

Tesis Doctoral

Estudio del papel de las palmitoil-proteínas en la regeneración del sistema nervioso, la importancia de la palmitoilación y la ubicación en dominios lipídicos de la membrana en su función

González Polo, Virginia

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

González Polo, Virginia. (2011). Estudio del papel de las palmitoil-proteínas en la regeneración del sistema nervioso, la importancia de la palmitoilación y la ubicación en dominios lipídicos de la membrana en su función. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

González Polo, Virginia. "Estudio del papel de las palmitoil-proteínas en la regeneración del sistema nervioso, la importancia de la palmitoilación y la ubicación en dominios lipídicos de la membrana en su función". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

***ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS PALMITOIL-PROTEÍNAS
EN LA REGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO, LA
IMPORTANCIA DE LA PALMITOILACIÓN Y LA
UBICACIÓN EN DOMINIOS LIPÍDICOS DE LA
MEMBRANA EN SU FUNCIÓN***

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Biológica.

Lic. Virginia Gonzalez Polo

Director: Dr. Sean Patterson

Consejero de estudios: Dra. Silvia Moreno

**Lugar de trabajo: IHEM-CONICET. Universidad Nacional de Cuyo,
Mendoza, Argentina**

Buenos Aires, *Febrero 2011*

Estudio del papel de las palmitoil-proteínas en la regeneración del sistema nervioso, la importancia de la palmitoilación y la ubicación a dominios lipídicos de la membrana en su función

La S-palmitoilación ha sido propuesta de tener un papel fundamental en la asociación de proteínas citoplasmáticas con la membrana. Nuestro objetivo fue evaluar el papel de la S-palmitoilación en la transducción de señales en neuronas, en tres modelos de investigación: (i) el aislamiento de dominios membranales resistentes a la solubilización con detergentes (DRMs) de sinaptosomas de cerebro de la rata adulta, (ii) la asociación a membranas artificiales de una proteína neuronal palmitoilada y (iii) una visión funcional de la expresión de proteínas palmitoiladas ante un estímulo fisiológico. En el primer modelo de DRMs pudimos ver con el tratamiento con la proteasa trombina y dibutilil AMPc la translocación de ciertas palmitoil-proteínas a DRMs. Complementariamente en el modelo de liposomas estudiamos la asociación de la proteína neuronal GAP-43 palmitoilada ó no a las membranas artificiales de distinta composición. Nuestros resultados nos llevaron a proponer que en la interacción de la proteína GAP-43 con la membrana es influenciada por efectos electrostáticos. Para analizar la influencia del extremo amino terminal en la asociación de GAP-43 sin palmitoilar a la membrana abordamos la técnica de resonancia paramagnética electrónica (EPR). No pudimos observar diferencias estructurales en la proteína asociada a los liposomas en comparación con la proteína libre mediante esta técnica. Finalmente para poner la S-palmitoilación en un contexto funcional, analizamos la expresión y compartimentalización subcelular de varias palmitoil-proteínas durante la injuria y regeneración neuronal, trabajando con un modelo de axotomía unilateral del nervio ciático en ratas adultas. Entre las proteínas analizadas la expresión de la proteína quinasa lyn mostró un aumento significativo en la rama periférica pero no central ante el estímulo de la lesión del nervio ciático. Como conclusión general de nuestros resultados podemos decir que las proteínas palmitoiladas están involucradas activamente en procesos tan importantes como la regeneración neuronal y plasticidad sináptica. En un futuro trabajo y gracias a los avances logrados en la técnica de detección de proteínas palmitoiladas estaremos en condiciones de analizar el estado de palmitoilación de las proteínas involucradas en la regeneración neuronal y durante la remodelación sináptica fisiológica y patológica.

S-palmitoilación, DRMs, Liposomas, Regeneración, Sinaptosomas, GAP-43

Study of the role of palmitoyl-proteins in the regeneration of the nervous system and the importance of the S-palmytoilation in the location into the membrane lipids domains for their function.

S-palmytolation has been proposed to have a major role in protein-membrane association. Our major objective was to evaluate the role of the S-palmytoilation in the neural intracellular signal transduction. We used three biological systems, (i) the isolation and evaluation of detergent resistant membrane (DRM) domains from adult rat brain synaptosomes, (ii) the association with artificial membranes of a palmytoil protein (iii) and a functional vision of the palmytoil protein because of physiological stimuli. The first approach consisted in the isolation and evaluation of detergent resistant membrane domains from adult rat brain synaptosomes. We saw that the treatment with thrombin and dibutiril cAMP translocated some palmytoil-proteins to DRMs. Complementary we measured the association of the neural GAP-43 S-palmytoilated protein to artificial membranes and to different lipid compositions in vitro. Our results led us to propose that the interaction of the protein GAP-43 with the lipid membrane is influenced by electrostatics forces. We wanted to analyze the influence of the amino terminal end in the association of GAP-43 with the membrane .We used the novel technique Electron Paramagnetic Resonance (EPR). No structural difference was observed when the protein was associated with membrane lipids or free. Additionally, using a unilateral sciatic nerve injury rat model, we analyzed the S-palmytolation of proteins ex vivo during axonal injury and regeneration. The protein lyn showed an increment in the peripherals stream but not in the central by the injury stimuli. Our general conclusion was that the palmytoilated proteins was involved actively in as important processes as neuronal regeneration and synaptic plasticity. In the future work and thanks to the advances obtained in the technique of palmytoil-protein detection we will be able to analyze the state of palmytoilation of the proteins involved in neuronal regeneration and during the physiological and pathological synaptic remodeling.

S-palmytoilation, DRMs, Liposomes, Regeneration, Sinaptosomes, GAP-43

Agradecimientos

- *A mi Director el Dr. Sean Patterson que confió en mi..*
- *A mi familia por apoyarme en todo momento.*
- *A la Dra. Ana Gennaro y Pablo Rodi, con quienes fue un placer trabajar.*
- *A la Dra. Silvia Moreno y Dra. Silvia Rossi cuyos consejos y enseñanzas me sirvieron mucho para esta tesis.*
- *Al Dr. Luis Mayorga y a la Dra. Claudia Tomes quienes generosamente nos prestaron muchos de los materiales y equipos para realizar esta tesis.*
- *A mi amiga la Dra. Burgueño que me corrigió toda la tesis, en tiempo record y con la mejor intención.*
- *A todos mis amigos.*
- *A Jime y Chelo que me ayudaron incondicionalmente en hospedaje, consejos, materiales, equipos, comidas ricas y sobre todo amistad sincera.*
- *A las chicas del Lab de Mendoza: Vale, Chechu, Tere, Laura y Naty Z. Por tantas horas en el laboratorio y fuera de él que compartimos todos estos años.*
- *Al grupo de Neuro: Dra. Alicia Selzer, Dra. Estela Muñoz, Analía, Sergio y Luis. Que me ayudaron espiritualmente y experimentalmente a terminar este trabajo.*
- *A mi amiga de siempre: Laurita.*
- *A mis amigos los biólogos por estar siempre, apoyarme y quererme. (en las buenas y en las malas): Adri, Juli, Diego, Ariel, Ceci, Nati F, Nati G, Pao, Caro, Cyn, Dani, Sarita y Marian.*
- *A mis amigas no científicas March, Kari, Gabi y Guada, que también me ayudaron con sus buenas energías.*

Sinceramente gracias a todos

***ESTA TESIS ES PARA MI HIJA
QUIEN ME AGUANTÓ TANTAS
HORAS FRENTE A LA
COMPUTADORA Y TAN LEJOS DE LA
PLAZA***

Índice

Hipótesis	9
Capítulo 1: Introducción general.....	12
El sistema nervioso.....	13
Las neuronas y la Glía.....	15
La sinapsis.....	22
Plasticidad sináptica.....	23
Crecimiento y direccionamiento axonal.....	24
Proteínas de matriz extracelular.....	26
Neurotrofinas.....	30
Injuria y regeneración del sistema nervioso.....	34
Mecanismos de involucrados en una regeneración exitosa.....	36
Señalización axonal de la injuria.....	39
Expresión de genes asociados al crecimiento neuronal.....	40
GAP-43.....	41
Familia de proteínas src.....	42
Trombina y receptores activados por proteasas.....	44
Thy-1.....	44
Modelo de sinaptosomas.....	47
Dominios membranales ricos en colesterol.....	49
Acilación de proteínas.....	50
S-palmitoilación de proteínas.....	52
Capítulo 2: Materiales y métodos.....	57

Animales.....	58
Reactivos.....	58
Preparación de sinaptosomas.....	58
Preparación de DRMs de sinaptosomas.....	59
Electroforesis y Western Blot.....	60
Quimioluminiscencia.....	61
Anticuerpos	61
Cepas utilizadas de <i>Escherichia coli</i> :.....	62
Plásmidos.....	62
Preparación de bacterias <i>E.coli</i> competentes.....	62
Transformación de bacterias <i>E.coli</i> competentes.....	63
Extracción de ADN plasmídico.....	63
Expresión y purificación de la proteína GAP-43.....	63
Fosforilación in vitro de GAP-43.....	64
Palmitoilación in vitro de GAP-43 o BSA.....	64
Preparación de ³ H-palmitoil-CoA.....	65
Fluorografía de geles SDS-PAGE.....	65
Preparación de liposomas.....	65
EPR.....	65
Marcación metabólica de sinaptosomas con ³ H-palmitato.....	66
Ensayo de intercambio químico del ácido graso (ABE).....	66
Axotomía unilateral.....	68
Extracción y preparación de las muestras para Western blot.....	69
Preparación de las muestras para inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	70
Preparación de portaobjetos para montaje de secciones.....	70

Immunofluorescencia indirecta (IFI).....	71
Análisis estadístico.....	73
Resultados.....	72
Capítulo 3: Regulación de la composición de complejos submembranales en respuesta a señales de desarrollo y regulación	
Introducción al capítulo 3.....	74
Resultados y discusión.....	78
Conclusión del capítulo.....	92
Capítulo 4: Implementación de dos técnicas para el análisis de la S-palmitoilación	
Introducción al capítulo 4.....	96
Resultados y discusión.....	98
Conclusión del capítulo.....	107
Capítulo 5: Análisis de la palmitoilación y la asociación a membranas artificiales de la proteína GAP-43.	
Introducción al capítulo 5.....	109
Resultados y discusión.....	112
Conclusión del capítulo.....	128
Capítulo 6: Determinación de los efectos de la axotomía sobre la expresión proteínas palmitoiladas relacionadas con la regeneración axonal.	
Introducción al capítulo 6.....	131
Resultados y discusión.....	133
Conclusión del capítulo 6.....	153
Capítulo 7: Conclusiones generales.....	156
Apéndice EPR.....	160
Bibliografía.....	167

Hipótesis general del trabajo

La S-palmitoilación es una modificación postraducciona de muchas proteínas relacionadas con el crecimiento neuronal e influye en su ubicación en dominios membranales resistentes a detergentes (DRMs). Además esta modificación es dinámica en estas proteínas y su tasa de palmitoilación/depalmitoilación se ve modificada ante determinados estímulos celulares relacionados con el crecimiento neuronal. Por lo que nosotros planteamos que cuando en particular un estímulo externo (como es una lesión provocada en un nervio periférico, como el ciático) provoca la expresión de proteínas relacionadas con el crecimiento en el ganglio de la raíz dorsal (DRG) y el transporte de las mismas a las diferentes regiones anatómicas tanto hacia la raíz dorsal como hacia la región periférica del nervio.

