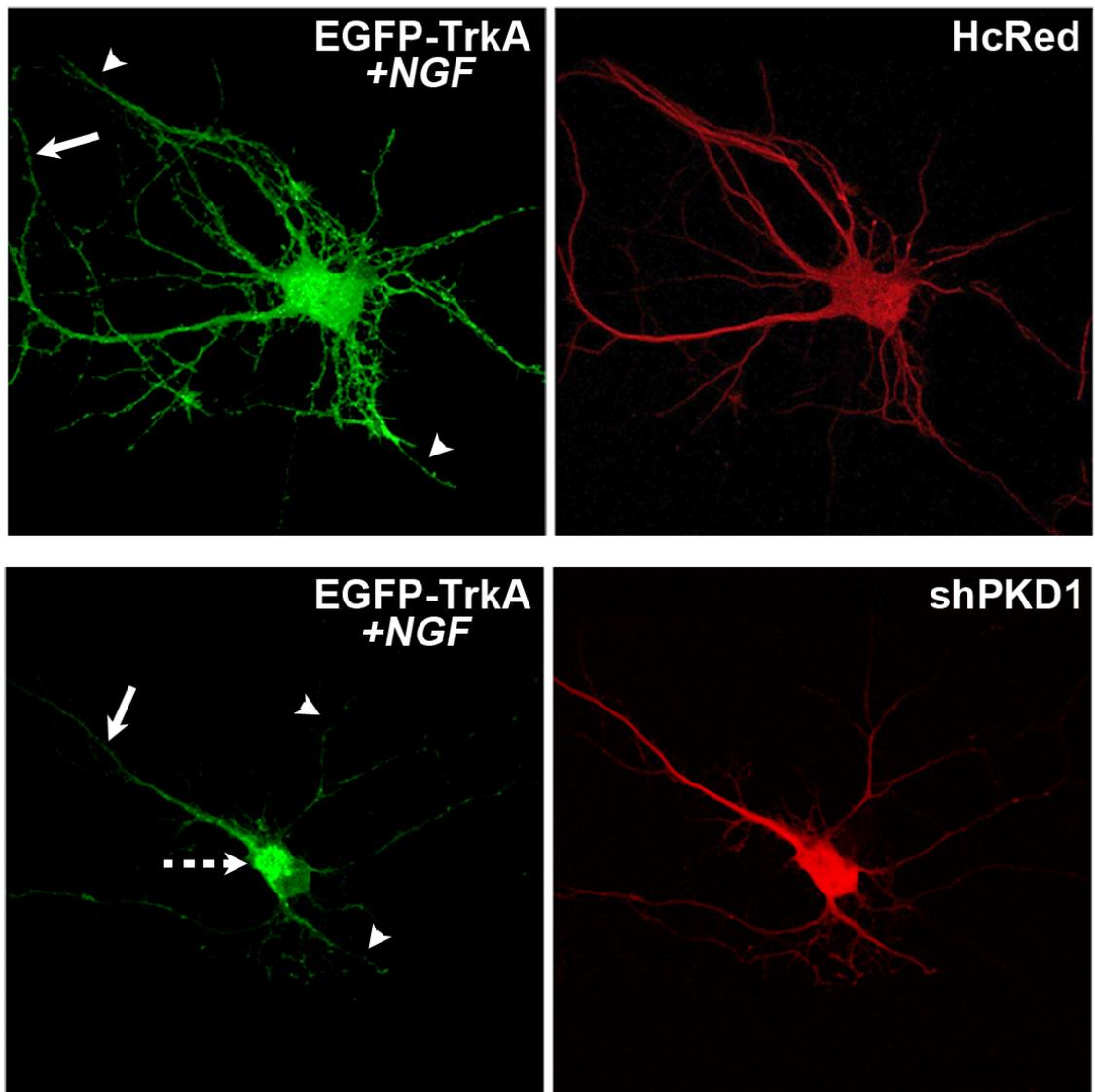


Figura 31. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor tropomiosina TrkA en ausencia y en presencia del ligando específico NGF (100 μ m). En ausencia de una PKD1 activa la respuesta del receptor al ligando se modifica, alterando no sólo la distribución sino también la morfología de las neuronas. En ausencia (Figura 11)/presencia de NGF y de actividad PKD1 se observa una reducción en el árbol dendrítico (puntas de flechas) y una acumulación en el soma neuronal (recuadro en Figura 11, sin NGF; flecha con puntos en esta figura, con NGF).

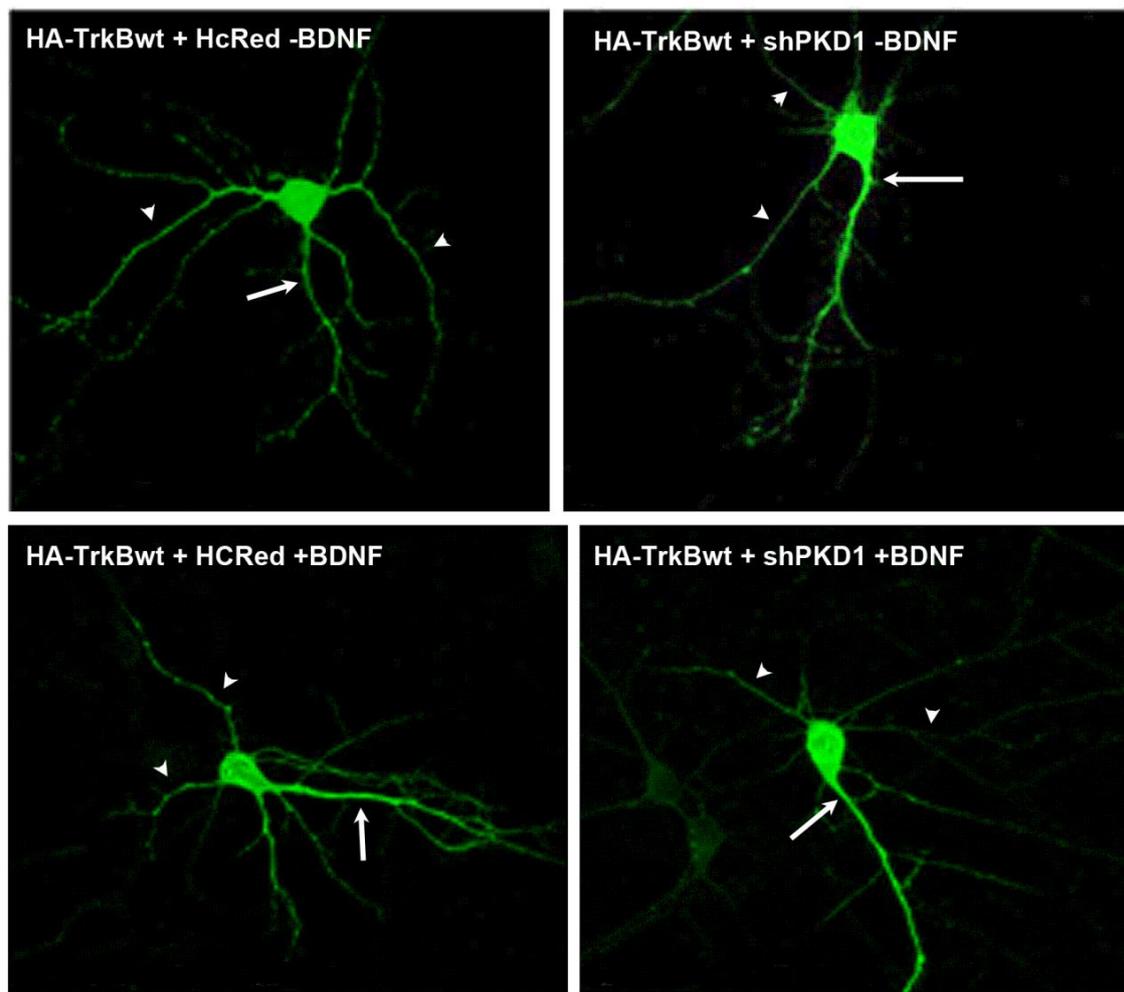


Figura 32. Neuronas de hipocampo de rata de 7 DIV transfectadas con el receptor TrkB en ausencia y en presencia del ligando específico BDNF (100µM). En ausencia de una PKD1 activa la respuesta del receptor al ligando se modifica, alterando no sólo la distribución sino también la morfología de las neuronas. En ausencia/presencia de BDNF y actividad PKD1 se observa una reducción en el árbol dendrítico (puntas de flechas) y una acumulación en la dendrita apical (flechas).

En este punto decidimos investigar la funcionalidad del receptor TrkB en ausencia de actividad PKD1, mediante la medición de su reclutamiento en membrana luego de la inducción de potenciación a largo plazo químico (cLTP, con glicina) en neuronas hipocampales de 10DIV, en donde el LTP se define como una intensificación duradera de la señal entre dos neuronas, que resulta de la estimulación sincrónica de ambas, lo cual nos permite evaluar la plasticidad sináptica, en este caso en ausencia de actividad de PKD1. La plasticidad sináptica podría ser definida como un cambio dependiente de la experiencia en donde se modifica la fortaleza sináptica. (Bliss y Collingridge,

1993).

En cuanto al LTP, se acepta ampliamente que éste involucra dos fases, una temprana y otra tardía. La fase temprana (que dura 1-2 hs) requiere de la modificación covalente de las proteínas existentes y del tráfico de las mismas hacia las sinapsis, pero no de síntesis de proteínas nuevas (Bliss y Collingridge, 1993; Lisman *et al.*, 2002; Malinow y Malenka, 2002; Malenka y Bear, 2004). El desarrollo del LTP tardío, como la memoria a largo plazo, depende de la síntesis *de novo* a partir del mRNA y también de la síntesis de proteínas (Frey *et al.*, 1988, 1996; Kelleher *et al.*, 2004b).

En general el LTP está acompañado por un aumento en la densidad de las espinas dendríticas y en las cascadas de señalización que se activan y que involucran la activación del BDNF y del remodelado del citoesqueleto. El cLTP puede ser inducido por el aminoácido glicina, aumentando los niveles de BDNF. Por otro lado, si se bloquea el accionar de los receptores TrkB, ya sea por el uso de inhibidores específicos como el K252a o el receptor alostérico TrkB, disminuye el cLTP aumentando a su vez la densidad de las espinas. Este bloqueo en el accionar de los receptores provoca un cambio desde el cLTP al LTD (*Long Term Depression* o depresión a largo plazo). Todos estos mecanismos sugieren la importancia que posee la señalización BDNF/TrkB para la plasticidad en las neuronas hipocampales inducida químicamente. (Montalbano *et al.* 2013).

Para la realización de los experimentos de cLTP se midió la fluorescencia celular total corregida (*corrected total cell fluorescence* o CTFT) en los cuatro grupos analizados: **Control** (HcRed/shPKD1) (Figura 33); **LTP** (HcRed/shPKD1) con glicina (Gly, 100µm, 10min) (Figura 34); **CHX+Gly** (HcRed/shPKD1) con cicloheximida (CHX 200µm, 30min) y luego Gly (100µm, 10min) (Figura 35); y **Cicloheximida** (CHX 200µm, 30min; datos no mostrados).

En el caso que se produzca LTP, deberíamos observar un aumento en el tráfico de proteínas hacia las sinapsis, que en nuestro caso sería el del receptor TrkB sobreexpresado, comparando su fluorescencia previa y posteriormente a los diferentes tratamientos ya mencionados.

De la comparación entre los diferentes grupos de experimentos se pueden obtener varias conclusiones. En primer lugar, se pudo observar que el cLTP se reprodujo en el soma al comparar

HcRed (Figura 33, izquierda) vs. HcRed + Gly (Figura 34, izquierda). En el caso de la dendrita apical (DA) y otra dendrita (OD), no se pudo reproducir este control de acuerdo a lo mostrado en Zhao et al. 2009, lo cual lo atribuimos probablemente a problemas en la técnica o a las condiciones experimentales, ya que nuestros ensayos fueron realizados en neuronas de 10 DIV, mientras que en el citado trabajo analizan neuronas que varían entre los 7 y los 10 DIV, sin definir claramente cuál de esos estadios son utilizados en cada experimento en particular.

Por otro lado, el bloqueo de la actividad de PKD1 (shPKD1, Figura 33, derecha) produjo un aumento del receptor TrkB inserto en la membrana plasmática en todos los compartimientos indagados, especialmente en la DA, la cual a lo largo de toda la tesis ha demostrado ser el compartimento hacia donde el receptor se dirige en mayor proporción cuando el transporte es afectado en estas condiciones. Esto pudo observarse al comparar los grupos HcRed vs. shPKD1 (Figura 33). Esta facilitación del cLTP podría estar relacionada tanto con una variación del citoesqueleto de actina a nivel de las espinas dendríticas, la cual fue observada a los 30 minutos de inactivar PKD1 (Bencsik et al. 2015), así como también a la ya descrita variación en el transporte del receptor que pudimos observar en este trabajo.

Al evaluar shPKD1 (Figura 33, derecha) vs. shPKD1 + Gly (Figura 34, derecha), pudimos corroborar que ante un bloqueo de la actividad de PKD1, y en consecuencia un mayor acceso de TrkB al soma y la DA, existe un aumento significativo de TrkB hacia la membrana cuando se induce cLTP durante 10 minutos. De cualquier manera, este aumento no puede ser observado claramente en la DA, en donde suponemos que el exceso de TrkB enmascararía el efecto de Gly, y es medible en OD, quizás por su cercanía con la DA, por lo cual hubiera sido necesario medir como OD a uno de los procesos más alejados de la DA.