Hipótesis específicas

Hipótesis 1: La ubicación en la membrana de proteínas que intervienen en el crecimiento neuronal varía ante estímulos externos e internos translocando diferencialmente a dominios resistentes a detergentes o DRMs.

Hipótesis 2: La palmitoilación de proteínas neuronales se ve influenciada ante estímulos relacionados con el crecimiento neuronal, como NGF (nerve growth factor), AMPc (adenosina monofosfato cíclica), ionóforo de calcio (A23187), Trombina o PMA (Forbol 12-miristato, 13-Acetato).

Hipótesis 3: La asociación de la proteína GAP-43 a membranas está influenciada por fuerzas electrostáticas de ciertas regiones básicas o hidrofóbicas de los palmitatos cuando está S-palmitoilada.

Hipótesis 4: La injuria neuronal producida por la lesión del nervio ciático modifica la expresión de proteínas relacionadas con el crecimiento en distintas regiones como el DRG, la raíz dorsal o el nervio ciático.

Abreviaturas utilizadas

ABE: “Intercambio del grupo Acilo por Biotina” (Acyl Biotin Exchange,).

a₀ : Separación hiperfina isotrópica 0

AMPc: Adenosina Monofosfato Cíclica

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albúmina Sérica Bovina

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

CoA: Coenzima A

Col: Colesterol

DMPC: Dimiristoilfosfatidilcolina

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPS: Dipalmitoilfosfatidilserina

DRG: Ganglio de la Raíz Dorsal

DRM: Fracción de membrana resistente al detergente (*Detergent Resistant Membrane*)

DTT: Ditiotreitól

EPR: Resonancia Paramagnética Electrónica (*Electron Paramagnetic Resonance*)

ER: Retículo Endoplasmático

ERGIC: Compartimiento Intermedio de ER-Golgi

FGF: Fibroblast Growth Factor

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

IA: Iodoacetamida

IGF-I: Insulin-like growth factor

L_C: Fase líquido desordenada o líquido cristalina

L_O : Fase líquido ordenada

LUVs: Vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles*)

MT: Maleimido Tempo (4-maleimido-1-oxyl-2,2,6,6-tetrametilpiperidina)

NEM: N-etilmaleimida

NGF: Nerve Growth Factor.

NT: Neurotrofina.

N-terminal: Extremo amino terminal de las proteínas

NMR: Resonancia Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*)

NMT: N-miristoil transferasa

n-SASL: n-doxil-ácido esteárico

PC: Fosfatidilcolina
PI (4,5) P₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PI: Fosfatidilinositol
PKA: Proteína kinasa A
PKC: Proteína kinasa C
PMA: Forbol 12-miristato, 13-Acetato
PS: Fosfatidilserina
S_{APP}: Parámetro de orden aparente
SDS: Dodesilsulfato sódico
SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SNC: Sistema nervioso central
SNP: Sistema nervioso periférico
TCA: Ácido Tricloro Acético
TLC: Cromatografía en capa delgada
T_M: Temperatura de transición
TX-100: Triton X-100
 τ_c : Tiempo de correlación rotacional
ZERD: Zona de entrada a la raíz dorsal

Capítulo 1

Introducción general

1.1. El sistema nervioso

El sistema nervioso de los vertebrados superiores es uno de los más complejos y lleva a cabo funciones de intercambio de información entre las distintas partes de un individuo. El tejido nervioso está compuesto básicamente por dos tipos celulares: las células nerviosas o neuronas y las células gliales o glía (Purves et al., 2007). Las neuronas son la unidad funcional del sistema nervioso que a través de contactos celulares denominados sinapsis, constituyen la compleja red neuronal. La información fluye a través de esta red para conectar regiones tan remotas como los miembros con el cerebro y así cumplir con sus funciones fisiológicas (Purves et al., 2007).

En el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados las células gliales se encuentran entre 10 y 50 veces más abundantes que las neuronas. Los primeros trabajos describían a la glía con funciones únicamente de sostén, pero gradualmente se fueron descubriendo nuevas e importantes funciones llevadas a cabo por este tipo celular. En la actualidad se conocen una gran variedad de funciones vitales como la reabsorción de neurotransmisores o la presentación de antígenos entre otras funciones que cumple la glía dentro del sistema nervioso (Purves et al., 2007).

Anatomía del sistema nervioso

Desde un punto de vista anatómico estructural general el sistema nervioso de los vertebrados superiores puede dividirse en dos componentes principales: uno central y otro periférico. El sistema nervioso periférico (SNP) incluye tanto las neuronas sensitivas, que conectan el encéfalo con los receptores sensitivos de la periferia, así como las neuronas motoras, que conectan el encéfalo con los músculos y glándulas. Los elementos del sistema periférico están dedicados a la función motora y se categorizan a su vez en las divisiones somática y autónoma. La división somática inerva los músculos esqueléticos y la división autónoma inerva los músculos lisos, el músculo cardíaco y las glándulas (Purves et al., 2007).

Los componentes anatómicos principales del SNP son los ganglios y los nervios. Los ganglios se definen como acumulaciones de cuerpos de células nerviosas junto con células de sostén, y los nervios son haces de axones de células nerviosas y sus células de sostén. Los axones sensitivos y los ganglios sensitivos del sistema nervioso periférico recogen información acerca de acontecimientos en la superficie del cuerpo (así como dentro de él) y transmiten la información al sistema nervioso central para ser procesada. Los ganglios sensitivos se ubican adyacentes a la medula espinal (se denominan ganglios

de las raíces dorsales) y al tronco encefálico (los ganglios de los nervios craneanos) (Purves et al., 2007).

El sistema nervioso central (SNC) consta básicamente de dos partes el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo incluye: el bulbo raquídeo, la protuberancia, el cerebelo, el mesencéfalo, el diencefalo y los hemisferios cerebrales. Los hemisferios cerebrales representan el 85% del peso del encéfalo. Además de su tamaño otra característica significativa del encéfalo es su gran superficie altamente plegada. Estos plegamientos se conocen como circunvoluciones, y los valles se denominan surcos o si son muy profundos cisuras. Toda la superficie plegada de los hemisferios comprende una cáscara laminada de neuronas y células de sostén denominada corteza cerebral (Purves et al., 2007).

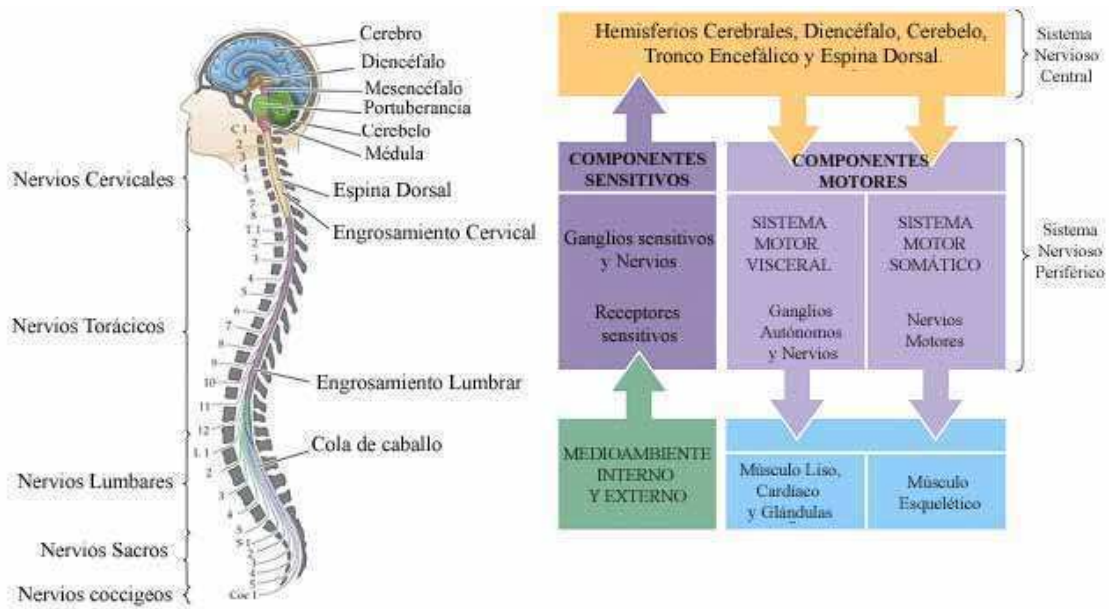
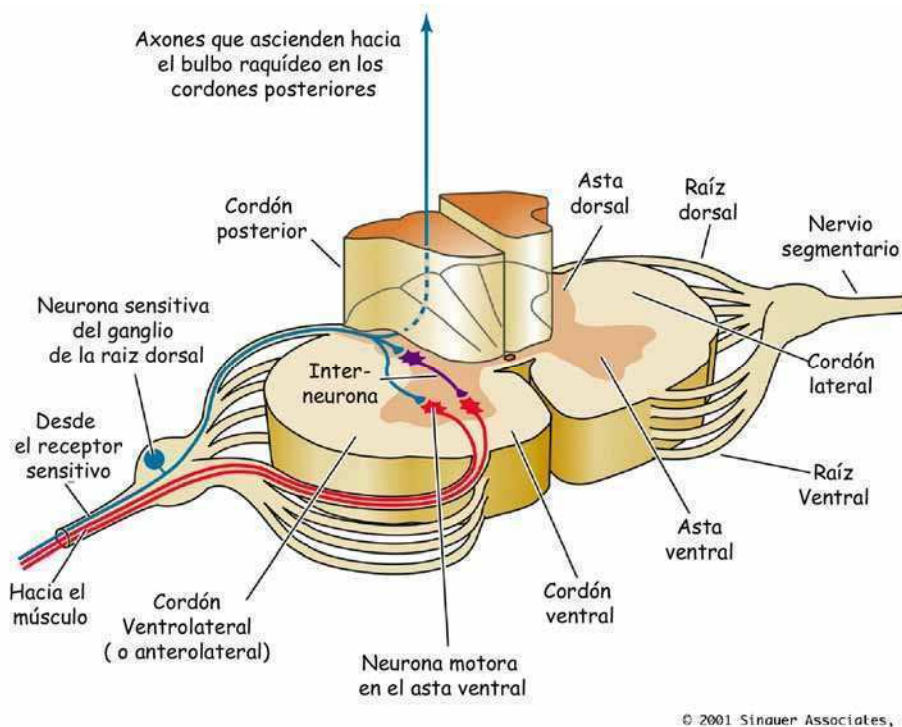


Figura 1.1- Esquema del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). En el esquema de la izquierda se ve la anatomía macroscópica del SN: cerebro, diencefalo, mesencéfalo, protuberancia, médula y espina dorsal. También podemos observar la ubicación de los nervios del SNP. En el cuadro de la derecha se presenta un resumen los componentes del sistema nervioso central y periférico con sus interrelaciones. El sistema nervioso periférico puede dividirse en dos componentes: sensitivos los cuales son los encargados de captar el medio ambiente interno y externo llevando esa información al SNC a través de ganglios sensitivos y nervios. Los componentes motores son los encargados de llevar a cabo las acciones a los músculos (liso o esquelético) procesadas por el sistema nervioso. Figura tomada y adaptada del libro Neuroscience, Purves et al, 2007.