Si comparamos los grupos HcRed + Gly (Figura 34, izquierda) y HcRed + CHX + Gly (Figura 35, izquierda) en el soma, se puede observar que el cLTP se produce de manera independiente de la síntesis de proteínas, lo que replicaría los resultados del grupo de Zhao et al. (2009), ya que luego de 30 min de añadir CHX no hubo efecto en ninguno de los grupos controles evaluados.

Desafortunadamente esto no pudo ser medido en DA y OD por los motivos explicados en la primera parte de estas conclusiones.

Por otro lado, en los ensayos realizados con shPKD1 + Gly (Figura 34, derecha) vs. shPKD1 + Gly + CHX (Figura 35, derecha) pudo observarse un efecto dependiente de la síntesis de proteínas tanto en el soma como en OD, ya que como fuera explicado, en DA el efecto de CHX estaría enmascarado por la cantidad de receptor TrkB disponible en la membrana plasmática. Debido a que ya fuera demostrado que el cLTP sería independiente de la síntesis de proteínas en su etapa temprana (Zhao et al. 2009 y nuestros resultados para soma), la disminución de TrkB en membrana en ausencia de actividad PKD1 cuando se bloquea la síntesis de proteínas podría significar que los defectos del cLTP en estas condiciones se debería a cambios en el transporte del receptor TrkB, ya sea a nivel de endocitosis/reciclado del receptor o de modificaciones en el citoesqueleto neuronal que podrían depender directamente de la síntesis de proteínas. Cabe destacar que en todos los grupos evaluados se midió el cLTP de fase temprana, ya que en los tiempos experimentales más largos (grupos tratados con CHX + Gly, Figura 34, derecha) el umbral no superó los 40 min como máximo y 10 min como mínimo (grupos tratados con Gly), y en el caso de los grupos controles los mismos fueron fijados ni bien finalizó la transfección.

Todos estos resultados estarían indicando que los defectos en el transporte inducidos por el bloqueo de la actividad de la PDK1 estarían interfiriendo con importantes mecanismos celulares implicados en el correcto funcionamiento neuronal, en este caso en particular con el cLTP y la traslocación de TrkB a la membrana plasmática durante este proceso. Si bien el movimiento de este receptor en presencia de Gly no estaría siendo bloqueado completamente (aunque no sería posible decir eso para la DA, en donde existiría una sobrepoblación de receptor), los cambios de localización de TrkB en ausencia de PKD1 y la dependencia de su traslocación de la síntesis de proteínas serían suficientes para interferir en procesos tan importantes como el cLTP, la formación de sinapsis y la plasticidad neuronal.

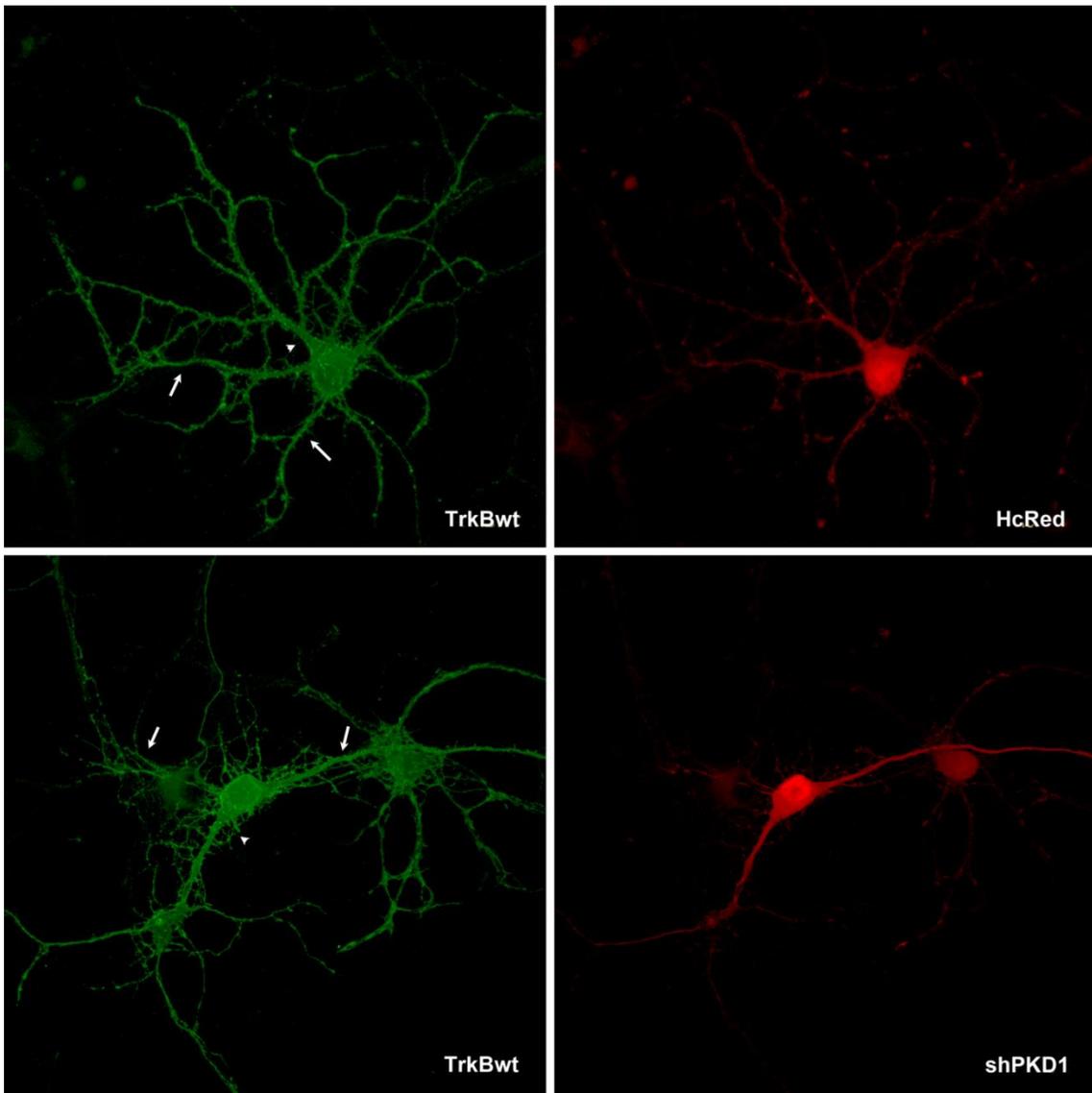


Figura 33. Neuronas de hipocampo de rata de 10 DIV transfectadas con el receptor TrkB, realizándose IF en condiciones no permeabilizantes. Puede observarse que en ausencia de una PKD1 activa (**shPKD1 en rojo**) que el receptor **TrkBwt (verde)** se retrae de la membrana del árbol dendrítico con excepción de la dendrita apical (cabeza de flecha). Las flechas señalan las otras dendritas en el grupo control **HcRed (rojo)** y tratado con el *short-hairpin*.

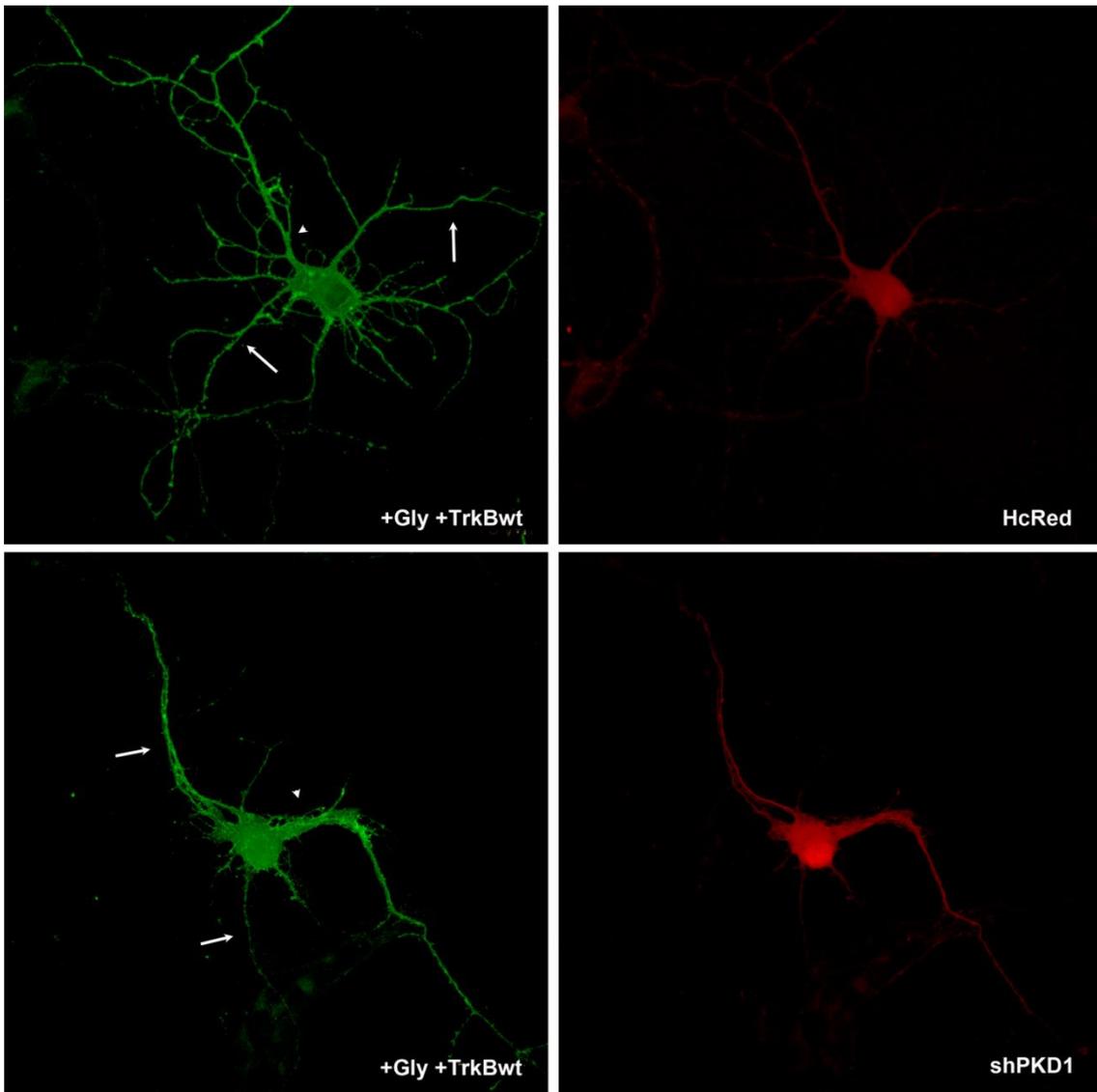


Figura 34. Neuronas de hipocampo de rata de 10 DIV transfectadas con el receptor tropomiosina TrkBwt. Al finalizar la transfección se añadió Gly (100 μ m, durante 10 minutos) y luego se procedió a la IF en condiciones no permeabilizantes. Puede observarse en condiciones control (**HcRed en rojo**) la distribución somato-dendrítica del receptor **TrkBwt (verde)**, mientras que en ausencia de una PKD1 activa (**shPKD1 en rojo**) el receptor **TrkBwt (verde)** se retrae de la membrana del árbol dendrítico encontrándose en la dendrita apical (cabeza de flecha) y en otras dendritas (flecha).

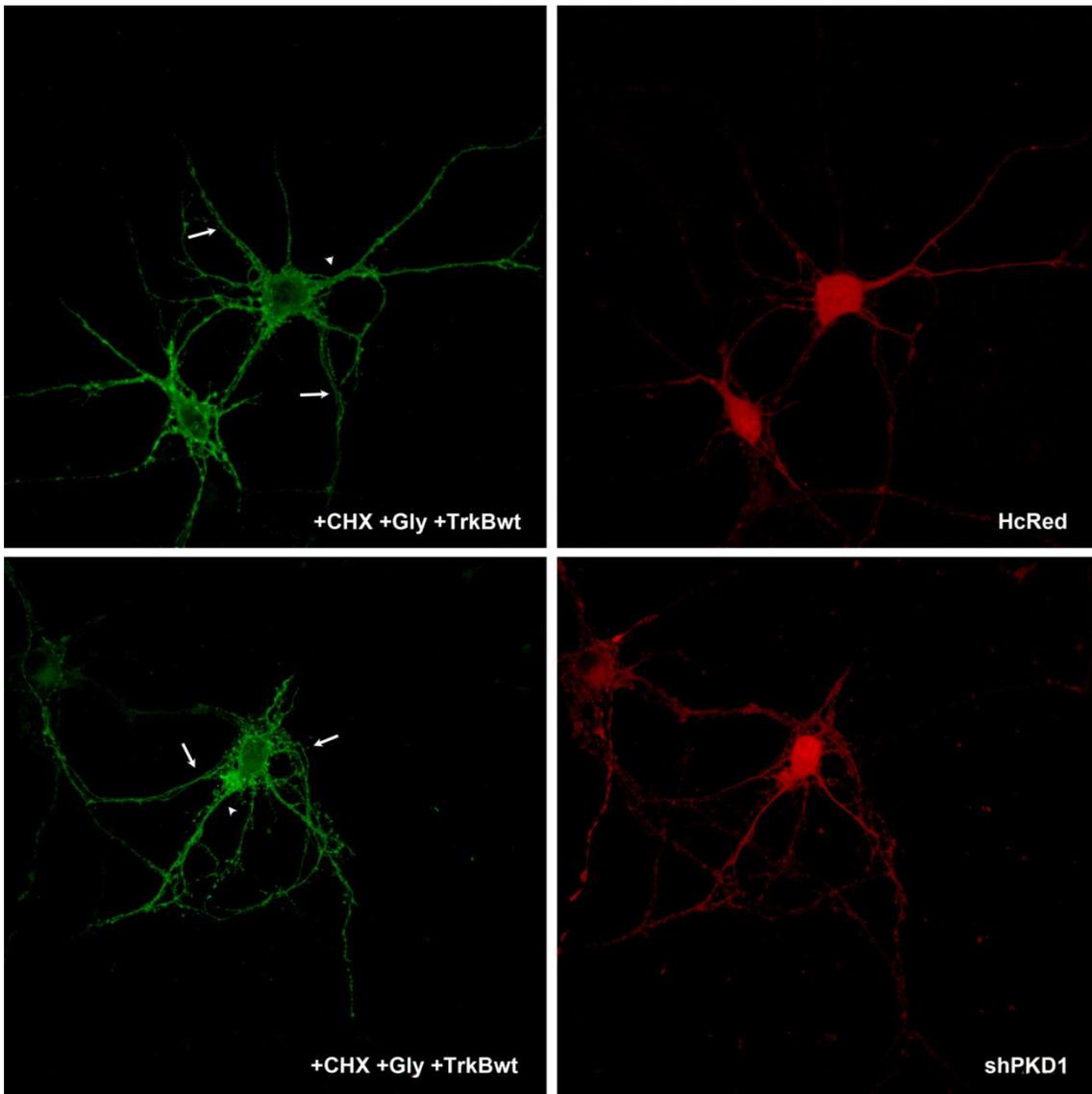


Figura 35. Neuronas de hipocampo de rata de 10 DIV transfectadas con el receptor TrkBwt. Al finalizar la transfección se añadió CHX 200 μ m 30min y luego Gly (100 μ m 10min), para proceder posteriormente a la IF en condiciones no permeabilizantes. Puede observarse en condiciones controles (**HcRed en rojo**) la distribución somato-dendrítica del receptor **TrkBwt (verde)**, mientras que en ausencia de una PKD1 activa (**shPKD1 en rojo**) el receptor **TrkBwt (verde)** se retrae de la membrana del árbol dendrítico encontrándose en la dendrita apical (cabeza de flecha) y en otras dendritas (flecha).

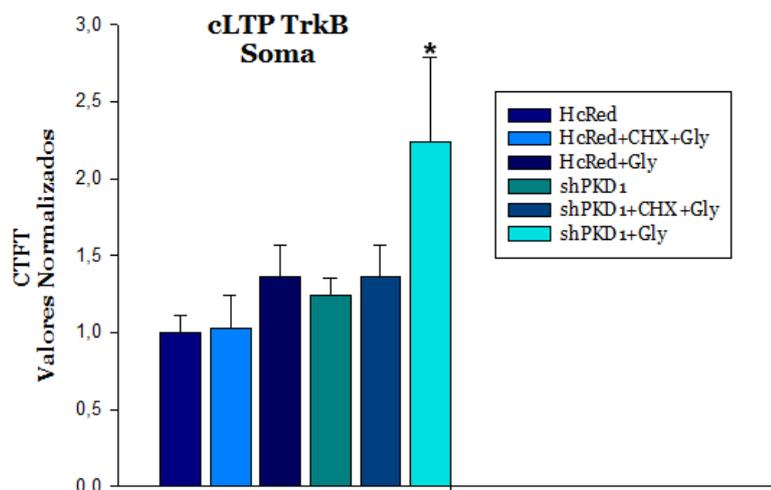


Gráfico 20. En el gráfico se observan los índices de fluorescencia normalizados utilizados para el t-test ($p < 0.005$), luego de medir las intensidades de fluorescencia corregidas por el método CTFT (*corrected total cell fluorescence*, Gavet y Pines, 2010) del receptor **TrkBwt**, luego de la IF en condiciones no permeabilizantes con el anticuerpo primario anti HA (conejo 1:100) en el **SOMA**, en donde el CTFT está expresado en unidades.

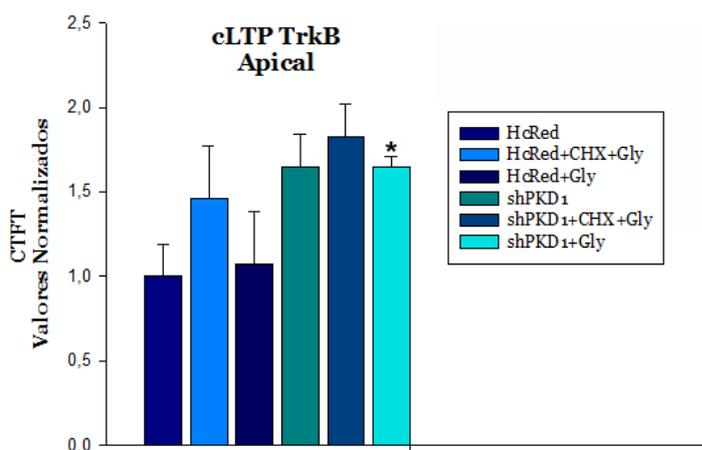


Gráfico 21. En el gráfico se observan los índices de fluorescencia normalizados utilizados para el t-test para muestras dependientes ($p < 0.005$), luego de medir las intensidades de fluorescencia corregidas por el método CTFT (*corrected total cell fluorescence*, Gavet y Pines, 2010) del receptor **TrkBwt** luego de la IF en condiciones no permeabilizantes con el anticuerpo primario anti HA (conejo 1:100) en la dendrita **APICAL**, en donde el CTFT está expresado en unidades.

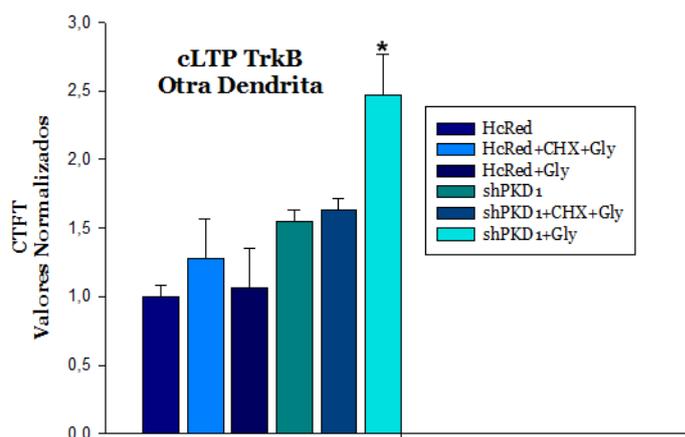


Gráfico 22. En el gráfico se observan los índices normalizados utilizados para el t-test ($p < 0.005$), luego de medir las intensidades de fluorescencia corregidas por el método CTFT (*corrected total cell fluorescence*, Gavet y Pines, 2010) del receptor **TrkBwt** luego de la IF en condiciones no permeabilizantes con el anticuerpo primario anti HA (conejo 1:100) en este caso en **OTRA DENDRITA****, en donde el CTFT está expresado en unidades. ** la dendrita de la izquierda a la dendrita apical usada para las cuantificaciones.

Para continuar con los experimentos, realizamos el abordaje de la influencia de PKD1 y TrkB en el Status epiléptico (SE). El término *status epilépticus* proviene del latín “estado de epilepsia”, el cual corresponde a una crisis epiléptica única o repetidas que persisten por un tiempo suficiente para potencialmente producir daño neurológico, por lo que constituye una emergencia clínica. En la epilepsia se producen desequilibrios en la actividad eléctrica en alguna zona del cerebro. Durante las crisis de SE, que van desde los 30min a las 2hs entre una y la siguiente, se suceden pérdidas de consciencia o crisis repetidas sin recuperación de la consciencia entre ellas, causando así daño neuronal. Las mismas pueden ser convulsivantes o no convulsivantes. Generalmente, los pacientes se estabilizan luego de un tratamiento con benzodiazepinas y benitoínas.

Cuando se produce estimulación neuronal se activan unos pocos receptores NMDA, ya que en condiciones basales el canal se encuentra bloqueado por Mg^{2+} . Cuando la estimulación es fuerte, se produce una depolarización evocada por la activación de los receptores AMPA, que ayuda a liberar

el bloqueo por Mg^{2+} de los NMDA, permitiendo el ingreso de corrientes Ca^{2+} . Este ingreso dispara una serie de eventos que incrementan la eficiencia sináptica (LTP) (Nakanishi, 1992).

Por lo tanto, decidimos estudiar el comportamiento de los receptores TrkB frente al SE inducido por un medio con ausencia de Mg^{2+} en donde el receptor NMDA no se encuentra bloqueado facilitando fenómenos sinápticos, y en donde se ha observado neurodegeneración causadas por lesiones prolongadas.

Anteriormente en roedores se utilizaba el SE como un modelo de la epilepsia del lóbulo temporal con esclerosis hipocampal, asemejando el tipo de epilepsia más frecuente en humanos (Unsain *et al.* 2009). En base a lo publicado por el laboratorio del Dr. Daniel Mascó, en dicho trabajo se demostró que el BDNF facilitaría la desregulación de TrkB y la lesión neuronal después del SE en hipocampo de animales de experimentación. Al iniciar la colaboración con el grupo del Dr. Mascó, partimos de aquellos antecedentes que demostraban para cultivos de neuronas hipocampales que en membrana plasmática, al generar la condición de SE (medio en ausencia de Mg^{2+}), la distribución del receptor TrkB endógeno se vio significativamente modificada. En neuronas de 9DIV, a través de inmunocitoquímica, pudo observarse luego de seis horas en esas condiciones un marcado descenso del receptor TrkB en membrana, así como también una notoria neurodegeneración del cultivo en estudio.

Previamente, realizamos los controles de este experimento al transfectar el plásmido control (HcRed) y el tratado (shPKD1) en neuronas de hipocampo en cultivo de 7DIV, realizando la inmunofluorescencia del receptor TrkB endógeno, lo cual nos permitió mostrar la localización somática y apical de este receptor TrkB tal como se había observado hasta ahora para el TrkB sobre expresado en ausencia tanto del ligando BDNF como de una PKD1 activa. Esto no solo reforzó los resultados exhibidos en los primeros objetivos de esta Tesis, sino que también han servido como un control para los experimentos de SE.

Nuestros resultados demostraron que en el grupo control con Mg^{2+} (sin SE) y en ausencia de una PKD1 activa, se indujo una mayor inserción del receptor TrkB endógeno en la membrana

plasmática del soma y en la dendrita apical. Por otro lado, en el grupo tratado sin Mg^{2+} (con SE), se observó una inserción mayoritaria del receptor TrkB endógeno en la membrana plasmática somática, no así en el árbol dendrítico, lo cual podría deberse al proceso de neurodegeneración que se activa en la condición de SE.

Al evaluar el comportamiento del TrkB endógeno en ausencia de PKD1 activa, confirmamos que el receptor modificó su localización hacia la dendrita apical y el soma en presencia de shPKD1 en un medio con Mg^{2+} (Figura 36), mientras que en las mismas condiciones pero en un medio inductor del SE, es decir sin Mg^{2+} , (Figura 37) observamos que el receptor pasó a insertarse mayoritariamente en la membrana plasmática del compartimiento somático y en menor disponibilidad en la dendrita apical y en otras dendritas. Creemos que este cambio en la distribución del receptor TrkB en las condiciones epileptogénicas podría deberse a un aumento en la neurodegeneración del árbol dendrítico, que colaboraría junto con la inactivación de PKD1 a la incorrecta llegada del receptor TrkB a las membranas, lo que llevaría finalmente a un decaimiento en la función sináptica. De esta manera se podría afirmar que el bloqueo de la PKD1 podría estar jugando un rol parcialmente neuroprotector durante el proceso de SE, ya que cuando la PKD1 no se encuentra activada, la muerte celular -que en condiciones de SE con actividad quinasa normal ocurre en menos de 3 hs- se retrasa y las neuronas viven por períodos significativamente más largos (resultados no mostrados que provienen de observaciones cualitativas de los cultivos en los períodos por fuera de las 3 hs en estudio).

Este efecto paradójico en el comportamiento de la localización de TrkB podría ser explicado si el SE estuviera afectando de alguna manera el tráfico de este receptor (y otras vías metabólicas esenciales), lo cual llevaría a que el TrkB se reclute a la superficie celular, principalmente en la dendrita apical, en presencia de Mg^{2+} , llevando así a la neurodegeneración y muerte celular por sobreestimulación neuronal. Cuando las neuronas son expuestas a las condiciones de SE pero con TrkB ya localizado en la dendrita apical debido al bloqueo de la PKD1, es altamente probable que se activen otros mecanismos afectados por la ausencia de Mg^{2+} -como por ejemplo la endocitosis de proteínas

de membrana-, que reclutarían a TrkB hacia el soma neuronal, protegiendo de esta manera a la célula de los efectos de la sobre-estimulación inducida por el exceso de este receptor en la superficie de las neuronas.