Otra parte importante del SNC es la medula espinal la cual se localiza en el conducto raquídeo de la columna vertebral. La medula espinal puede dividirse en las regiones cervical, torácica, lumbar, sacra y coccígea. Los nervios periféricos que inervan la mayor parte del cuerpo surgen de la médula espinal como pares de nervios espinales segmentarios. La información sensitiva transmitida por los axones aferentes en los nervios periféricos ingresa a la medula espinal a través de las raíces dorsales, las órdenes motoras transmitidas por los axones eferentes abandonan la medula espinal a través de las raíces ventrales. Una vez que las raíces se unen, los axones sensitivos y motores (con algunas excepciones) viajan juntos en los nervios espinales segmentarios (Purves et al., 2007).

En la especie humana la región cervical de la medula espinal da origen a ocho nervios cervicales (C1-C8), la región torácica a doce nervios torácicos (T1-T12), la región lumbar a cinco nervios lumbares (L1-L5), la región sacra a cinco nervios sacros (S1-S5) y la región coccígea a un nervio coccígeo. Dado que la medula espinal es considerablemente más corta que la columna vertebral, los nervios lumbares y sacros recorren cierta distancia en el conducto raquídeo antes de salir, formando la colección de raíces nerviosas una estructura conocida como cola de caballo. La medula espinal presenta ensanchamientos en ciertas zonas para acomodar la cantidad de células nerviosas necesarias para procesar la información relacionada a las extremidades superiores e inferiores. El interior de la medula espinal central se encuentra organizado en dos regiones muy diferentes denominadas sustancia gris y blanca. La sustancia gris consta de células nerviosas y las porciones proximales de sus prolongaciones que están rodeadas de neuroglia. Los axones que ingresan a la corteza así como los que la abandonan, forman la sustancia blanca, que constituye gran parte del tejido subcortical de los hemisferios (Purves et al., 2007).



© 2001 Sinauer Associates, Inc.

Figura 1.2- Estructura interna de la médula espinal. Diagrama de la estructura interna de la médula espinal en el corte transversal, que muestra la posición de los principales cordones de sustancia blanca y otras características. En azul se dibuja la neurona sensitiva del ganglio de la raíz dorsal que comunica desde el receptor sensitivo hacia la neurona motora en el asta ventral, inter-neuronas o ascendiendo los axones hasta el bulbo raquídeo por el cordón posterior. En color rojo se muestra la neurona motora y su recorrido hacia el músculo. Figura tomada y modificada del libro Neuroscience, Purves et al 2007 (Purves et al., 2007).

Las vías ascendentes de la sustancia blanca están subdivididas en los cordones dorsales (o posteriores), laterales y ventrales (o anteriores), cada uno de los cuales contiene haces de axones relacionados con funciones específicas. Los cordones laterales incluyen los axones que viajan desde la corteza cerebral para hacer contacto con las neuronas espinales motoras. Los cordones dorsales transmiten información sensitiva ascendente desde los mecano-receptores somáticos y los cordones ventrales (y ventrolaterales) transmiten tanto información termoalgésica ascendente como la información motora descendente (Figura 1.2) (Purves et al., 2007).

La sustancia gris de la médula espinal está dividida en las astas dorsales y ventrales (o posteriores y anteriores). Las neuronas del asta dorsal reciben información sensitiva que ingresa a la médula espinal a través de las raíces dorsales de los nervios espinales. El asta ventral contiene los cuerpos celulares de las neuronas motoras que envían axones a través de las raíces ventrales para terminar sobre los músculos estriados.

Para resumir la organización de la medula espinal en una regla general podemos decir que las neuronas que procesan la información sensitiva se localizan dorsalmente, mientras que las neuronas que procesan la información motora se localizan ventralmente. Las neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo se localizan en una zona intermedia entre las astas dorsales y ventrales (Purves et al., 2007).

Las neuronas

Las neuronas son células nerviosas muy especializadas en la comunicación intercelular y debido a esta función su arquitectura es muy particular para poder llevarla a cabo eficientemente. Estas células poseen un cuerpo celular o soma, del cual se desprenden principalmente dos tipos de prolongaciones protoplasmáticas o neuritas que se pueden clasificar en axón o dendritas según la función que cumplen (Kandel et al., 2000) (Figura 1.3). El axón es una extensión única del cuerpo celular cuya función es transmitir la información desde el soma hacia otras conexiones intercelulares. A diferencia las dendritas pueden ser múltiples y son las encargadas de recibir la información que llega al soma neuronal desde otra neurona de la red (Kandel et al., 2000).

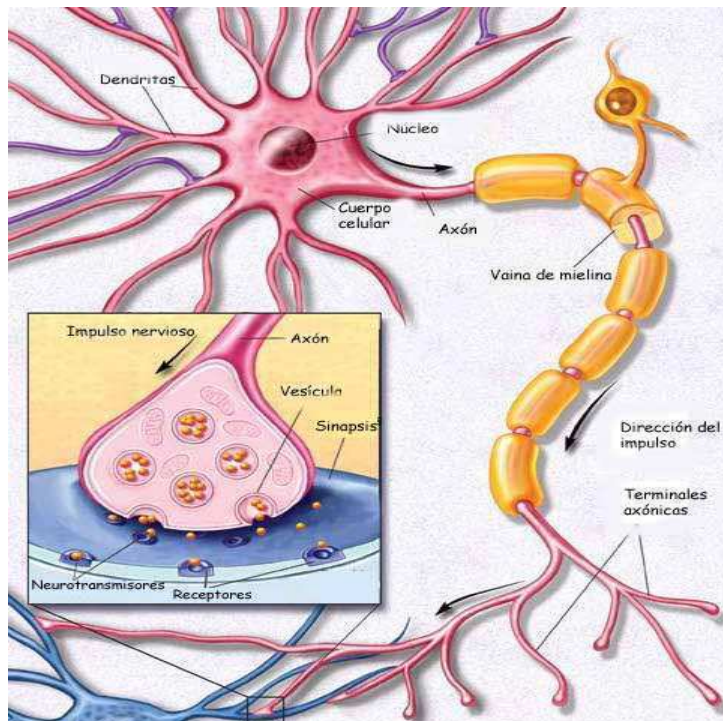


Figura 1.3- La Neurona y la sinapsis. Neurona multipolar mielinizada que se conecta con otra neurona a través de la sinapsis. En la ampliación se puede observar en más detalle la terminal sináptica o sinapsis que presenta las vesículas sinápticas con los neurotransmisores.

Las neuronas pueden clasificarse según su morfología en unipolares, bipolares, pseudo-unipolares o multipolares. Las neuronas bipolares cuentan con un cuerpo celular alargado y en cada extremo nace una sola neurita. Se encuentran ejemplos de este tipo de neurona en las celulares retinianas y en las células de los ganglios sensoriales vestibular y coclear. Existen otra clase de neuronas que llevan información sensorial, hacia la columna vertebral, pertenecientes a la subclase de bipolares designada como pseudo-unipolares. Durante el desarrollo de estas células las dos ramificaciones se fusionan y emergen del cuerpo celular como una rama única. Luego en el crecimiento se separan en dos axones, uno de ellos va periféricamente hacia el músculo y la piel y el otro centralmente hacia la columna vertebral. Un claro ejemplo de esta clase de neuronas son las del ganglio de la raíz dorsal, o DRG (Kandel et al., 2000).

Otra clase de neuronas muy abundantes son las multipolares a la cual pertenecen la mayor parte de las neuronas del encéfalo y la medula espinal. Estas neuronas poseen varias neuritas que nacen en el cuerpo celular y con la excepción de la larga prolongación, el axón, el resto de las neuritas son dendritas (Figura 1.4). Otra forma de clasificar las neuronas es según la función que cumplen dentro del sistema nervioso denominándolas: sensoriales, motoras o inter-neuronas. Las neuronas sensoriales tienen acoplados receptores especializados en detectar y responder a diferentes estímulos del ambiente interno y externo. Las neuronas motoras son las que controlan la actividad de los músculos y las responsables de todas las formas de movimientos. Y las más abundantes las inter-neuronas son las encargadas de conectar las neuronas motoras y las sensoriales. Este tipo de neuronas median desde los reflejos simples hasta las funciones más complejas del cerebro (Purves et al., 2007).

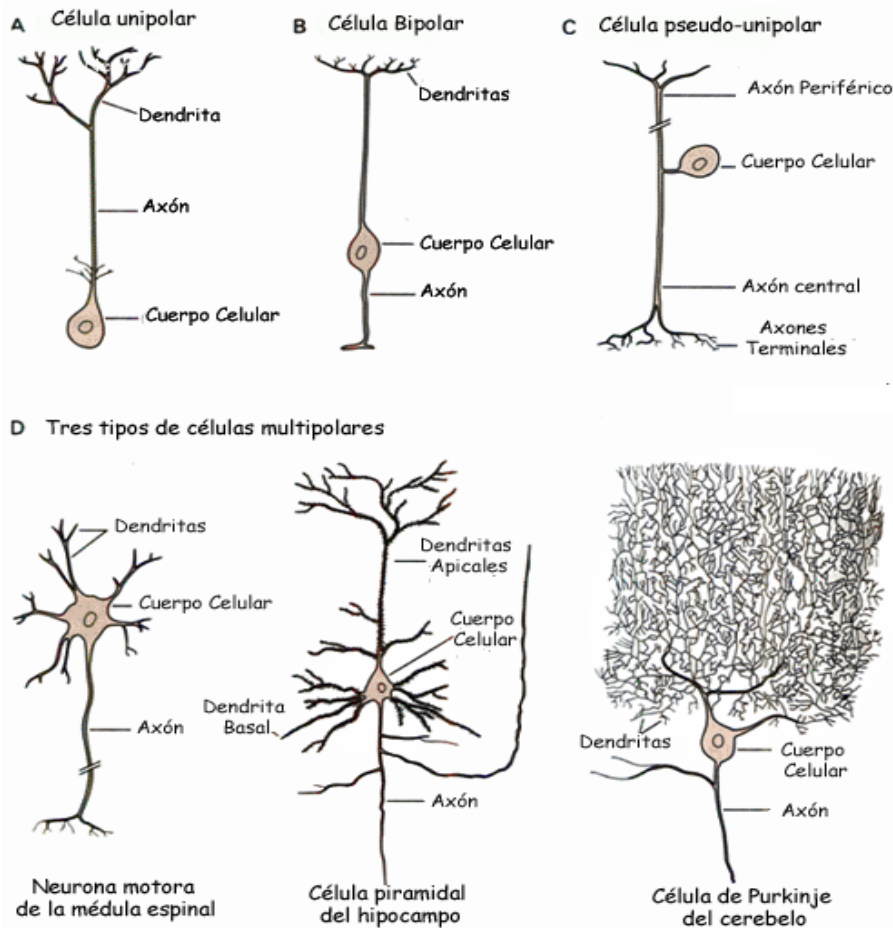


Figura 1.4- Las neuronas pueden ser clasificadas en unipolares, bipolares o multipolares de acuerdo con el número ramificaciones que se originan desde el cuerpo celular. **A-** Las células unipolares tienen una sola ramificación con diferentes segmentos que sirven como superficies receptoras o terminales liberadores. Las células unipolares son características del sistema nervioso de invertebrados. **B-** Las células bipolares tienen dos ramificaciones principales que están funcionalmente especializadas: la dendrita que lleva información hacia la célula, y el axón que transmite información hacia otras células. **C-** Ciertas neuronas que llevan información sensorial, como la información de tacto y presión, hacia la columna vertebral pertenece a la subclase de neuronas bipolares designada como pseudo-unipolares. **D-** Las células multipolares tienen un axón y muchas dendritas. Los tres ejemplos ilustrados muestran la amplia diversidad de las mismas. Neuronas motoras (derecha) son las que inervan las fibras musculares esqueléticas. Las células piramidales (medio) tienen un cuerpo celular triangular donde las dendritas emergen por el ápice (dendrita apical) y en la base (dendritas basales). Las células piramidales se encuentran principalmente en el hipocampo y la corteza cerebral. Las células de Purkinje del cerebelo (izquierda) se caracterizan por un extenso árbol dendrítico en uno de sus planos. Figura tomada y modificada del libro Kandel- Principes of Neural Science (Kandel et al., 2000).

La glía

Las células gliales son muy diferentes de las neuronas tanto a nivel funcional como anatómico pero no menos importantes en el funcionamiento del sistema nervioso. La principal diferencia funcional es que la glía no participa directamente en la señalización eléctrica, aunque sus funciones son importantes para mantener las capacidades de señalización entre las neuronas. Entre las novedosas funciones de la glía puede destacarse el control de la formación y función de la sinapsis, la modulación de la acción sináptica controlando la captación de neurotransmisores, el auxilio en la recuperación de una lesión nerviosa, la regulación del tono cerebrovascular, regulación inmune y neurogénesis adulta (He and Sun, 2007). Existen principalmente tres tipos de células gliales en el sistema nervioso: las células ependimarias, las células de la microglía y las de la macroglía (Figura 1.3).

Las células ependimarias revisten las cavidades o ventrículos del encéfalo y el conducto central de la medula espinal. La microglía está formada por células más pequeñas derivadas de las células madre hematopoyéticas. Muchas de sus funciones son compartidas con los macrófagos tisulares, principalmente la fagocitosis de restos celulares consecuencias de lesiones, enfermedades o infecciones en el sistema nervioso central (SNC) (He and Sun, 2007).

La macroglía consta de varios tipos celulares: los astrocitos, los oligodendrocitos y las células de Schwann. Los astrocitos están limitados al encéfalo y la medula espinal. En su cuerpo celular tienen prolongaciones que le brinda un aspecto estrellado, por el cual se originó su nombre. Su función principal es mantener el medio químico apropiado para la señalización neuronal. Mantienen un riguroso control del medio extracelular, concentración de electrolitos, pH, homeostasis y niveles de glucosa. También son eficientes limpiadores de los productos de desecho de las neuronas, incluyendo productos metabólicos y neurotransmisores

Los astrocitos también cumplen un muy importante papel en la barrera hematoencefálica (blood-brain barrier), manteniendo un contacto íntimo tanto con las entidades neuronales como con las vasculares (Kandel et al., 2000). Clásicamente se los ha identificado citológicamente por la expresión de la proteína GFAP (glial fibrillary acidic protein), la cual se ha convertido en un marcador específico de este tipo celular.

Los oligodendrocitos están limitados a ambiente del sistema nervioso central (SNC). Depositatan una envoltura laminada que se denomina mielina alrededor de algunos axones, dando a la neurona importantes ventajas sobre la velocidad de conducción del potencial de acción. En el sistema nervioso periférico, las células encargadas de elaborar la mielina son las células de Schwann. A diferencia de los oligodendrocitos estas células recubren solo una parte de un único axón mielinizado (Kandel et al., 2000).

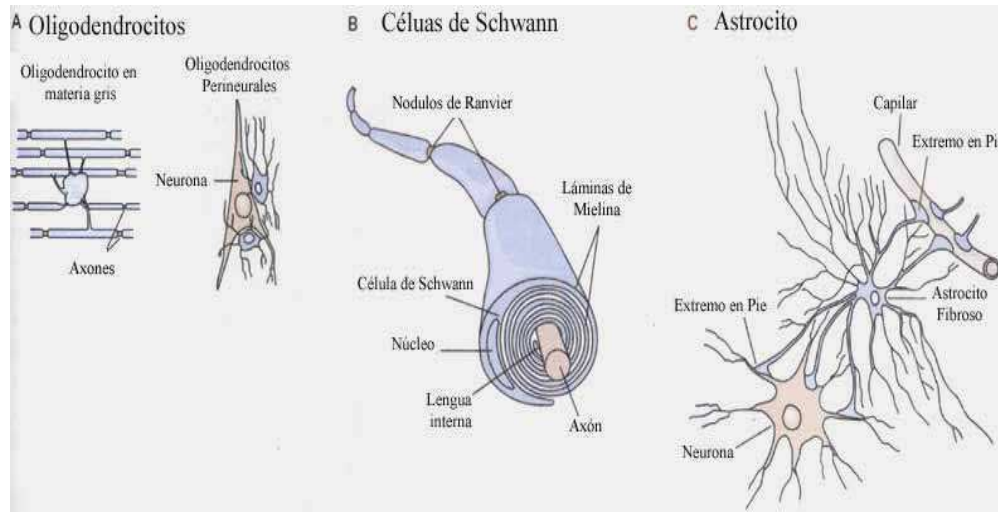


Figura 1.5- Los principales tipos de células gliales en el sistema nervioso son los astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann. A- Oligodendrocitos son células pequeñas con relativamente pocos procesos. En la materia blanca (derecha) ellos proveen la mielina y en la materia gris (izquierda) los oligodendrocitos perineurales rodean y soportan el cuerpo celular de las neuronas. B- Células de Schwann proveen las vainas de mielina en los axones del sistema nervioso periférico. Cada célula de Schwann, se posiciona a la largo de un solo axón formando segmentos de mielina de 1mm de longitud. Cada vaina esta formada como una lengua interna de la célula de Schwann que gira alrededor del axón varias veces cubriendo con capas concéntrica de membrana. Los intervalos entre los segmentos de mielina se conocen como nodulos de Ranvier. C- Los Astrocitos son las células gliales más numerosas del sistema nervioso central, se caracterizan por su forma de estrella y su amplia terminal en forma de pie. Debido a este pie el astrocito puede estar en contacto con capilares y neuronas, con funciones nutritivas. Los astrocitos también juegan un papel importante en la formación de la barrera hematoencefálica. Figura adaptada del libro Kandel- Principes of Neural Science (Kandel et al., 2000).

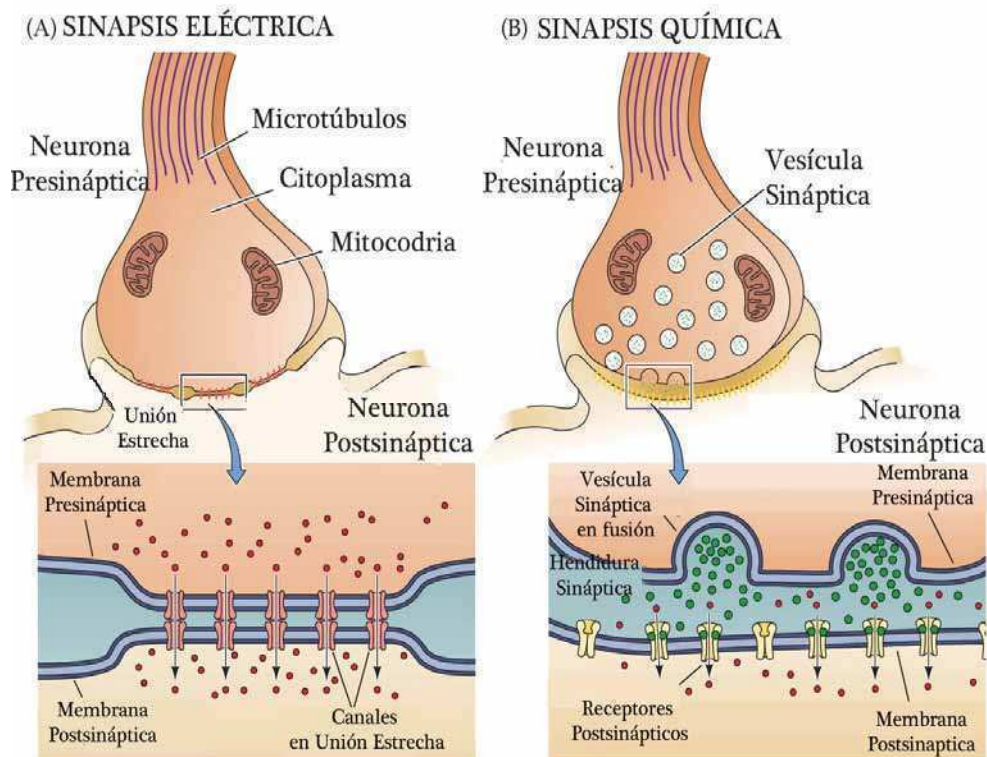
1.2 La sinapsis

En esta compleja red neuronal que constituye el sistema nervioso las neuronas se conectan unas con otras a través de uniones especiales denominadas sinapsis. LA cual de define como la unión entre la terminal axónica y la neurona, célula muscular o glandular en algunos casos. Existen dos tipos de sinapsis con características y funcionamientos muy diferentes: las químicas o las eléctricas (Purves et al., 2007).