De cualquier manera, quedaría por corroborar cuan afectado se encuentra el cLTP y otros procesos que dependen de este tipo de receptores en condiciones de SE y en ausencia de una PKD1 activa.

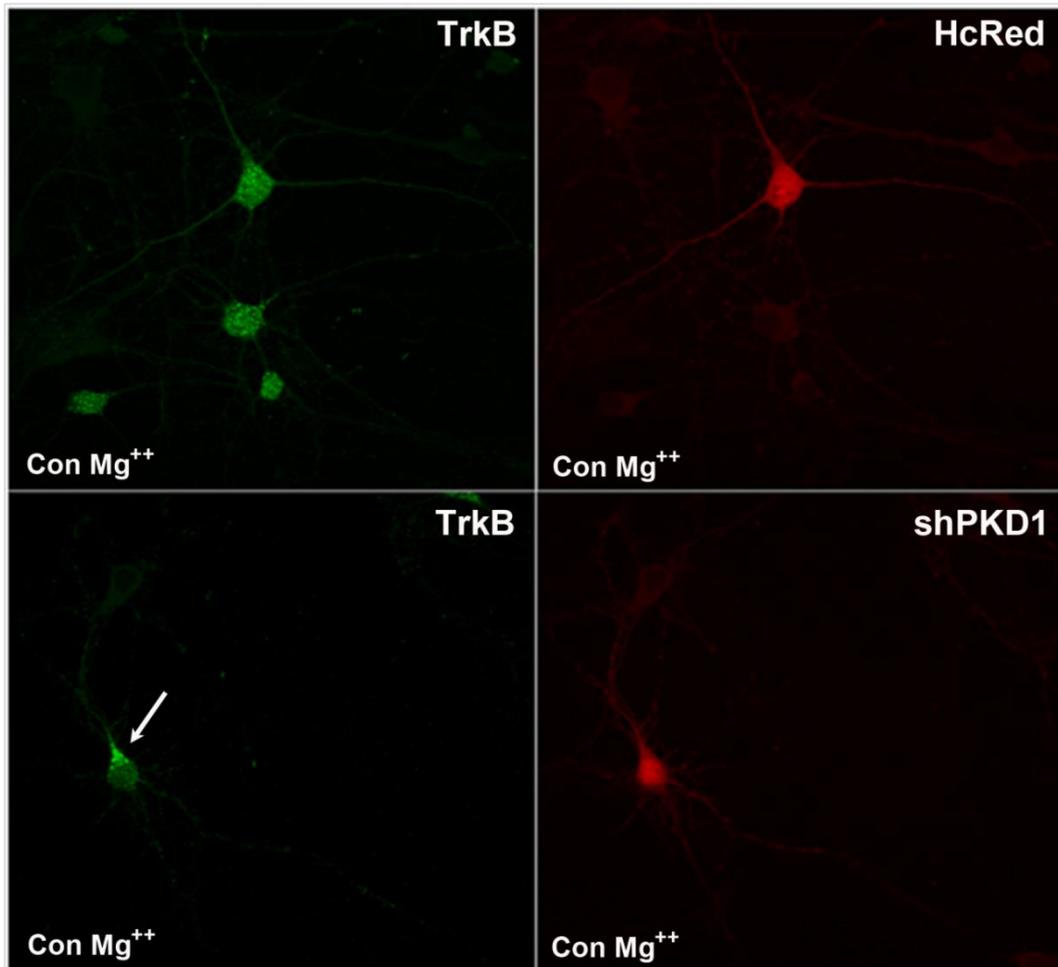


Figura 36. Neuronas de hipocampo de rata de 9 DIV transfectadas con el control HcRed (rojo) o el *short-hairpin* shPKD1 (rojo). Al finalizar la transfección se añadió buffer con Mg²⁺ hasta la fijación 3hs después de la incubación, mientras que el receptor TrkB se marcó endógenamente con un anticuerpo específico (verde) luego de finalizada la transfección. En la parte superior (HcRed) de la figura se observa la distribución mayormente somática del receptor endógeno, mientras que en la parte inferior (shPKD1) se observa que en ausencia de una PKD1 activa el receptor TrkBwt (verde) se distribuye también hacia la dendrita apical (flecha).

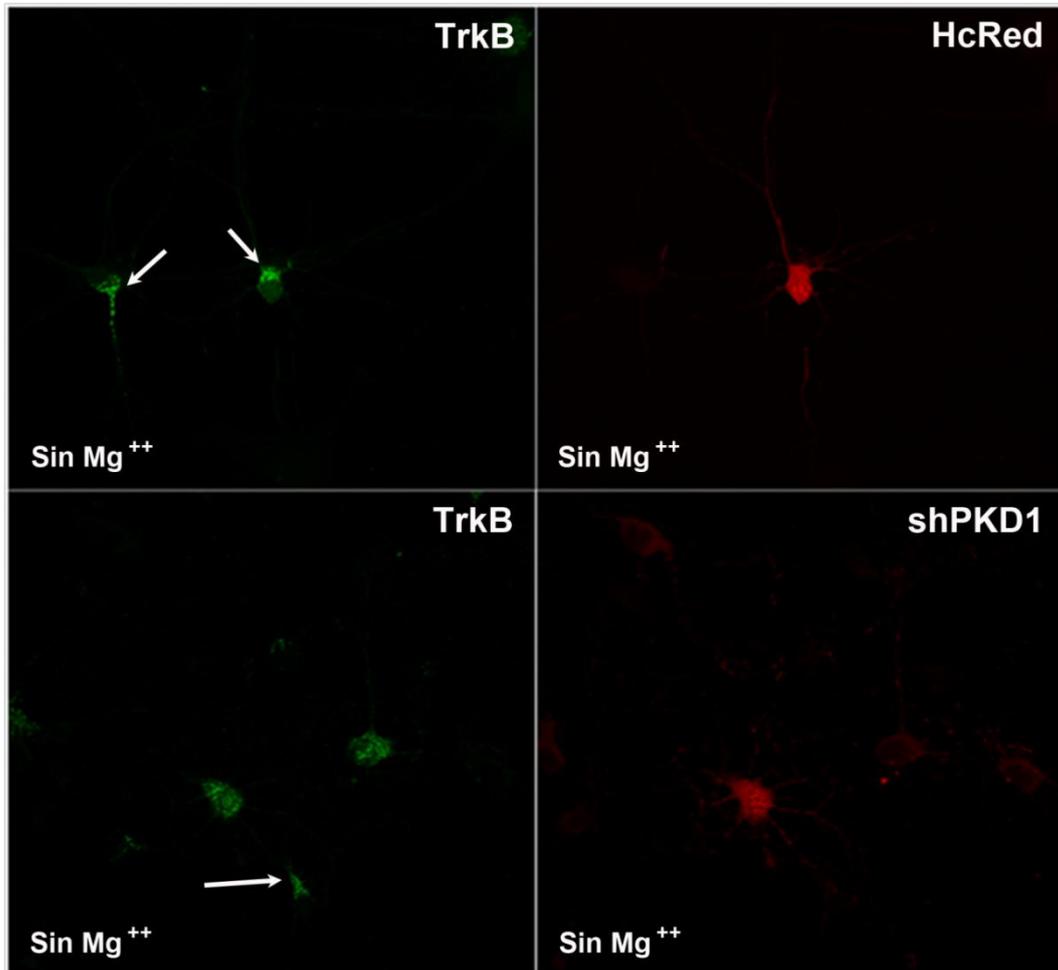


Figura 37. Neuronas de hipocampo de rata de 9 DIV transfectadas con el control HcRed (rojo) y el *short-hairpin* shPKD1 (rojo). Al finalizar la transfección se añadió buffer sin Mg^{2+} induciendo el *Status epilepticus* (SE) hasta la fijación 3hs después de la incubación, mientras que el receptor TrkB se marcó endógenamente con un anticuerpo específico (verde) luego de finalizada la transfección. En la parte superior (HcRed) de la figura se observa la distribución mayormente somática y en dendrita apical del receptor en la membrana (flecha), mientras que en la parte inferior (shPKD1) se observa que en ausencia de una PKD1 activa el receptor TrkBwt (verde) se distribuye mayormente en el soma (flecha) en aquellas neuronas que fueron transfectadas.

Conclusiones Objetivo Específico III:

1. Cuando realizamos la evaluación de la respuesta de los receptores a sus ligandos específicos, NGF (TrkA) y BDNF (TrkB), pudimos corroborar que la misma se encontraba significativamente alterada para el primero luego de que la distribución de estos receptores

fuera modificada por la ausencia de una PKD1 activa. En todos los cultivos de hipocampo de rata en donde se llevaron adelante estas pruebas, observamos que en presencia de las neurotrofinas específicas se produjeron los efectos esperados relacionados con el desarrollo neuronal, lo cual ha sido descrito en la bibliografía anteriormente. (Deinhardt y Chao 2010).

2. Nuestros resultados, al medir el reclutamiento del receptor TrkB en la membrana plasmática, estarían indicando que los defectos en el transporte inducidos por el bloqueo de la actividad de la PDK1 estarían interfiriendo con importantes mecanismos celulares implicados en el correcto funcionamiento neuronal, en este caso en particular con el cLTP y la traslocación de TrkB a la membrana plasmática durante este proceso. Si bien el movimiento de este receptor en presencia de Gly no estaría siendo bloqueado completamente (aunque no sería posible decir eso para la DA, en donde existiría una sobrepoblación de receptor), los cambios de localización de TrkB en ausencia de PKD1 y la dependencia de su traslocación de la síntesis de proteínas serían suficientes para interferir en procesos tan importantes como el cLTP, la formación de sinapsis y la plasticidad neuronal. Para ampliar las comprensiones sobre esta temática se deberán realizar más estudios que permitan dilucidar el mecanismo que explicaría este tipo de resultados, ya que, como señaláramos más arriba, es sabido que para el LTP de fase temprana (1-2 hs) aparentemente no se requeriría de síntesis *de novo* de proteínas, sino más bien de un aumento del transporte hacia las sinapsis o modificación covalente de las mismas (Malenka y Bear, 2004).

El importante aporte de estos resultados es la demostración de que el aumento del reclutamiento del receptor en la membrana plasmática podría deberse a un incremento en la plasticidad sináptica, la cual también requiere una mayor cantidad de TrkB inserto en la membrana plasmática, y que sería necesaria una PKD1 activa para colaborar con el correcto transporte del receptor TrkB hacia las sinapsis.

3. Cuando se evaluó el rol de PKD1 y el tráfico del receptor TrkB en el Status epiléptico (SE),

los resultados demostraron que en el grupo control con Mg^{2+} (sin SE) y en ausencia de una PKD1 activa, se indujo una mayor inserción del receptor TrkB endógeno en la membrana plasmática del soma y en la dendrita apical, lo mismo que fuera descrito con la sobre expresión del receptor. Por otro lado, en el grupo tratado sin Mg^{2+} (con SE), se observó una inserción mayoritaria del receptor TrkB en la membrana plasmática somática, no así en el árbol dendrítico, lo cual podría deberse al proceso de neurodegeneración que se activaría en la condición de SE.

Discusión:

A lo largo de todo el trabajo de Tesis descrito, hemos enfocado la atención en desarrollar y profundizar más acerca del transporte intracelular y su regulación, sobre todo en lo que hace a la salida de las proteínas desde el aparato de Golgi y su llegada a la membrana plasmática, y hacer hincapié en la variabilidad de funciones que tiene la Proteína Quinasa D1, (PKD1) tanto en células no polarizadas como en células polarizadas. En ambos capítulos hemos indagado acerca del rol de la PKD1 en dicho proceso de transporte, regulación y la llegada de las proteínas a la membrana.

En lo que respecta a las células no polarizadas HeLa, nuestro laboratorio ha demostrado que subunidades $\beta\gamma$ específicas de las proteínas G son capaces de inducir la fisión de vesículas en el Golgi a través de la cascada de señalización que involucra a la PKD1 y sus efectores (PLC β , PKC). Estas observaciones, junto con numerosos resultados publicados recientemente, demuestran que las subunidades $G\beta\gamma$ serían capaces de traslocarse desde la membrana plasmática hacia el Golgi, reforzando nuestra hipótesis que afirma que parte del transporte vesicular entre esta organelas y la superficie celular sería regulado desde el exterior de la célula a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G (Díaz Añel y Malhotra 2005).

Con respecto a los efectores de esta vía, una vez demostrada la participación de la PLC β 3 activada por proteínas G en la regulación del tráfico mediada por PKD1 (Díaz Añel 2007), el siguiente

paso nos llevó a investigar si las subunidades $G\alpha_q$ tenían alguna participación en estas vías de transducción de señales involucradas en el control de la fisión de membrana. Una de las candidatas obvias como participante de estas vías de señalización eran las subunidades G_q , dado que las mismas activan específicamente a miembros de la familia $PLC\beta$ (Weinstein y Scarlata 2011).

En células epiteliales HeLa, pudimos observar que PKD1 y sus activadores participaban en la fisión de vesículas desde el TGN hacia la membrana plasmática, estando dicho proceso altamente regulado por receptores acoplados a Proteínas G (GPCR) y sus proteínas G asociadas, caracterizándose específicamente a la $G\alpha_q$ como la isoforma que participa en dicha vía de señalización.

Los roles fisiológicos de $G\alpha_q$ fueron descritos en numerosos trabajos a lo largo de los últimos años, y al momento de realizar nuestra indagación estaba claro que estas proteínas actúan directamente sobre las PLCs dependientes de fosfatidilinosítidos (PI-PLCs) para inducir la producción de los segundos mensajeros diacilglicerol e inositol trifosfato (DAG e IP_3 ; Golebiewska y Scarlata 2010). Estas subunidades de proteínas G fueron también caracterizadas como activadores de PKD1 en diferentes procesos celulares (Yuan *et al.*, 2000; Ozgen *et al.*, 2008; Waldron *et al.*, 2012), pero su rol en el tráfico mediado por PKD1 no había sido indagado hasta ese momento. Basándonos en estos puntos, y tomando en cuenta los resultados con los mutantes constitutivamente activos de estas subunidades (llamados mutantes QL), se investigó la participación de $G\alpha_q$ en la vía previamente descrita para las subunidades $G\beta\gamma$.

Experimentalmente, el rol de estas proteínas fue demostrado por medio del uso de inhibidores específicos y de la forma quinasa inactiva de PKD1 (PKD1kd), los cuales por medio de ensayos de transfección y expresión de los constructos, junto con la versión salvaje de $G\alpha_q$ y la versión constitutivamente activa ($G\alpha_qQL$), demostraron que la ausencia de una actividad de PKD1 inhibía el proceso de fisión de vesículas desde el TGN y su llegada a membrana plasmática. Esto pudo observarse al producirse el bloqueo total de la fragmentación del Golgi inducida por $G\alpha_qQL$ mediante

la sobreexpresión de la mutante inactiva de PKD1, demostrando que estas dos proteínas pertenecen a la misma vía de regulación de tráfico de proteínas, como fuera establecido para las subunidades G β γ (Díaz Añel y Malhotra 2005).

Al realizar ensayos de transporte con la proteína del Virus de Estomatitis Vesicular (VSV-G) en su variante termosensible (VSVGt045s), tanto en presencia como en ausencia de PKD1 activa y de G α q salvaje o QL, pudimos observar a diferentes rangos de temperatura, cómo el transporte desde el retículo endoplásmico hacia el Golgi era conservado, algo que no ocurrió con el tráfico de esta proteína viral entre el Golgi y la membrana plasmática, lo cual demostró funcionalmente la importancia de PKD1 para la regulación de fisión de vesículas en células no polarizadas (Coria *et al.* 2014).

Luego de haber confirmado el rol de las subunidades G α q y PKD1 en esta vía, se comenzó a buscar a los efectores de PKD1 río arriba. Para ello se decidió seleccionar un conjunto de inhibidores específicos de PKCs y PLCs para evaluar el rol de los miembros de esta vía.

A partir de los resultados obtenidos, podemos establecer que las proteínas G α q pueden activar directamente la vía de las PLC β para incrementar la cantidad de DAG en el Golgi, lo que permitiría que la PKD1 pueda ser reclutada hacia dicha organela para ser activada por PKC noveles, lo que a su vez facilitaría posteriormente la regulación de la fisión de vesículas, conjuntamente con la concentración de DAG y la homeostasis de los lípidos. Como se especificó anteriormente, estudios más exhaustivos serán necesarios para poder identificar las subunidades específicas de PLC y PKC involucradas en esta vía de señalización.

La descripción del papel de G α q en la vía mediada por PKD1 que regula la fisión de vesículas, facilitará el descubrimiento de aquellos GPCR involucrados en la señalización externa que iniciaría este proceso, ya que se conocen con gran detalle los receptores asociados a G α q, mientras que hasta ahora la promiscuidad de las subunidades G β γ ha impedido encontrarlos. Otros resultados que apoyarían el rol de los GPCR en la regulación interna de la fisión vesicular, es el hecho que, al igual

que las subunidades $G\beta\gamma$, $G\alpha_q$ ciclaría entre la membrana plasmática y el TGN, lo cual fue demostrado en una publicación de Tsutsumi y colaboradores en 2009, en donde este ciclado se produce según el estado de palmitoilación de la subunidad α_q , el cual es regulado por la acción de proteínas residentes del Golgi conocidas como palmitoil-acil-transferasas 3 y 7 con motivo DHHC (DHHC3-7).

En resumen, en células epiteliales tipo HeLa esta vía de señalización estaría integrada por subunidades $\beta\gamma$ (Díaz Añel y Malhotra 2005) y α_q (Coria *et al.* 2014) de proteínas G heterotriméricas, fosfolipasa C β_3 (PLC β_3 ; Díaz Añel 2007), la Proteína Quinasa C novel η (PKC η ; Díaz Añel y Malhotra 2005) y la Proteína Quinasa D1 (Jamora *et al.* 1999, Liljedahl *et al.* 2001). En el caso de $G\alpha_q$, será necesario confirmar si la PI-PLC involucrada es la misma PLC β_3 , y si la PKC novel implicada es PKC η o alguna de las otras isoformas de esta subfamilia (δ , ϵ o θ)

A partir del marco teórico desarrollado, decidimos investigar el rol de PKD1 y sus efectores en la distribución proteica en células polarizadas. Entre los objetivos específicos de esta segunda parte del trabajo de Tesis, decidimos evaluar si la PKD1 se encuentra involucrada en la regulación de la distribución de receptores neurotróficos, particularmente los de neurotrofinas TrkA y TrkB, y si los cambios en esta regulación poseen algún efecto en la actividad de dichos receptores.

Por otro lado, decidimos examinar el rol en estos mecanismos de otras proteínas de la vía de activación de PKD1 caracterizada por nuestro laboratorio (Coria *et al.* 2014) involucradas en el tráfico intracelular, como ser las PLC β y las PKCs, utilizando para ello inhibidores farmacológicos específicos y formas mutantes de las PKCs.

Por último nos propusimos evaluar la funcionalidad de los receptores mediante el análisis de la respuesta de los mismos a sus ligandos, y el establecimiento de cLTP (potenciación química a largo plazo) y el Status Epiléptico, una vez bloqueada la actividad de la PKD1.

El segundo capítulo de esta Tesis surgió a partir de un trabajo en colaboración con el laboratorio del Dr. Alfredo Cáceres del INIMEC-CONICET-UNC, en donde se decidió estudiar si

esta vía de señalización participaba también en la regulación de sistemas de transporte más complejos, como el que existe en células polarizadas -más específicamente en neuronas hipocampales en cultivo-, que son aquellas que poseen al menos dos tipos de membranas plasmáticas que se diferencian tanto por su estructura y composición proteica como por sus funciones específicas. En el caso de las neuronas, estas membranas pertenecen a los compartimientos somatodendrítico y axonal, los cuales son dominios morfológica y funcionalmente diferentes, y en donde la localización exacta de las proteínas es crítica para la función neuronal.

La vía secretoria se caracteriza porque una vez sintetizadas las proteínas en el retículo endoplásmico (RE), atraviesan el aparato de Golgi (AG) para su posterior procesamiento post-traducciona. Seguidamente, son clasificadas y empaquetadas en vesículas en la última cisterna del Golgi, el TGN (del inglés, *Trans-Golgi Network*) desde donde son enviadas a sus sitios de inserción correspondientes en la membrana plasmática. En neuronas, estos *carriers* vesiculares con su correspondiente carga son dirigidos por el sistema de transporte hacia los axones y las dendritas.

Las neuronas utilizan diversos mecanismos para el direccionamiento de las proteínas de membrana, los cuales permiten que el proceso sea altamente regulado y que las proteínas se dirijan al compartimiento neuronal indicado, ya sea dendritas (apical o basales), axones o el soma. Entre los eventos que permiten la regulación de los procesos se encuentran la selección de cargos, el transporte selectivo, y la fusión selectiva.

En la selección de cargos, estos son transportados en vesículas transportadoras o *carriers*, las cuales se forman en compartimientos como el TGN o los endosomas, y cuyo destino ya está determinado al momento de su formación. El transporte selectivo se logra por medio de la intervención de los motores moleculares, ya sea kinesinas o dineinas, las cuales permiten el tráfico tanto de manera anterógrada (hacia la superficie) como retrógrada (hacia el interior celular) a lo largo de los microtúbulos. Mientras que en la fusión selectiva intervienen las proteínas del complejo SNARE (*N-ethylmaleimide Sensitive fusion protein Attachment Receptors* o receptores de unión a

proteínas de fusión sensibles a N-etilmaleimida) para que ocurra la fusión.

En el trabajo de Bisbal del año 2008, se pudo demostrar que cargos dendríticos por excelencia, como el receptor de Transferrina (TfR) y el LRP (*Low-Density Receptor related protein* o proteína relacionada al receptor de baja densidad), modifican su distribución cuando se inactiva a la PKD1, ya que los mismos comienzan a transportarse en vesículas VAMP-2 positivas y se dirigen al compartimiento axonal. Esta alteración en el *sorting* conlleva modificaciones en el largo y número de los procesos dendríticos. Muchos de los cargos poseen secuencias de señalización, que generalmente se encuentran en dominios extracelulares o transmembrana, que son reconocidas por la maquinaria de transporte para llevarlos a su destino correcto, ya sea el compartimiento somatodendrítico o basolateral, dependiendo del tipo celular. En el caso de las señales axonales o apicales, las mismas no han podido ser correctamente identificadas, pudiendo ser aun mucho más diversas.

Ya en los años noventa, Yeaman y colaboradores (1997) describieron señales que eran esenciales para distribuir al receptor de neurotrofinas p75 en la zona apical de células epiteliales por medio de glicosilaciones en residuos serina/treonina. Algunos receptores de la familia LDL (*Low Density Lipoprotein* o proteína de baja densidad) han sido descritos como promotores del envío a la región apical de células polarizadas (Marzolo *et al.* 2003).

En la bibliografía se detalla cómo ciertos componentes proteicos de la membrana somatodendrítica, como el mencionado receptor de Transferrina, son transportados directamente a este dominio, excluyéndolos del compartimiento axonal. Mientras que ciertas proteínas características del axón, como lo son las moléculas de adhesión celular L1-CAM/NgCAM, experimentan transcitosis (Sampo 2003), ya que son insertadas preferencialmente en la membrana somatodendrítica para luego ser rápidamente endocitadas y transportadas hacia la membrana axonal (Wisco *et al.*, 2003; Yap *et al.*, 2008).

Ya en trabajos anteriores (Silverman *et al.* 2001) se habían descrito cargos axonales y

dendríticos con sitios de inserción específicos, como por ejemplo la Ng-CAM (molécula de adhesión de células neuronales gliales), que si bien ingresa en axones y dendritas, es finalmente transportada hacia la membrana plasmática axonal en donde se inserta, a diferencia de los anteriormente mencionados, que salvo ante defectos en el *sorting* se deslocalizan.

En este trabajo, hemos observado que el bloqueo de la actividad de PKD1 alteró la normal distribución de los receptores para neurotrofinas estudiados, lo que ocurrió tanto en presencia como en ausencia de los ligandos específicos, a la vez que fue independiente de la actividad tirosina quinasa de estos receptores. Desde lo morfológico, pudimos observar la disminución del largo de las ramificaciones dendríticas, lo que podría explicarse por un transporte reducido de membranas a estos compartimentos, y a la vez por una respuesta defectuosa de la célula al desarrollo dendrítico al encontrarse modificada la distribución de los receptores implicados en este tipo de procesos celulares, entre los que se encuentran TrkA y TrkB.

En el caso del receptor TrkA, en presencia de la variante dominante negativa de PKD1 o de un *short-hairpin* ARN para esta quinasa, el receptor se retuvo en el TGN, cuando normalmente posee una distribución somatodendrítica. En cuanto a la distribución del receptor TrkB en iguales condiciones, la misma se vio modificada al localizarse en el compartimiento somático y en la dendrita apical en un alto porcentaje de la población neuronal, cuando su distribución, al igual que TrkA, es normalmente somatodendrítica. El uso de los mutantes TrkAca (constitutivamente activo) y TrkBkd (dominante negativo) demostró que estos cambios de localización en ausencia de actividad PKD1 son independientes de la actividad quinasa intrínseca de estos receptores.

Estos resultados nos sirvieron para determinar la importancia de PKD1 en el transporte de los receptores TrkA y TrkB y en su correcta localización. Además, nos permitiría postular que el receptor TrkA se estaría comportando de manera similar a como lo hacen los cargos en células no polarizadas Hela, en donde el rol de la PKD1 se ejercería a nivel del TGN haciendo que el receptor quede retenido en esa organela. Por otro lado, el receptor TrkB mostró un comportamiento muy particular, incluso en comparación con otros receptores estudiados en neuronas, ya que ante el bloqueo de la actividad

de la PKD1 quedó retenido en el soma y en la dendrita apical, definiendo a esta última como un posible nuevo compartimiento neuronal, algo que ha comenzado a tenerse muy en cuenta en estos últimos años y que pondría en jaque la clásica dicotomía axón-dendrita.

Estos últimos resultados demostrarían que la PKD1 o bien estaría involucrada en el *sorting* a nivel del TGN para este tipo de receptor -pero de manera diferente a como lo haría para los metabotrópicos caracterizados en nuestro laboratorio (Fraire, Masseroni *et al.* 2014)-, o que también podría participar en la regulación de una endocitosis selectiva, que se daría a nivel de la membrana somato-dendrítica para aquellos receptores cuya localización depende pura y exclusivamente de la presencia de su ligando específico, como sería el caso de los receptores de neurotrofinas estudiados.