Una característica anatómica diferencial de la sinapsis química es la terminación nerviosa que se encuentra separada de la superficie de la otra célula por un espacio intercelular llamado hendidura sináptica. La sinapsis se encuentra polarizada, es decir que el impulso nervioso viaja siempre en un solo sentido desde el axón hasta la siguiente célula, listas para la fusión con la membrana en respuesta a un potencial de acción. La membrana de la dendrita (membrana postsináptica) está enriquecida en receptores de neurotransmisores, proteínas de andamiaje y proteínas especializadas en señalización (densidad postsináptica), las cuales responden a la liberación de neurotransmisores para iniciar un nuevo potencial de acción. La terminal axónica (membrana presináptica) se encuentra llena de neurotransmisores contenidos en vesículas sinápticas (Purves et al., 2007).

En las sinapsis eléctricas en cambio las membranas de ambas neuronas están en contacto a través de una unión estrecha. A través de esta unión las sustancias pueden difundir simplemente a través del citoplasma de las neuronas presináptica y postsináptica. Las sinapsis eléctricas funcionan permitiendo que la corriente eléctrica fluya pasivamente a través de los poros de la unión estrecha. Por lo tanto el impulso nervioso es transmitido, sin la existencia de hendidura sináptica y ni liberación de neurotransmisores (Purves et al., 2007).

En la formación de la sinapsis están involucrados muchos procesos moleculares y celulares, que incluyen el contacto entre las estructuras presinápticas y postsinápticas, la formación de la sinapsis temprana, la estabilización y diferenciación de la sinapsis temprana en madura. Las moléculas de adhesión sinápticas juegan un rol fundamental en el mantenimiento de la forma y función sináptica. A nivel molecular, los dominios extracelulares de las moléculas de adhesión sinápticas participan en la unión transsináptica, mientras que los dominios citoplasmáticos en ambos lados sinápticos están asociados con proteínas intracelulares organizando complejos multi-proteicos (Yamada and Nelson, 2007).



NEUROSCIENCE, Third Edition, Figure 5.1 © 2004 Sinauer Associates, Inc.

Figura 1.6- Sinapsis eléctrica y química. **A-** En las sinapsis eléctricas, las uniones en brecha entre las membranas presináptica y postsináptica permiten que la corriente fluya pasivamente a través de los canales intercelulares. Este flujo de la corriente cambia el potencial de la membrana postsináptica, iniciando (o en algunos casos inhibiendo) la generación de los potenciales de acción postsinápticos. **B** En la sinapsis química la característica fundamental es que no hay continuidad intercelular y por lo tanto no hay flujo directo de la corriente desde la célula presináptica hasta la célula postsináptica. La corriente sináptica fluye a través de la membrana postsináptica solo en respuesta a la secreción de neurotransmisores, lo cual abre o cierra los canales iónicos postsinápticos después de la fijación de las moléculas receptoras. Figura tomada y modificada del libro “Neurociencia”, Purves et al 2007.

1.3 Plasticidad sináptica

Se define plasticidad sináptica como la habilidad de las neuronas de arreglar su anatomía y conectividades funcionales en respuesta a estímulos del ambiente o a una injuria celular. Existen mecanismos de plasticidad sináptica que actúan tanto a nivel de la terminación presináptica (control de la liberación de neurotransmisores) como de la hendidura sináptica (control de la degradación o transporte del neurotransmisor) y en el compartimento postsináptico (control del número y tipo de receptores, del tiempo de apertura de canales, activación de cascadas de señalización intracelular que regulan la duración de estos cambios, etc.).

Estos mecanismos de plasticidad neuronal se activan cuando la neurona recibe un patrón de estimulación determinado, frecuentemente la coincidencia temporal de dos estímulos o la llegada de estímulo muy intenso o repetido. Por lo tanto debemos considerar a la sinapsis como estructuras altamente plásticas. La fuerza de conexiones sinápticas concretas, lo que conocemos como peso sináptico, cambia a lo largo del tiempo dependiendo de la historia de estimulación que haya sufrido esa neurona y de forma más particular esa sinapsis. Esos cambios pueden ser transitorios y muy rápidos (fracciones de segundos) o estables y muy duraderos, e incluso permanentes. Estos últimos están asociados a cambios estables en la estructura de la sinapsis o incluso a la formación de nuevas conexiones sinápticas entre la neurona presináptica y la postsináptica.

1.4. Crecimiento y direccionamiento axonal

El proceso del crecimiento axonal está involucrado en distintos aspectos fisiológicos del individuo que incluyen tanto la construcción del sistema nervioso (desarrollo embrionario), como la remodelación estructural en el desarrollo adulto (plasticidad) y las modificaciones compensatorias en respuesta a la injuria (regeneración y recuperación).

El crecimiento axonal es muy particular porque solo una parte de la célula crece activamente, esa región denominada cono de crecimiento se encuentra en el extremo distal del axón y es extremadamente móvil. Los conos de crecimiento responden a una variedad de señales ambientales que controlan el avance, retroceso y dirección de su crecimiento. Estas señales pueden ser solubles (como por ejemplo las neurotrofinas) o unidas a sustrato (como las proteínas de adhesión), pueden desencadenar respuestas de crecimiento (simplemente aumentando o disminuyendo la tasa de crecimiento) respuestas quimioatractantes (quimiotropismo positivo) o quimiorrepelentes (quimiotropismo negativo). Un ejemplo de quimiorrepelente es la proteasa trombina que es capaz de generar el colapso de los conos de crecimiento (Jalink et al., 1994). Sin embargo la reacción de una neurona o un cono de crecimiento a un factor son muy complejos. La motilidad y navegación del cono de crecimiento en respuesta a señales extracelulares está regulada por la dinámica de la actina del citoesqueleto neuronal (Brown et al., 2000; Kuhn et al., 2000). La elongación axonal depende de la dinámica y estructura tanto de los filamentos de actina (F-actina) como los microtúbulos dentro del axón y del cono de crecimiento (Figura 1.7).

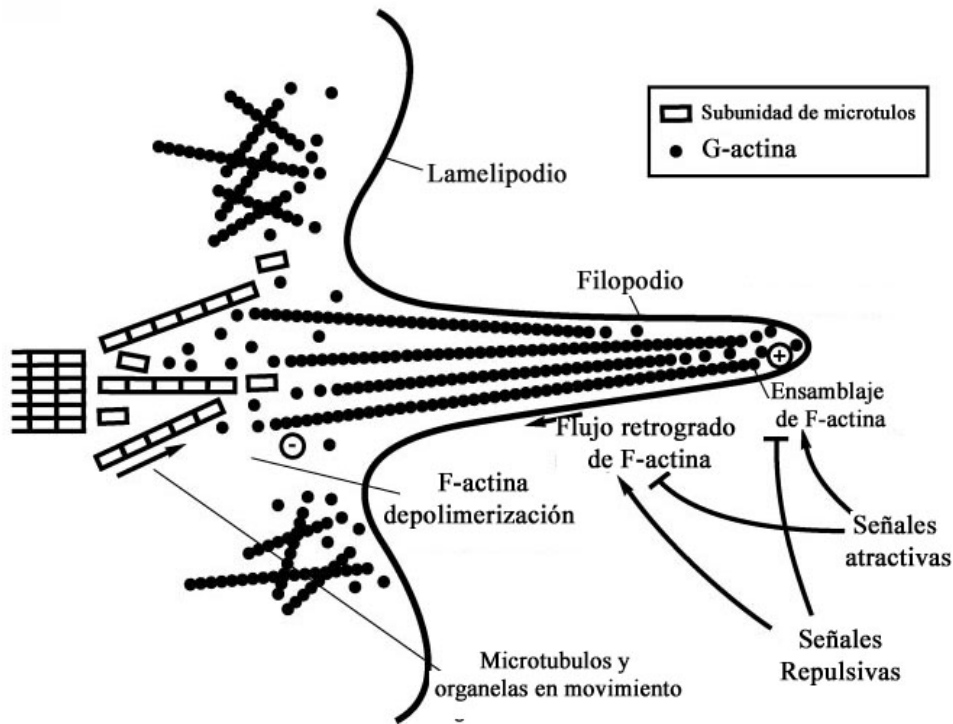


Figura 1.7- Los axones en crecimiento responden a señales de direccionamiento en el medio exterior. Los lamelipodios contienen filamentos de F-actina ensamblados. Los filopodios se extienden y retraen a través de la regulación de las tasas de polimerización y depolimerización de actina en los extremos positivo (+) y negativo (-) del filamento y al flujo retrogrado de F-actina. Las señales repulsivas y atractivas influyen en la morfología de los conos de crecimiento por el resultado de este proceso. Figura tomada y modificada de Huber et al 2003 (Huber et al., 2003).

Los conos de crecimiento neuronales son ricos en filamentos de actina y continuamente extienden lamelipodios y filopodios. Estas dos estructuras están localizadas en los extremos en avance y actúan como antenas de larga distancia detectando señales de crecimiento y direccionamiento en el ambiente. Los lamelipodios y filopodios son altamente móviles y constantemente se expanden y retraen censando el ambiente local y liderando el cono de crecimiento en el nuevo territorio. La dinámica y morfología de estas estructuras está conectada con el ensamblaje coordinado, flujo retrogrado y desensamblaje del filamento de actina (Figura 1.7).

Siguiendo a la polimerización de actina en el extremo líder, la F-actina es transportada a la región central del cono de crecimiento donde es depolimerizada y reciclada. La tasa de crecimiento de los conos depende de la tasa de este ciclo de polimerización de la actina. Este procesamiento de la actina es regulado por una gran

variedad de proteínas de unión a actina que incluye el factor depolimerizante de actina (ADF) y cofilina (Meberg, 2000).

La familia de las neurotrofinas influye en el citoesqueleto neuronal regulando el crecimiento y el direccionamiento axonal. Se ha observado que las neurotrofinas como el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neurotrópico derivado de cerebro (BDNF) y la neurotrofina 3 (NT-3) incrementan las cantidades de F-actina en conos de crecimiento de neuronas sensitivas (Paves and Saarma, 1997). Por otro lado además el contacto de las neurotrofinas con sus receptores en neuronas sensitivas resulta en la formación de filopodios, ricos en F-actina (Gallo and Letourneau, 1998).