Por otro lado, aún no está claro si existe una divergencia funcional entre dendritas apicales y basales, a excepción del papel diferencial que jugarían a nivel de la entrada de los estímulos a la célula (Sprouston 2008), por lo tanto nuestras observaciones sobre el cambio de distribución de TrkB podrían contribuir a comprender mejor este tipo de diversidades funcionales entre dendritas.

Particularmente, en el hipocampo se sabe muy poco acerca de las diferencias entre dendritas apicales y basales. Algunas evidencias previas incluyen unos estudios realizados por Konur y colaboradores en 2003, en donde se miden la relación de los diámetros de las cabezas de las espinas y la distancia interespinal, y las mismas son similares en las dendritas basales y apicales. Las dendritas apicales son el área membranosa de mayor extensión y están compuestas por la mayor población de canales iónicos neuronales, por lo que tanto el transporte de proteínas como la actividad sináptica son diferenciales, si las comparamos con las dendritas basales. Esto puede sostener desde otro punto de vista la importancia de este compartimiento en la regulación de los cargos proteicos hacia la membrana diferencial, (Poolos y Jhonston, 2012). Por otro lado, la densidad de corriente eléctrica en la dendrita apical es cinco veces superior a la del soma, y aumenta gradualmente desde el soma hacia la dendrita apical en su porción distal. (Hoffman *et al.*, 1997).

Es interesante destacar que en neuronas del bulbo olfatorio pudo observarse que TrkB

estimularía un aumento en las ramificaciones de las dendritas apicales, mientras que no tendría efecto sobre las basales (Imamura y Greer 2009). Esto es un punto interesante a tener en cuenta, ya que demostraría la existencia de mecanismos complementarios que afectarían de forma diferencial a las dendritas apicales y basales, pudiendo la PKD1 estar involucrada en alguno de ellos, ya que su ausencia hace que TrkB pase de localizarse en toda la superficie neuronal a ubicarse preferencialmente en la dendrita apical. Nuestros experimentos acerca de la respuesta de TrkB a BDNF en ausencia de PKD1 podrían dar nuevas pistas en relación a las diferencias funcionales de ambos tipos de dendritas, si bien no iremos más allá de este tipo de análisis que exceden el marco de la tesis doctoral desarrollada.

Cuando nos propusimos determinar si en células polarizadas otros componentes de la vía de señalización que estudiamos, como proteínas quinasa C noveles y fosfolipasas C del tipo β , se encontraban involucrados en la regulación mediada por PKD1 del transporte de TrkA y TrkB, comenzamos el análisis utilizando los inhibidores farmacológicos Gö6983 y Gö6976 para las PKCs y U73122 para la PLC β , los cuales fueron utilizados exitosamente en otros trabajos de nuestro laboratorio estudiando esta vía (Díaz Añel 2007, Coria *et al.* 2014, Tesis M.L. Masseroni 2013).

La utilización de estos inhibidores en neuronas hipocampales en cultivo nos permitió demostrar el rol central que poseen las PKCnoveles y las PLC β en el transporte, ya que al igual que durante el bloqueo de la actividad de PKD1, se observó la retención en el aparato de Golgi del receptor TrkA y la acumulación en el compartimiento somático y en la dendrita apical de TrkB -reforzando una vez más el potencial de la dendrita apical como un compartimiento neuronal diferenciado de dendritas basales y axones-, y la disminución del largo de los procesos dendríticos.

Los resultados obtenidos con Gö6983 y Gö6976 confirmarían la participación de una PKC en la vía regulatoria del *sorting* de este tipo de receptores, ya que como fuera descrito previamente, estas quinasas son activadores directos de la PKD1, sobre todo aquellas isoformas que son residentes del Golgi, como la convencional α y las noveles δ , ϵ y η , siendo todas ellas susceptibles de ser bloqueadas por estos inhibidores.

En el caso de del inhibidor de PI-PLCs U73122, este compuesto causó el mismo efecto que los otros inhibidores utilizados para bloquear a las PKCs, sugiriendo que en neuronas la PKD1 estaría siendo regulada por una vía de señalización similar [PI-PLC β - PKC - PKD1] a la que fuera descrita para células no polarizadas (Díaz Añel, 2007, Díaz Añel y Malhotra 2005, Coria *et al.* 2014).

Para ahondar más en el conocimiento de esta vía, comenzamos a estudiar algunas mutantes dominante negativas (KD) de PKC. Basándonos en un trabajo publicado en el año 2013 por la Dra. Alexandra Newton, (Scott *et al.* 2013) en donde se demostró que las isoenzimas convencionales de PKC alfa (PKC α) precisan que el dominio C2 sea reclutado a membranas -lo cual se logra a través de la unión directa del dominio C1 al DAG- para obtener la activación final de esta quinasa, decidimos analizar el rol de la PKC α en el transporte de TrkA a membranas.

Este grupo exploró el mecanismo molecular por el cual el dominio C2 controla el paso inicial de la activación de PKC. A raíz del cambio en la localización subcelular que fuera observado con estas formas mutantes de PKC α , las cuales pierden su localización en membrana plasmática para reubicarse en el aparato de Golgi, es que nos propusimos explorar la relación entre PKC α y PKD1 en la vía de regulación del transporte del receptor TrkA, ya que durante el bloqueo de esta vía de señalización pudimos demostrar que se producía una retención del tráfico de este receptor en el Golgi, tanto en presencia como en ausencia de su ligando específico.

Al analizar la relación entre PKC α y TrkAwt pudimos observar una disminución en el largo y número de dendritas en el grupo que fue co-transfectado con la PKC α kd. Teniendo en cuenta que esta quinasa es un efector cascada arriba de PKD1, estas observaciones nos estarían confirmando la participación de esta quinasa en la vía de regulación del transporte mediada por PKD1, lo cual se ve reforzado con las observaciones que demostraron una retención del receptor TrkA en el aparato de Golgi en presencia de la versión dominante negativa de PKC α utilizada en estos estudios.

Por otro lado, hicimos el mismo tipo de análisis con variantes mutantes de la quinasa novel PKC épsilon (PKC ϵ) en conjunto con el receptor TrkB, y no se observaron diferencias significativas

entre los grupos controles que sobreexpresaban a la versión salvaje de esta PKC ϵ y los mutantes dominante negativos y constitutivamente activos, descartando la participación de esta quinasa en la vía en la que PKD1 regularía la localización de TrkB. PKC ϵ fue seleccionada debido a su alta homología con PKC η -que regula el transporte en células HeLa-, su capacidad para activar directamente a la PKD1, y su localización endógena en el aparato de Golgi.

En el caso de PKC α , nuestros resultados la ubicarían como un posible efector cascada arriba de PKD1 en la vía en la que participan los receptores acoplados a proteínas G y los receptores tirosina quinasa, como el TrkA estudiado. Dado que el defecto que se observa en la distribución del receptor TrkA en células polarizadas es similar al descrito en las células epiteliales Hela, quedaría por ser determinado con mas profundidad si TrkA queda retenido efectivamente en el TGN, impidiendo su llegada a la membrana plasmática, o bien podría proponerse un mecanismo selectivo de fisión en neuronas, el cual sería dependiente del cargo a transportarse.

Si bien en células no polarizadas fue establecida la relación entre PKC η y PKD1 en el transporte de vesículas, esto no pudo ser esclarecido en el marco de este trabajo de tesis para los receptores TrkA y TrkB. La PKC η participa, a través de la activación de PKD1, directamente en la fisión de vesículas en células Hela no polarizadas, por lo que no podemos descartar que también lo haga en células polarizadas como las neuronas de hipocampo, por lo que futuras investigaciones deberán ser realizadas para esclarecer la participación de estas quinasas en la regulación del transporte de los receptores estudiados en este trabajo de Tesis.

En el caso de las PLCs, también restaría profundizar más acerca de las isoformas específicas involucradas en la vía estudiada en neuronas, para poder definir si se trata de las mismas que participan en células no polarizadas, como la PLC β 3, o de otros miembros de esta familia de proteínas productoras de los segundos mensajeros DAG e IP $_3$.

En cuanto al análisis de la respuesta de los receptores Trk a sus neurotrofinas específicas cuando la distribución de los mismos se ve alterada por la ausencia de actividad PKD1, realizamos

tres grupos de estudios: por un lado la respuesta a sus ligandos específicos, por otro lado la respuesta frente a la potenciación de largo plazo (*Long Term Potentiation* o LTP), y finalmente, qué sucede en el Status Epilepticus (SE) con el tráfico del receptor TrkB.

Cuando realizamos la evaluación de la respuesta de los receptores a sus ligandos específicos, NGF (TrkA) y BDNF (TrkB), pudimos corroborar que la misma se encontraba significativamente alterada en el caso de TrkA-NGF, luego de que la distribución de estos receptores fuera modificada por la ausencia de una PKD1 activa. En el caso de TrkB-BDNF las diferencias no fueron significativas en respuesta al ligando -comparando entre PKD1 wt y kd o HcRed y shPKD1-, probablemente debido a que la densidad de receptores se mantuvo estable a pesar del cambio de distribución del mismo ante el bloqueo de la PKD1.

En todos los cultivos de hipocampo en dónde se realizaron los experimentos, observamos que en presencia de las neurotrofinas específicas se produjeron los efectos esperados relacionados con el desarrollo neuronal, lo cual ha sido descrito en la bibliografía anteriormente. (Deinhardt y Chao 2010). En los tiempos estudiados, entre los 7 y 10 DIV, el desarrollo neuronal está casi completo. Las neuronas ya han diferenciado sus compartimientos somático, axonal y dendrítico, por lo tanto las alteraciones morfológicas continúan con el proceso de sinaptogénesis. Nuestro grupo plantea que en esta etapa, el rol de la PKD1 está asociado directamente con el *sorting* o distribución de proteínas, con la consecuente redistribución de membranas, y modificaciones en el tráfico de proteínas entre los diferentes compartimientos, en el cual participaría no solo esta quinasa sino también proteínas motoras, otras quinasas, pequeñas proteínas G, componentes del citoesqueleto, proteínas de adhesión, los procesos de endocitosis y de síntesis local de proteínas, entre otros.

Este proceso regulatorio que ejerce la PKD1 sería cargo específico, lo que explicaría las diferencias notables observadas en la distribución de los diferentes receptores de neurotransmisores y neurotrofinas estudiados en nuestro laboratorio (Gráfico 23).

Proteína	Localización Normal	Localización sin PKD1 activa	Referencia Bibliográfica
TfR	Somato-dendrítica	Axón	Bisbal <i>et al.</i> 2008
LRP4	Somato-dendrítica	Axón	Bisbal <i>et al.</i> 2008
L1	Axón	Axón	Bisbal <i>et al.</i> 2008
mGluR1a	Somato-dendrítica	Dendritas+ Axón	Fraire, Masseroni <i>et al.</i> 2014
mGluR5	Somato-dendrítica	Dendritas+ Axón	Tesis Masseroni 2013
NR2A	Somato-dendrítica	Citoplasma/endosomas	Tesis Masseroni 2013
TrkA	Dendritas+ Axón	Aparato de Golgi	Este trabajo
TrkB	Dendritas+ Axón	Soma y Dendrita Apical	Este trabajo

Gráfico 23. Aquí se resume la relación entre los cargos, su localización fisiológica y su localización ante el bloqueo de la actividad de PKD1. En nuestro grupo de trabajo indagamos acerca del tráfico y distribución en ausencia de PKD1 de los receptores de glutamato (mGluR1a, mGluR5, NR2A) y de neurotrofinas (TrkA y TrkB).

Para evaluar la actividad sináptica mediada por el receptor TrkB en neuronas hipocampales en cultivo luego de inactivar a PKD1, realizamos una serie de experimentos tomando en cuenta la distribución del receptor en membrana plasmática, y estudiando los efectos sobre el LTP químico generado por el aminoácido glicina, el cual es uno de los moduladores de la actividad de los receptores de neurotransmisores NMDA que participan activamente en las sinapsis neuronales. Nuestros resultados, al medir el reclutamiento del receptor TrkB en la membrana plasmática, nos estarían demostrando que el LTP se vería significativamente modificado en el soma y en otra dendrita (no apical) en ausencia de la actividad de PKD1, tal cual fuera demostrado en el trabajo de Zhao *et al.* 2009. Este efecto no pudo observarse en dendritas apicales, en donde el aumento de TrkB en la membrana plasmática se observó en presencia de glicina y cicloheximida, lo cual indicaría que el LTP sería dependiente de la síntesis *de novo* del receptor, o bien que necesitaría de la presencia del ligando BDNF endógeno que se libera para facilitar la sinapsis, por lo cual se deberán realizar estudios más exhaustivos que permitan dilucidar el mecanismo que explicaría este tipo de resultados, ya que, como

señaláramos más arriba, es sabido que para el LTP de fase temprana (1-2 hs) aparentemente no se requeriría de síntesis *de novo* de proteínas, sino más bien de un aumento del transporte hacia las sinapsis o de la modificación covalente de las mismas (Malenka y Bear, 2004). A su vez, cabe resaltar y dejar abierta la posibilidad acerca de si el compartimiento dendrítico apical es capaz o no de realizar la síntesis local de BDNF en este caso, o si existe algún tipo de mecanismo de regulación local del complejo ligando-receptor, para lo cual hará falta realizar nuevos estudios.