1.5. Proteínas de la matriz extracelular.

La adhesión célula-célula es mediada estructuralmente por diversas clases de glicoproteínas de la superficie celular, las cuales forman interacciones heterofílicas y homofílicas a través del espacio intercelular. Durante el desarrollo, la adhesión específica entre distintos tipos celulares es requerida para la correcta organización de las células en patrones que llevarán al desarrollo de los diferentes órganos o tejidos. En el adulto, la adhesión célula-célula no solo mantiene la integridad estructural y funcional de los órganos y tejidos, sino que debe ser lo suficientemente dinámica para permitir la formación de nuevas interacciones o la remodelación de las viejas. En la sinapsis se localizan varias clases de proteínas de adhesión como: los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (N-CAM, L1, nectina, synCAM); neurexina/neuroliginas; ephrin/epH; y la familia de las cadherinas. Mediante interacciones hetero y homofílicas estas proteínas de adhesión llevan a cabo la formación y el mantenimiento de los circuitos neuronales (Washbourne et al., 2004).

Sin embargo cuando ocurre una injuria en el SNC las proteínas de la matriz extracelular cambian drásticamente principalmente a la producción de proteínas inhibitorias de la mielina (MAG, nogo, OMGP, CSPG) que inhiben el crecimiento axonal y promueven la formación de una cicatriz inhibitoria (Hu and Strittmatter, 2004).

1.5.1. Superfamilia de las Ig.

N-CAM (molécula de adhesión celular de neuronas) fue una de las primeras proteínas implicadas en la adhesión entre neuronas. Pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y está involucrada en interacciones hetero y homofílicas con otras

moléculas de adhesión celular. Esta proteína se encuentra modificada por la incorporación de ácido polisiálico (PSA). Muchas de las funciones biológicas de las proteínas N-CAM son moduladas por esta modificación con PSA, la cual parece estar presente de una manera dependiente del desarrollo el tipo celular y la actividad de la proteína. Mientras que en el desarrollo temprano N-CAM no se encuentra modificada por PSA, las formas con PSA se vuelven predominantes en los estadios tardíos del desarrollo embrionario y registra un máximo en la fase perinatal. Sin embargo después del nacimiento las cantidades de N-CAM modificada con PSA, van declinando progresivamente y solo una fracción minoritaria posee PSA (Bruses and Rutishauser, 2001). En el cerebro adulto, PSA-NCAM se mantiene expresado en poblaciones neuronales que muestran predisposición a la neurogénesis, migración celular, crecimiento axonal y plasticidad sináptica. Ejemplos de estas poblaciones se encuentran en el flujo migratorio rostral (Lois et al., 1996), la formación hipocampal (Seki and Arai, 1993) y el núcleo hipotalámico (Glass et al., 2003). Trabajos recientes sugieren un rol fundamental de las N-CAMs en la sinaptogénesis temprana y la siguiente maduración sináptica. La importancia de las N-CAMs en la dinámica de la sinaptogénesis puede verse en ensayos de deficiencia en animales en los cuales se pudo ver:

- 1) La dependencia de la expresión de N-CAMs en la actividad sináptica (Schuster et al., 1998).
- 2) Inusual LTP y LTD en ratones deficientes de N-CAMs o PSA asociado (Eckhardt et al., 2000).
- 3) Alteraciones en la transmisión sináptica, la dinámica de vesículas y la maquinaria de liberación de neurotransmisores en uniones neuromusculares deficientes de N-CAM (Polo-Parada et al., 2001).

La familia de proteínas L1 también son muy importantes dentro de las proteínas de adhesión neuronal y que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Esta familia, incluye las proteínas L1, neurofascina, y N-CAM entre las más destacadas. Estas proteínas forman adhesiones tanto homofílicas como heterofílicas, además de cis o trans con respecto a su ubicación celular. Las proteínas L1 se expresan durante el desarrollo del sistema nervioso y son fundamentales en la migración neuronal, la dirección del axón en crecimiento y la plasticidad sináptica. La delección del gen de L1 en ratones resulta en anomalías en la morfología neuronal, direccionamiento del axón y comportamiento del animal. En humanos un amplio

número de enfermedades de retardo mental está asociada a mutaciones en el gen L1 (Kamiguchi et al., 1998; Kamiguchi and Lemmon, 1997).

Otras proteínas de adhesión son las synCAMs y las nectinas que están estructuralmente relacionadas y ambas son importantes en la formación de la sinapsis y en su funcionamiento. Las synCAM forman adhesiones homofílicas en la sinapsis sin embargo también pueden ocurrir interacciones heterofílicas. Las nectinas constituyen una compleja familia de cuatro proteínas, cada una de las cuales tiene múltiples variantes generadas por splicing alternativo. Los subtipos de nectinas están asimétricamente localizados en la sinapsis y la delección de uno resulta en la pérdida de otra forma en la sinapsis, indicando que la adhesión heterofílica estabiliza los pares de lectinas (Yamada and Nelson, 2007).

Una proteína perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) con la cual trabajamos en esta tesis es Thy-1. Esta proteína se encuentra anclada a membrana mediante un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI), y su expresión es muy abundante en cerebro y timo (Low and Kincade, 1985). También se expresa en varios tipos celulares, como en algunos estados de los linfocitos, fibroblastos, células endoteliales, neuronas y células gliales (Avalos et al., 2002; Barlow et al., 2002; Leyton et al., 2001).

En las neuronas la expresión de Thy-1 está regulada en el desarrollo por lo cual su expresión aparece en el comienzo y al término del mismo, observándose siempre la exclusión de Thy-1 de zonas de crecimiento axonal (Morris, 1992). La expresión de Thy-1 es preferentemente iniciada hacia el final de la extensión del axón, consistente con la idea de su participación en la estabilización de las conexiones neuronales existentes inhibiendo futuros crecimientos de las neuritas (Mahanthappa and Patterson, 1992a; Mahanthappa and Patterson, 1992b; Morris, 1992; Xue et al., 1991). Se ha identificado a la integrina glial β_3 como ligando de Thy-1 y cuya interacción dispara la fosforilación en tirosinas de proteínas de adhesión en astrocitos, lo que provoca la adhesión de astrocitos adyacentes sobre la superficie requerida (Avalos et al., 2002; Leyton et al., 2001).

1.5.2. Cadherinas.

Como otras moléculas de adhesión, las cadherinas son también capaces de formar ambas interacciones, homofílicas y heterofílicas, y pueden influenciar en la organización del citoesqueleto de actina a través de su par intracelular, las cateninas. Las interacciones de las cateninas pueden ser tanto en *cis* (lateralmente en la misma

membrana) y en *trans* (a través de las membranas opuestas) (Inuzuka et al., 1991; Yap et al., 1998). Una clásica cadherina posee cinco dominios extracelulares bien conservados (a través de los cuales les es conferida su dependencia al calcio), un solo dominio transmembrana y un dominio intracelular (Tamura et al., 1998).

1.5.3. Neurexina/neuroligina.

Estas moléculas de adhesión parecen no tener un efecto directo sobre el citoesqueleto pero si influyen sobre cambios de la morfología sináptica. Muchos estudios indican a neuroligina y su compañero presináptico neurexina como iniciadores sinaptogénicos, además se ha visto a la neuroligina como inductora de la diferenciación presináptica (Scheiffele et al., 2000).

Al menos cuatro genes son lo que codifican para neuroligina con todas sus variantes de splicing (Bolliger et al., 2001; Ichtchenko et al., 1995). Estas proteínas se ubican en la membrana postsináptica e intracelularmente unen dominios PDZ (PSD-95, disk large, zo-1) de la proteína PSD-95 de las sinapsis excitatorias. La proteína neuroligina se une a la neurexina presináptica a través de su dominio extracelular (Ichtchenko et al., 1995).

Las neurexinas son generadas por tres genes, cada uno de los cuales tiene también múltiples variantes de splicing alternativo. Estas proteínas se asocian directamente con las vesículas sinápticas a través de un contacto directo con sinaptotagmina y una interacción con las proteínas de andamiaje presináptica (Hata et al., 1993).

1.5.4. Efrinas (Ephrins).

La familia de las proteínas de adhesión sináptica efrinas (epH receptor interacting proteins) y sus receptores epH (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma) proveen un mecanismo de comunicación bidireccional en la sinapsis. Esto consiste que luego del contacto célula-célula y la unión ephrin-epH se produce una señal bidireccional que activa tanto al receptor como al ligando, desencadenando una cascada de señalización en ambas células participantes de la unión. Hasta el momento se han descrito dos clases principales de efrinas y de receptores epH, que se unen entre grupos de la misma clase respectivamente (ephrinA/epH-A y ephrinB/epH-B). Sin embargo también se ha visto algún grado de promiscuidad entre clase en estas uniones (Yamada and Nelson, 2007).

1.5.5 Proteínas derivadas de la mielina: nogo, MAG, OMGP y CSPG.

Otro grupo de proteínas para destacar son las derivadas de la mielina del SNC, las cuales son producidas tanto por los oligodendrocitos y astrocitos de la cicatriz glial. Varios trabajos describen responsables en parte de la inhibición del crecimiento axonal dentro del SNC (Huang et al., 1999). Hasta el momento se han identificado múltiples inhibidores entre los más estudiados se incluyen: nogo, MAG (myelin-associated protein), OMGP (oligodendrocyte-myelin glycoprotein) y CSPG (chondroitin sulfate proteoglycan) (Hu and Strittmatter, 2004).

1.6. Neurotrofinas

El desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso es dirigido por una compleja interacción entre moléculas difusibles (factores de crecimiento) y sus correspondientes receptores en la membrana celular. Los factores mejor caracterizados de la diferenciación neuronal en mamíferos son las neurotrofinas. Estas moléculas fueron inicialmente identificadas como factores de supervivencia neuronal, pero actualmente se conoce que median un amplio rango de respuestas que incluyen la regulación de la extensión de neuritas, modulación de las propiedades de la sinapsis, mantenimiento de la sobrevivencia y la inducción a la apoptosis (Carter and Lewin, 1997; Lewin, 1996; Lewin and Barde, 1996).

La neurotrofina, nerve growth factor, NGF (Levi-Montalcini, 1987), fue el primer y mejor caracterizado miembro de la familia de estos factores de crecimiento que también incluyen: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Snider, 1994). Con la excepción de NT-4/5, los cuales no se detectan en aves, las secuencias de las neurotrofinas están altamente conservadas en vertebrados. Se han identificado dos neurotrofinas más NT-6/7 pero solo se han identificado en peces y no tienen su correspondiente en mamíferos (Gotz et al., 1994; Nilsson et al., 1998) (Figura 1.8).