El mayor aporte de estos resultados es la demostración de que el aumento del reclutamiento del receptor en la membrana plasmática podría deberse a un incremento en la plasticidad sináptica, la cual también requiere una mayor cantidad de TrkB inserto en la superficie neuronal, y que para ello sería necesaria una PKD1 activa para colaborar con el correcto transporte del receptor TrkB hacia las sinapsis.

Finalmente, se evaluó el rol de PKD1 y el tráfico del receptor TrkB en el Status epiléptico, el cual es inducido por un medio de cultivo con ausencia de Mg^{2+} -en donde el receptor NMDA no se encuentra bloqueado por lo que se facilitan los fenómenos sinápticos-, habiéndose observado en estas condiciones la aparición de lesiones prolongadas que últimamente causan neurodegeneración. En roedores se utiliza el SE como un modelo de la epilepsia del lóbulo temporal con esclerosis hipocámpal, que se asemeja al tipo de epilepsia más frecuente en humanos (Unsain *et al.* 2009).

Los resultados demuestran que en el grupo control con Mg^{2+} (sin SE) y en ausencia de una PKD1 activa, se indujo la esperada inserción del receptor TrkB endógeno en la membrana plasmática del soma y en la dendrita apical. Por otro lado, en el grupo tratado sin Mg^{2+} (con SE), se observó una inserción mayoritaria del receptor TrkB endógeno en la membrana plasmática somática, no así en el árbol dendrítico, lo cual podría deberse a la activación de diversos mecanismos afectados por la ausencia de Mg^{2+} -como por ejemplo la endocitosis-, que reclutarían al TrkB acumulado en la dendrita apical -debido al bloqueo previo de la PKD1- hacia el soma neuronal, protegiendo de esta manera a la célula de los efectos de una sobre-estimulación inducida por el exceso de este receptor en la

superficie de las dendritas de las neuronas.

Todos estos resultados colocan a la PKD1 ante una nueva función que deberá ser esclarecida con mayor profundidad, para establecer el nexo entre la modulación de la actividad sináptica (LTP), el SE y la actividad de PKD1 como facilitadora del transporte del receptor TrkB a la membrana plasmática.

Durante este trabajo de Tesis nos hemos acercado más al esclarecimiento de los mecanismos de *sorting* o distribución de los receptores de neurotrofinas TrkA y TrkB, obteniendo nuevas evidencias acerca de la localización final que adquieren los mismos cuando la actividad de la PKD1 se ve alterada. Sabemos que aun resta mucho más para indagar en profundidad, particularmente acerca de los activadores específicos de la vía regulatoria de estos mecanismos, así como también será necesario establecer si existe un *cross-talk* entre los receptores acoplados a proteínas G y los receptores tirosina quinasa estudiados, ya que en experimentos preliminares hemos observado modificaciones exageradas en la morfología neuronal cuando se realizó la co-transfección de la proteína Gαq en su versión constitutivamente activa (GαqQL) y los receptores TrkA y TrkB en ausencia de una PKD1 activa. Estos cambios morfológicos consistieron en engrosamientos significativos en el compartimiento somatodendrítico, y un marcado aumento en el largo y las ramificaciones del árbol dendrítico (resultados no mostrados), lo cual podría estar indicando una participación de las proteínas Gq en la vía mediada por PKD1, en la que también podrían estar interviniendo los receptores TrkA y TrkB como estimuladores del desarrollo dendrítico.

BIBLIOGRAFIA CAPITULO 2

Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ. (1997) *Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain*. Nature. 389(6653):856-60.

Altar CA. y DiStefano PS. (1998) *Neurotrophin trafficking by anterograde transport*. (10):433-7.

Arevalo JC, Conde B, Hempstead BL, Chao MV, Martin-Zanca D, Perez P. (2000) *TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor*. Mol Cell Biol. (16):5908-16.

Arimura N, Kimura T, Nakamura S, Taya S, Funahashi Y, Hattori A, Shimada A, Ménager C, Kawabata S, Fujii K, Iwamatsu A, Segal RA, Fukuda M, Kaibuchi K. (2009) *Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27*. Dev Cell. (5):675-86. 21)

Ascaño M, Richmond A, Borden P, Kuruvilla R. (2009) *Axonal targeting of Trk receptors via transcytosis regulates sensitivity to neurotrophin responses*. J Neurosci. 29(37):11674-85.

Assaife-Lopes N, Sousa VC, Pereira DB, Ribeiro JA, Chao MV, Sebastião AM. (2010) *Activation of adenosine A2A receptors induces TrkB translocation and increases BDNF-mediated phospho-TrkB localization in lipid rafts: implications for neuromodulation*. J Neurosci. 30(25):8468-80.

Assaife-Lopes N, Sousa VC, Pereira DB, Ribeiro JA, Chao MV, Sebastião AM. (2010) *Activation of adenosine A2A receptors induces TrkB translocation and increases BDNF-mediated phospho-TrkB localization in lipid rafts: implications for neuromodulation*. J Neurosci. 2010 Jun 23;30(25):8468-80. Retraction in: J Neurosci. 2013 Jan 16;33(3):1292.

Banker y Goslin (1998) *Developments in neuronal cell culture*. Nature. 336(6195):185-6.

Bannister A.P (2005) *Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex*. Neurosci Res. 53(2):95-103. Review.

Barde YA, Edgar D, Thoenen H. (1982) *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. EMBO J. 1(5):549-53.

Bencsik N, Szíber Z, Liliom H, Tárnok K, Borbély S, Gulyás M, Rátkai A, Szűcs A, Hazai-Novák D, Ellwanger K, Rácz B, Pfizenmaier K, Hausser A, Schlett K. (2015) *Protein kinase D promotes plasticity-induced F-actin stabilization in dendritic spines and regulates memory formation*. J Cell Biol. 210(5):771-83.

- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A. (1991) *Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB*. Neuron. (5):857-66.
- Bisbal M, Conde C, Donoso M, Bollati F, Sesma J, Quiroga S, Díaz Añel A, Malhotra V, Marzolo MP, Cáceres A. (2008) *Protein kinase d regulates trafficking of dendritic membrane proteins in developing neurons*. J Neurosci. 28(37):9297-308.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., (1993). *A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus*. Nature 361, 31–39.
- Bothwell M. (2014) *NGF, BDNF, NT3, and NT4*. Handb Exp Pharmacol. 220:3-15.
- Brigman JL, Wright T, Talani G, Prasad-Mulcare S, Jinde S, Seabold GK, Mathur P, Davis MI, Bock R, Gustin RM, Colbran RJ, Alvarez VA, Nakazawa K, Delpire E, Lovinger DM, Holmes A. (2010) *Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning*. J Neurosci. 30(13):4590-600.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. (2006) *Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests*. Learn Mem. (2):187-91.
- Bronfman FC, Escudero CA, Weis J, Kruttgen A.. (2007) *Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases*. Dev Neurobiol. 67(9):1183-203. Review.
- Chao M.V. (2003) *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways*. Nat Rev Neurosci. (4):299-309. Review.
- Chen MJ, Nguyen TV, Pike CJ, Russo-Neustadt AA. (2006) *Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons*. Cell Signal. (1):114-28.
- Clary DO y Reichardt LF (1994) *An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3*. Proc Natl Acad Sci U S A. 91(23):11133-7.
- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. (1954) *A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SARCOMAS 37 AND 180*. Proc Natl Acad Sci U S A. 40(10):1014-8.

- Cohen S. (1960) **PURIFICATION OF A NERVE-GROWTH PROMOTING PROTEIN FROM THE MOUSE SALIVARY GLAND AND ITS NEURO-CYTOTOXIC ANTISERUM.** Proc Natl Acad Sci U S A. 46(3):302-11.
- Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ, Marshak S. (2010) **Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity.** Dev Neurobiol. 70(5):271-88. Review.
- Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ, Marshak S. (2010) **Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity.** Dev Neurobiol. 70(5):271-88. Review.
- Cooke SF. y Bliss TV. (2006) **Plasticity in the human central nervous system.** Brain. 129(Pt 7):1659-73. Review.
- Coppola V, Barrick CA, Southon EA, Celeste A, Wang K, Chen B, Haddad el-B, Yin J, Nussenzweig A, Subramaniam A, Tessarollo L. (2004) **Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities.** Development. 131(20):5185-95.
- Coria AS, Masseroni ML, Díaz Añel AM. (2014) **Regulation of PKD1-mediated Golgi to cell surface trafficking by Gαq subunits.** Biol Cell. 106(1):30-43.
- DeFelipe J. y Farinas I. (1992) **The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs.** Prog Neurobiol. 39(6):563-607.
- Díaz Añel y Malhotra (2005) **PKCε is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus.** J Cell Biol. 169(1):83-91.
- Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde YA. (2012) **BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons.** J Cell Biol. 196(6):775-88.
- Doherty GJ. y MacMahon HT. (2009) **Mechanisms of endocytosis.** Annu Rev Biochem. 78:857-902.
- Du J, Feng L, Yang F, Lu B. (2000) **Activity- and Ca(2+)-dependent modulation of surface expression of brain-derived neurotrophic factor receptors in hippocampal neurons.** J Cell Biol. 150(6):1423-34.

Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL. (2001) *The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor*. J Biol Chem. 276(35):32687-95.

Farhadi HF, Mowla SJ, Petrecca K, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA.. (2000) *Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor*. J Neurosci.;20(11):4059-68.

Fenner BM. (2012) *Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor*. Cytokine Growth Factor Rev. (1-2):15-24. Ohira *et al.* 2005

Fraire JC, Masseroni ML, Jausoro I, Perassi EM, Diaz Añel AM, Coronado EA. (2014) *Identification, localization, and quantification of neuronal cell membrane receptors with plasmonic probes: role of protein kinase D1 in their distribution*. ACS Nano. 8(9):8942-58.

Gavet O. y Pines J. (2010) *Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis*. Dev Cell. 18(4):533-43.

Gintya D., Segal R.(2002) **Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon** Current Opinion in Neurobiology Vol. 12, Issue 3, Pages 268–274.

Gomes RA, Hampton C, El-Sabeawy F, Sabo SL, McAllister AK. (2006) *The dynamic distribution of TrkB receptors before, during, and after synapse formation between cortical neurons*. J Neurosci. 26(44):11487-500.

Gorski JA, Zeiler SR, Tamowski S, Jones KR. (2003) *Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites*. J Neurosci. 23(17):6856-65.

Griesbeck O, Canossa M, Campana G, Gärtner A, Hoener MC, Nawa H, Kolbeck R, Thoenen H. (1999) *Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity*. Microsc Res Tech. 45(4-5):262-75.

- Gu X, Li C, Wei W, Lo V, Gong S, Li SH, Iwasato T, Itohara S, Li XJ, Mody I, Heintz N, Yang XW. (2005) ***Pathological cell-cell interactions elicited by a neuropathogenic form of mutant Huntingtin contribute to cortical pathogenesis in HD mice.*** Neuron. 46(3):433-44.
- Haapasalo A, Sipola I, Larsson K, Akerman KE, Stoilov P, Stamm S, Wong G, Castren E. (2002) ***Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms.*** J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):43160-7.
- Harrington AW, St Hillaire C, Zweifel LS, Glebova NO, Philippidou P, Halegoua S, Ginty DD. (2011) ***Recruitment of actin modifiers to TrkA endosomes governs retrograde NGF signaling and survival.*** Cell. 2011 Aug 5;146(3):421-34.
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B.(1992) ***Three-dimensional structure***
- Hartmann M1, Brigadski T, Erdmann KS, Holtmann B, Sendtner M, Narz F, Lessmann V. (2004) ***Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor.*** J Cell Sci. 117(Pt 24):5803-14.
- He XL. y Garcia KC. (2004) ***Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75.*** Science. 304(5672):870-5.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D. (1997) ***K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons.*** Nature. 387(6636):869-75.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. (1990) ***Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family.*** Nature. 344(6264):339-41.
- Hongpaisan J., Xu Ch., Sen A., Nelson T., Alkon D. ***PKC activation during training restores mushroom spine synapses and memory in the aged rat.*** Neurobiology of Disease 55 (2013) 44–62.
- Hongpaisan J, Sun MK, Alkon DL. (2011) ***PKC ϵ activation prevents synaptic loss, A β elevation, and cognitive deficits in Alzheimer's disease transgenic mice.*** J Neurosci. 31(2):630-43.

- Horton AC, Rácz B, Monson EE, Lin AL, Weinberg RJ, Ehlers MD. (2005) ***Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis.*** Neuron. 48(5):757-71.
- Horton AC. y Ehlers MD. (2003) ***Neuronal polarity and trafficking.*** Neuron. 40(2):277-95. Review.
- Hu B, Nikolakopoulou AM, Cohen-Cory S. (2005) ***BDNF stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons in vivo.*** Development. 132(19):4285-98.
- Huang y Reichardt (2003) ***Trk receptors: roles in neuronal signal transduction.*** Annu Rev Biochem. 72:609-42. Review.
- Huang YZ, Pan E, Xiong ZQ, McNamara JO. (2008) ***Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse.*** Neuron. 57(4):546-58.
- Imamura F. y Greer CA. (2009) ***Dendritic branching of olfactory bulb mitral and tufted cells: regulation by TrkB.*** PLoS One. 4(8):e6729.
- Jamora, C., Yamanouye, N., Van Lint, J., Laudenslager, J., Vandenheede, J. R., Faulkner, D. J. and Malhotra, V. (1999) ***Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D.*** Cell 98, 59–68
- Jeanneteau F, Deinhardt K, Miyoshi G, Bennett AM, Chao MV. (2010) ***The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching.*** Nat Neurosci. (11):1373-9.
- Jeanneteau F, Garabedian MJ, Chao MV. (2008) ***Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect.*** Proc Natl Acad Sci U S A. 105(12):4862-7.
- Ji Y, Pang PT, Feng L, Lu B.(2005) ***Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons.***
- Jones KR, Reichardt LF. (1990) ***Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family.*** Proc Natl Acad Sci U S A. 87(20):8060-4.
- Kermani P. y Hempstead B. (2007) ***Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis.*** Trends Cardiovasc Med. (4):140-3.

- Klein R. (1994) *Role of neurotrophins in mouse neuronal development*. FASEB J. (10):738-44. Review.
- Konur S, Rabinowitz D, Fenstermaker VL, Yuste R. (2003) *Systematic regulation of spine sizes and densities in pyramidal neurons*. J Neurobiol. 56(2):95-112.
- Kuruvilla R., Zweifel L., Glebova N., Lonze B., Valdez G., Ye H., Ginty D. (2004) *A Neurotrophin Signaling Cascade Coordinates Sympathetic Neuron Development through Differential Control of TrkA Trafficking and Retrograde Signaling*. Cell Vol.118, Issue 2, Pages 243–255.
- Lazo OM1, Gonzalez A, Ascaño M, Kuruvilla R, Couve A, Bronfman FC. (2013) *BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching*. J Neurosci. 33(14):6112-22.
- Lee FS, Rajagopal R, Kim AH, Chang PC, Chao MV. (2002) *Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides*. J Biol Chem. 277(11):9096-102. Rajagopal *et al.* 2004
- Lee FS. y Chao MV. (2001) *Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins*. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(6):3555-60.
- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA. (1989) *Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor*. Nature. 341(6238):149-52.
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. (2003) *Neurotrophin secretion: current facts and future prospects*. Prog Neurobiol. 69(5):341-74. Review. Erratum in: Prog Neurobiol. 72(2):165-6.
- Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J. and Malhotra, V. (2001) *Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network*. Cell 104, 409–420
- Lisman J, Schulman H, Cline H. (2002) *The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory*. Nat Rev Neurosci. (3):175-90. Review.

- Lo KY, Kuzmin A, Unger SM, Petersen JD, Silverman MA. (2011) ***KIF1A is the primary anterograde motor protein required for the axonal transport of dense-core vesicles in cultured hippocampal neurons.*** *Neurosci Lett.* 491(3):168-73.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. (1990) ***Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF.*** *Science.* 247(4949 Pt 1):1446-51.
- Malenka RC. y Bear BF. (2004) ***LTP and LTD: an embarrassment of riches.*** *Neuron.* 44(1):5-21. Review.
- Malinow R, Malenka RC. (2002) ***AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity.*** *Annu Rev Neurosci.* 25:103-26. Review.
- Marzolo MP, Yuseff MI, Retamal C, Donoso M, Ezquer F, Farfán P, Li Y, Bu G. (2003) ***Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains.*** *Traffic.* (4):273-88.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA. (2008) ***Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF.*** *Nat Neurosci.* (2):131-3.
- Mc Donald NQ y Chao MV (1995) ***Structural determinants of neurotrophin action.*** *J Biol Chem.* 270(34):19669-72.
- McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL. ***New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor.*** *Nature.* 5354(6352):411-4.
- Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M.*et al.* (2004) ***Not just a sink: endosomes in control of signal transduction.*** *Curr Opin Cell Biol.* (4):400-6. Review.
- Minichiello L. (2009) ***TrkB signalling pathways in LTP and learning.*** *Nat Rev Neurosci.* (12):850-60. Review.

Montalbano A., Baj G., Papadia D., Tongiorgi E. and Sciancalepore M. (2013) ***Blockade of BDNF signaling turns chemically-induced long-term potentiation into long-term depression.*** Hippocampus Vol. 23, Issue 10, pages 879–889.

Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH. (2009) ***Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease.*** Nat Med. (3):331-7.

Nakanishi S. (1992) ***Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function.*** Science. 258(5082):597-603.

Navakkode et al. (2012) ***Cooperation between cholinergic and glutamatergic receptors are essential to induce BDNF-dependent long-lasting memory storage.*** Hippocampus. 22(2):335-46.

Nikoletopoulou V, Lickert H, Frade JM, Rencurel C, Giallonardo P, Zhang L, Bibel M, Barde YA. (2010) ***Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not.*** Nature. 467(7311):59-63.

Ninan I, Bath KG, Dagar K, Perez-Castro R, Plummer MR, Lee FS, Chao MV. (2010) ***The BDNF Val66Met polymorphism impairs NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the hippocampus.*** J Neurosci. 30(26):8866-70.

Ozgen N, Obreztkhikova M, Guo J, Elouardighi H, Dorn GW 2nd, Wilson BA, Steinberg SF. (1997) ***Protein kinase D links Gq-coupled receptors to cAMP response element-binding protein (CREB)-Ser133 phosphorylation in the heart.*** J Biol Chem. 283(25):17009-19.

Pattwell SS, Bath KG, Perez-Castro R, Lee FS, Chao MV, Ninan I. (2012) ***The BDNF Val66Met polymorphism impairs synaptic transmission and plasticity in the infralimbic medial prefrontal cortex.*** J Neurosci. 32(7):2410-21.

Peterson TA, Stamnes M. (2013) ***ARF1-regulated coatomer directs the steady-state localization of protein kinase C epsilon at the Golgi apparatus.*** Biochim Biophys Acta. 1833(3):487-93.

Petreanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K. (2009) ***The subcellular organization of***

neocortical excitatory connections. Nature. 457(7233):1142-5.

Platta HW, Stenmark (2011) *Endocytosis and signaling*. H. Curr Opin Cell Biol. 23(4):393-403.

Poolos N. y Daniel Johnston. (2012) *Dendritic ion channelopathy in acquired epilepsy*. Epilepsia, 53(Suppl. 9):32–40, 2012

Puehringer D1, Orel N, Lüningschrör P, Subramanian N, Herrmann T, Chao MV, Sendtner M. (2013) *EGF transactivation of Trk receptors regulates the migration of newborn cortical neurons*. Nat Neurosci. (4):407-15.

Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS, Chao MV. (2004) *Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes*. J Neurosci. 24(30):6650-8.

Rauskolb S, Zagrebelsky M, Dreznjak A, Deogracias R, Matsumoto T, Wiese S, Erne B, Sendtner M, Schaeren-Wiemers N, Korte M, Barde YA.(2010) *Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth*. J Neurosci. 30(5):1739-49.

Reichardt LF. (2006) *Neurotrophin-regulated signalling pathways*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 361(1473):1545-64. Review.

Rey O, R. JR Jr, Zhukova E, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. (2004) *G protein-coupled receptor-mediated phosphorylation of the activation loop of protein kinase D: dependence on plasma membrane translocation and protein kinase Cepsilon*. J Biol Chem. 279(33):34361-72.

Righi M, Tongiorgi E, Cattaneo A. (2000) *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway*. J Neurosci. 20(9):3165-74.

Robinson RC, Radziejewski C, Spraggon G, Greenwald J, Kostura MR, Burtnick LD, Stuart DI, Choe S, Jones EY. (1999) *The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site*. Protein

Sci. (12):2589-97.

Rocamora N, Pascual M, Acsàdy L, de Lecea L, Freund TF, Soriano E. (1996) *Expression of NGF and NT3 mRNAs in hippocampal interneurons innervated by the GABAergic septohippocampal pathway*. Kermani P. and Hempstead B. (2007) *Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis*. Trends Cardiovasc Med. (4):140-3.

Rong J, McGuire JR, Fang ZH, Sheng G, Shin JY, Li SH, Li XJ. (2006) *Regulation of intracellular trafficking of huntingtin-associated protein-1 is critical for TrkA protein levels and neurite outgrowth*. J Neurosci. 26(22):6019-30.

Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramée GR, Nikolics K, Winslow JW. (1990) *Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor*. Neuron. (5):767-73.

Sampo B, Kaech S, Kunz S, Banker G. (2003) *Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface*. Neuron. 37(4):611-24.

Saxena S, Bucci C, Weis J, Kruttgen A. (2005) *The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA*. J Neurosci. 25(47):10930-40.

Schonteich E, Wilson GM, Burden J, Hopkins CR, Anderson K, Goldenring JR, Prekeris R. (2008) *The Rip11/Rab11-FIP5 and kinesin II complex regulates endocytic protein recycling*. J Cell Sci. 121(Pt 22):3824-33.

Scott, A, Antal, C y Newton, A.(2013) *Electrostatic and Hydrophobic Interactions Differentially Tune Membrane Binding Kinetics of the C2 Domain of Protein Kinase C*. Vol. 288, N°. 23, pp. 16905–16915.

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chrétien M, Murphy RA. (1996) *Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases*. Biochem J. 314 (Pt 3):951-60.

Sendtner M, Holtmann B, Hughes RA. (1996) *The response of motoneurons to*

neurotrophins. Neurochem Res. (7):831-41.

Silverman MA, Kaech S, Jareb M, Burack MA, Vogt L, Sonderegger P, Banker G. (2001) **Sorting and directed transport of membrane proteins during development of hippocampal neurons in culture.** Proc Natl Acad Sci U S A. 98(13):7051-7.

Simonato M, Bregola G, Armellin M, Del Piccolo P, Rodi D, Zucchini S, Tongiorgi E. (2002) **Dendritic targeting of mRNAs for plasticity genes in experimental models of temporal lobe epilepsy.** Epilepsia. 43 Suppl 5:153-8.

Sprouston N. (2008) **Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration.** Nat Rev Neurosci. (3):206-21.

Suzuki S, Numakawa T, Shimazu K, Koshimizu H, Hara T, Hatanaka H, Mei L, Lu B, Kojima M. (2004) **BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation.** J Cell Biol. 167(6):1205-15.

Tongiorgi E, Righi M, Cattaneo A. (1997) **Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons.** J Neurosci. 17(24):9492-505.

Ultsch MH1, Wiesmann C, Simmons LC, Henrich J, Yang M, Reilly D, Bass SH, de Vos AM. (1999) **Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC.** J Mol Biol. 290(1):149-59.

Unsain N, Montroull LE, Mascó DH. (2009) **Brain-derived neurotrophic factor facilitates TrkB down-regulation and neuronal injury after status epilepticus in the rat hippocampus.** J Neurochem. 111(2):428-40.

Wagner N, Wagner KD, Theres H, Englert C, Schedl A, Scholz H. (2005) **Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1.** Genes Dev. 19(21):2631-42.

Waldron RT, Innamorati G, Torres-Marquez ME, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. (2012) **Differential PKC-dependent and -independent PKD activation by G protein α subunits of the Gq family: selective stimulation of PKD Ser⁷⁴⁸ autophosphorylation by G α_q .** Cell Signal. (4):914-21.

Weinstein H. y Scarlata S. (2011) *The correlation between multidomain enzymes and multiple activation mechanisms--the case of phospholipase C β and its membrane interactions.* Biochim Biophys Acta. 1808(12):2940-7. Review.

Wisco D, Anderson ED, Chang MC, Norden C, Boiko T, Fölsch H, Winckler B.(2003) *Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons.* J Cell Biol. 162(7):1317-28.

Wu SH, Arévalo JC, Sarti F, Tessarollo L, Gan WB, Chao MV..(2009) *Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning/Kidins220 protein regulates dendritic branching and spine stability in vivo.* Dev Neurobiol. 69(9):547-57.

Xu B, Gottschalk W, Chow A, Wilson RI, Schnell E, Zang K, Wang D, Nicoll RA, Lu B, Reichardt LF. (2000) *The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB.* J Neurosci. 20(18):6888-97.

Yacoubian TA. y Lo DC. (2000) *Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth.* Nat Neurosci. (4):342-9.

Yap CC, Wisco D, Kujala P, Lasiecka ZM, Cannon JT, Chang MC, Hirling H, Klumperman J, Winckler B. (2008) *The somatodendritic endosomal regulator NEEP21 facilitates axonal targeting of LI/NgCAM.* J Cell Biol. 180(4):827-42.

Yeaman C, Le Gall AH, Baldwin AN, Monlauzeur L, Le Bivic A, Rodriguez-Boulan E. (1997) *The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells.* J Cell Biol. 1997 Nov 17;139(4):929-40.

Yuan *et al.*, 2000 *Activation of protein kinase D by signaling through the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G(q).* J Biol Chem. 275(3):2157-64.

Zhao L, Sheng AL, Huang SH, Yin YX, Chen B, Li XZ, Zhang Y, Chen ZY. (2009) *Mechanism underlying activity-dependent insertion of TrkB into the neuronal surface.* J Cell Sci. 122(Pt 17):3123-36.

Zheng J, Shen WH, Lu TJ, Zhou Y, Chen Q, Wang Z, Xiang T, Zhu YC, Zhang C, Duan S, Xiong ZQ.
(2008) *Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth.* J Biol Chem. 283(19):13280-8.

Zuccato C. y Cattaneo E. (2009) *Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases.*
Nat Rev Neurol. (6):311-22. Review.