Los cuatro genes de neurotrofinas de mamíferos codifican para precursores glicosilados (31-35 kDa) que son clivados por enzimas convertasas (Furin y convertasas 1 y 2) que llevan a cabo el proceso de maduración de la neurotrofina (13,2-15,9 kDa). La proteína madura posee tres puentes disulfuro que se conservan cuando la proteína forma un homodímero y que es una de las zonas que presentan la actividad de unión al receptor (Acklin et al., 1993). El sistema de señalización de las neurotrofinas es iniciado por la

unión del dímero maduro a dos categorías de receptores celulares. El receptor tirosina quinasa Trk (tropomyosin-related kinase) y el p75 receptor pan de neurotrofina (p75NTR).

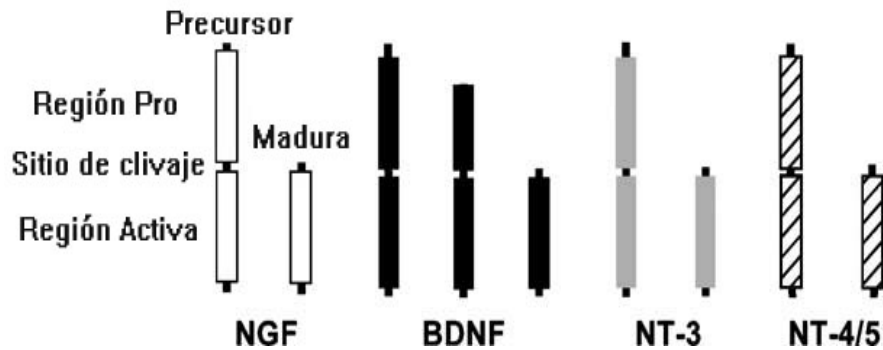


Figura 1.8 - Representación esquemática de las isoformas de las neurotrofinas de mamíferos. Los tres genes de las neurotrofinas de mamíferos codifican para precursores, los cuales son clivados por convertasas específicas para liberar las neurotrofinas maduras. El precursor de BDNF tiene dos sitios de clivaje, lo que lleva a la neurotrofina y a un precursor de la digestión incompleta. Figura tomada y modificada de Roux y Baker, 2002.

1.6.1. Los receptores Trk.

En mamíferos existen tres genes (TrkA, TrkB, TrkC) que codifican para varias isoformas generadas por splicing alternativo. Dichas isoformas poseen diferentes afinidades hacia las neurotrofinas, NGF se une preferentemente trkA mientras que BDNF y NT-4/5 muestran una alta afinidad por TrkB. NT-3 se une a TrkC pero también puede unirse a TrkB y A, a pesar de tener una baja afinidad (Barbacid, 1994).

Los tres receptores Trk son proteínas transmembrana de tipo I que pertenecen a la superfamilia de los receptores tirosina quinasa (Martin-Zanca et al., 1989). La unión del homodímero de neurotrofina causa la dimerización del receptor, la autofosforilación de residuos en el loop de activación, seguida por la fosforilación de otros residuos tirosina internos de la proteína (Cunningham et al., 1997). Las tirosinas fosforiladas dentro de la proteína actúan como sitios de anclaje para moléculas de señalización, las cuales regulan el crecimiento celular y la supervivencia a través de las vías de señalización de las proteínas MAPK, la fosfatidilinositol quinasa (PI3K)/Akt y la fosfolipasa C γ (PLC γ) (Kaplan and Miller, 2000). La actividad de tirosinas quinasa se encuentra

elevada en conos de crecimiento durante el desarrollo (Bixby, 2000; Bixby and Jhabvala, 1993; Maness, 1992; Maness and Cox, 1992), reinducida después de la axotomía (Ignelzi, Jr. et al., 1992) y estimulada por varios factores capaces de modular la extensión de neuritas (Brambilla and Klein, 1995), incluyendo FGF y NGF (Henderson, 1996).

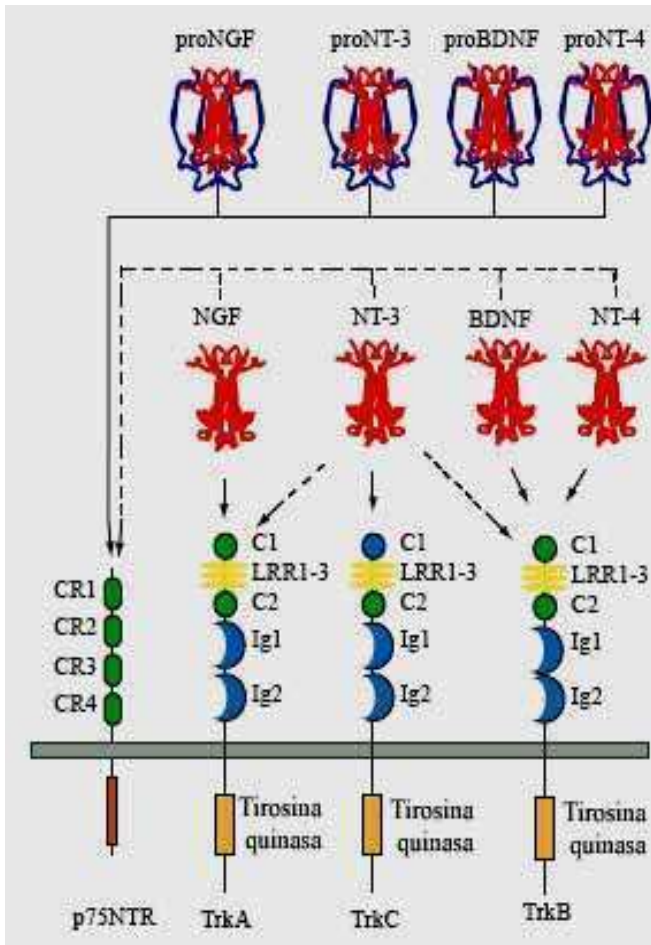


Figure 1.9- Los receptores de las neurotrofinas y sus interacciones. Esta figura muestra las principales interacciones de cada una de las cuatro neurotrofinas de mamíferos. Todas las proneurotrofinas se unen al p75NTR, pero no al receptor Trk. Luego de la maduración a través de la proteólisis de las proneurotrofinas, cada neurotrofina madura puede unirse y activar p75NTR, pero exhiben interacciones más específicas con los tres receptores Trk. NGF se une específicamente a TrkA; BDNF y NT4 reconoce al TrkB; NT3 activa al TrkC. En algunos contextos celulares, NT3 también es capaz de unir y activar TrkA y TrkB con baja eficiencia. Para simplificar solo mostramos la principal isoforma del receptor de Trk. Splicing alternativo genera isoformas de TrkB y TrkC que tienen truncado el dominio citoplasmático por lo que carece del dominio tirosina quinasa. El splicing también genera una isoforma de TrkC con una pequeña inserción en dominio quinasa que afecta la especificidad de sustrato. Splicing de los exones que generan el dominio extracelular de cada receptor resulta en receptores que tienen un pequeño péptido insertado que afecta la especificidad al ligando. La especificidad de ligando también es afectada por la presencia p75NTR. Figura tomada y modificada de Reichard et al 2006.

1.6.2. Los receptores p75.

Pertencen a la superfamilia de los receptores TNF (Factor de necrosis tumoral) que incluye a TNF1/2, fas, RANK y CD40. El receptor p75NTR está compuesto por un dominio extracelular de unión a NGF que contiene cuatro dominios ricos en cisteínas característicos de la familia de TNFR. Además tiene un dominio transmembrana y un dominio intracelular que no está asociado con una actividad catalítica inherente pero contiene dominios FAS “death domain” también muy característicos de la familia de

receptores TNFR. La cola citoplasmática tiene varios sitios de unión a proteínas asociadas a la señalización por p75. El receptor p75 NTR ha sido denominado como común o pan NTR debido a que tiene la habilidad de unir todas las neurotrofinas. (NGF, BDNF, NT-4/5 y NT-3) con similar afinidad. El receptor p75NTR, también es activado por las pro-neurotrofinas pero con una función opuesta a la neurotrofina madura (Roux and Barker, 2002) (Figura 1.9).

1.6.3. Factor de crecimiento neuronal (NGF)

El factor de crecimiento neuronal también llamado NGF por su nombre en inglés fue descubierto por Rita Levi-Montalcini. Este factor tiene la habilidad de estimular el crecimiento, diferenciación, supervivencia y mantenimiento de neuronas periféricas sensitivas y simpáticas durante el desarrollo y luego de la injuria (Levi-Montalcini, 1987). El NGF es una glicoproteína de 118 aminoácidos que consiste en tres subunidades (de peso molecular de 130kD), cuyo gen se ubica en el brazo corto del cromosoma-1 (Levi-Montalcini, 1987; Levi-Montalcini et al., 1995). En los tejidos el NGF es sintetizado como un precursor y luego de un procesamiento post-traduccional (clivaje intracelular por ambas serinas proteasas plasmáticas y matrix metaloproteasa MMP7) se obtiene la forma activa madura, β -NGF (Lee et al., 2001b; Micera et al., 2003; Micera et al., 2004).

El NGF es producido en el sistema nervioso por células accesorias, como los astrocitos y oligodendrocitos, en los cuales regula la diferenciación y supervivencia de neuronas principalmente a través de la formación de circuitos parácrinos. El NGF también es producido y utilizado por varios tipos de células no nerviosas incluidas células del sistema inmune. Por esta y muchas más funciones dentro y fuera del sistema nervioso el NGF es considerado un importante factor pleiotrópico (Sofroniew et al., 2001).

El NGF se une a dos receptores celulares conocidos, TrkA y p75NTR (Bothwell, 1995; Kaplan, 1998). TrkA tiene dos isoformas que difieren en su dominio extracelular por la inclusión de seis aminoácidos cerca del dominio transmembrana (TrkAII). Esta inclusión disminuye la especificidad de la activación del receptor TrkA, la señalización por la neurotrofina NT-3 está marcadamente aumentada por esta isoforma del receptor (Clary and Reichardt, 1994).

Ambos el factor soluble NGF y sus receptores son producidos durante el desarrollo, la vida adulta y la vejez por múltiples tipos de células de sistema nervioso central y periférico, por el sistema inmune y por varios tejidos. Durante el desarrollo la expresión de NGF es compatible con su rol de supervivencia y maduración de neuronas aferentes. Es interesante la regulación positiva del NGF y sus receptores en varios tipos celulares luego de la injuria. Durante la regeneración del sistema nervioso las células de Schwann liberan en el sitio de injuria factores neurotróficos incluyendo el NGF. Al mismo tiempo, la concentración de receptores de NGF en células de Schwann se incrementa luego de la injuria (Sofroniew et al., 2001).

1.7. Injuria y regeneración del sistema nervioso

La injuria de una neurona resulta en una serie de respuestas tanto a nivel molecular como celular que están asociadas con una regeneración exitosa y la recuperación de la función. En la neurona lesionada el rápido disparo de señales de injuria y stress es seguido por la inducción de factores de transcripción, moléculas de adhesión, proteínas asociadas al crecimiento y componentes estructurales necesarios para la elongación del axón. Estos cambios están acompañados por otros mayores a nivel de la organización celular, como la aparición de conos de crecimiento en el extremo proximal del axón lesionado, un engrosamiento del cuerpo neuronal asociado con un fuerte aumento del metabolismo celular y la síntesis proteica. Estos cambios morfológicos se denominan cromatólisis (Hanz and Fainzilber, 2006).

Curiosamente los axones lesionados que pertenecen a los tractos del sistema nervioso central (SNC) normalmente fallan en la regeneración, mientras que los del sistema nervioso periférico (SNP) regeneran exitosamente. Este hecho es aún ampliamente estudiado en la neurobiología tanto con fines terapéuticos como científicos. Se han descripto varios factores, internos y externos, como posibles responsables de impedir la regeneración en el SNC (Chen et al., 2007) entre los que pueden mencionarse:

- La cicatriz glial, la cuál presenta una barrera física e inhibitoria del crecimiento.
- Los inhibidores específicos presentes en la mielina (MAG, nogo, CSPG y OMGP).
- La probable disminución general de la capacidad de crecimiento de los axones adultos del SNC.

En contraste, el SNP regenera exitosamente debido en principio a factores ambientales diferenciales que siguen a la injuria, los restos de mielina son limpiados y las células de Schwann dediferenciadas, regulando la expresión de proteínas de la mielina, todos estos cambios generan un ambiente permisivo para la regeneración del axón. Un gran número de trabajos han demostrado que los axones del SNC son capaces de crecer *in vivo* en un tejido implantado del SNP (Aguayo et al., 1991).

Otra diferencia entre el SNC y el SNP son las proteínas de la matriz extracelular (MEC) como la laminina. Esta proteína se expresa en grandes cantidades en SNP tanto en nervios intactos como en los lesionados. Existe evidencia que apoya el importante rol que juega la laminina en el crecimiento de neuritas *in vitro* (Luckenbill-Edds, 1997). Además luego de la injuria del nervio periférico se ha observado que laminina 2 y 8 son reguladas positivamente indicando un rol en la regeneración (Doyu et al., 1993; Wallquist et al., 2002). Cuando la producción de la cadena γ en las células de Schwann es ablacionada por la generación de un knock out, la expresión de la mayoría de las lamininas e abolida y la regeneración axonal luego de una injuria del nervio ciático es incompleta (Chen and Strickland, 2003).

Los receptores de laminina que se expresan en los nervios periféricos incluyen integrinas y distroglicanos. Consistente con la noción que la laminina participa en la regeneración axonal periférica, el receptor integrina de la laminina es inducido tanto en el cuerpo celular como en los axones de las moto neuronas luego de una injuria periférica (Hammarberg et al., 2000).

A pesar de que la laminina puede promover el crecimiento de neuritas, la regeneración axonal y el direccionamiento, los mecanismos de acción aún no están claramente definidos. La unión de la laminina a las integrinas produce la activación del receptor desencadenando la fosforilación y activación de la quinasa PI3, la cual activa AKT. A su vez, AKT activada inhibe la actividad de GSK-3 β mediante su fosforilación y gatilla a las proteínas de unión del citoesqueleto a organizar la elongación del mismo (Figura 1.10).

Pero no todo está dado por el ambiente además el SNP tiene una mayor capacidad innata de iniciar el programa de regeneración que hace que este proceso se lleve a cabo exitosamente. Un ejemplo claro para ver la diferencia en la regeneración de ambos sistemas son las neuronas primarias del ganglio de la raíz dorsal (DRG). Las neuronas del DRG son pseudo-unipolares tienen una sola rama de axón desde el cuerpo celular. El axón tiene dos brazos: una rama periférica que inerva los órganos sensoriales

en el tejido periférico y una rama central que entra en la medula espinal y asciende por la columna vertebral terminando en el cerebro. Las dos ramas axonales del mismo cuerpo celular presentan diferencias fundamentales en su respuesta a la injuria (Figura 1.10). La rama periférica regenera espontáneamente luego de la injuria, resultando en la restauración de su funcionalidad, pero la rama central no puede hacerlo. Estas diferencias en la capacidad regenerativa son en gran parte debido a sus ambientes, así como también a una capacidad intrínseca de activar la maquinaria de regeneración. La activación de la capacidad de regeneración se puede ver cuando la injuria en la rama central ocurre después de una lesión en la rama periférica. En este caso, se observa que la rama central puede regenerar venciendo el ambiente inhibitorio en el sitio de la injuria y la medula espinal. Este fenómeno se conoce como lesión periférica pre-condicionada (Neumann and Woolf, 1999). Una característica destacable de la lesión pre-condicionada es que produce que el SNC pueda crecer en un ambiente hostil sin la neutralización de las señales inhibitorias como CSPG y nogo. Se ha observado que hay un incremento de AMPc luego de este tipo de lesión (Neumann et al., 2002) (Figura 1.10).

1.8 Mecanismos involucrados en la regeneración neuronal

Ante la injuria de un nervio existen múltiples señales iniciadas por la injuria que desencadenan la activación del sistema de crecimiento intrínseco en el cuerpo celular. La injuria de un axón induce la descarga de los potenciales de acción, la interrupción del suministro del transporte retrógrado de factores tróficos (señales negativas de la injuria), además de la activación de señales de injuria que viajan retrógradamente desde el sitio de injuria hasta el cuerpo celular (señales positivas de injuria). El transporte retrógrado de señales de injuria es uno de los mecanismos que lideran la regeneración. La coordinación entre varios caminos de señalización de la injuria es necesaria para regular los genes apropiados para promover la supervivencia neuronal e incrementar el estado de crecimiento intrínseco de la neurona dañada. Cuando analizamos a nivel ambiental la injuria vemos que la diferente reacción local que ocurre luego de la injuria es un factor importante en la habilidad del axón para regenerar exitosamente. Luego de la injuria en los nervios periféricos el extremo distal del axón que se encuentra desconectado del cuerpo celular comienza a degenerar, por un proceso denominado degeneración Walleriana. De esta manera se logra crear un microambiente favorable para el recrecimiento axonal, mediante la eliminación por parte de células de Schwann y

macrófagos infiltrados de los restos de mielina (Stoll and Muller, 1999). En el sitio de la lesión se genera un proceso inflamatorio donde la liberación de citoquinas y otros factores que difunden sirven para atraer macrófagos y a su vez activar y rediferenciar a las células de Schwann logrando así una limpieza de factores inhibitorios del crecimiento axonal. Proximal al sitio de lesión los conos de crecimiento emergen de los axones inducidos por factores locales, y crecen si se encuentran un terreno favorable.

1.8.1. El rol del AMPc.

La injuria del nervio periférico induce el aumento del AMPc que puede inhibir a la proteína rho y antagonizar de esta manera con la activación de ella por moléculas inhibitorias asociadas a la mielina. Mientras que un incremento en los niveles a neuronas del SNC puede activar su capacidad intrínseca aunque aún no está muy claro su funcionamiento. En algunos trabajos en neuronas del ganglio de la retina no se observó que la alteración de los niveles de AMPc logre favorecer el estado de crecimiento (Goldberg et al., 2002). Sin embargo, estudios realizados en el pez zebra muestran que inyecciones de AMPc en neuronas espinales post-lesión, inducen una regeneración funcional (Bhatt et al., 2004). Estos resultados demuestran que el AMPc activa la capacidad intrínseca de crecimiento pero el éxito de la regeneración depende además del ambiente al que se enfrenta el axón en regeneración.

1.8.2. El rol del calcio.

Las primeras señales relacionadas con la injuria están asociadas a cambios en las concentraciones iónicas y la actividad eléctrica de la neurona dañada. En modelos de invertebrados se ha demostrado que la axotomía induce un incremento local de la concentración de calcio, la cual es necesaria y suficiente para inducir la formación del cono de crecimiento (Chierzi et al., 2005; Chu and Tator, 2001; Rehder et al., 1992; Ziv and Spira, 1997). Las altas concentraciones de calcio intracelular activan quinasas, como la proteína quinasa A (PKA) y proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las cuales inducen modificaciones en el citoesqueleto y desencadenan la síntesis de proteínas axonales (Chierzi et al., 2005).



Figura 1.10- Regeneración axonal en nervios periféricos. Luego de una injuria en un nervio periférico, los restos de mielina son rápidamente removidos por células de Schwann y macrófagos. Las células de Schwann dediferencian y regulan negativamente todas las proteínas de mielina generando un ambiente permisivo. Las proteínas de la matriz extracelular como laminina (LM) se une a los receptores de integrina presentes en el cono de crecimiento y activan localmente a la quinasa PI3K resultando en la acumulación de Akt activa en los sitios de contacto de los axones con laminina. Akt fosforila e inactiva GSK-3 β . La inactivación de GSK-3 β regula las proteínas de unión a citoesqueleto, promoviendo el ensamblaje del citoesqueleto. La injuria de nervios periféricos también incrementa la capacidad intrínseca de crecer de la neurona. Localmente facilita la maquinaria para el ensamblaje del citoesqueleto acoplado con la activación capacidad intrínseca de crecimiento en la célula liderado por un rápido crecimiento del axón a través de los tubos de lámina basal. Las neurotrofinas (NT) también participan en la promoción de la regeneración del axón a través del receptor TrK a través de una vía similar al camino de señalización por laminina. La activada capacidad intrínseca de crecimiento axonal en el SNC es antagonizada por las moléculas inhibitorias asociadas a la mielina (MAG, OMG, Nogo, y CSPGs). Figura tomada y modificada de Chen et al 2007.

1.8.3. El rol de las neurotrofinas.

Los factores neurotróficos juegan un papel muy importante en la supervivencia neuronal luego de la injuria nerviosa (Koliatsos et al., 1993; Wiese et al., 1999; Yan et al., 1992). Trabajos recientes muestran que factores neurotróficos como NGF, NT-3 y BDNF inducen el crecimiento axonal a través de la conservación de la polaridad celular (Zhou et al., 2004; Zhou et al., 2006).

Neurotrofinas, como NGF o BDNF, son reguladas positivamente luego de la injuria de un nervio periférico pero su rol en la regeneración del axón no está totalmente clara (Makwana and Raivich, 2005). Sin embargo luego de una lesión se interrumpe el normal suministro de moléculas como las neurotrofinas, esta falta actúa como una señal

de injuria para el cuerpo celular. Trabajos con NGF han demostrado que la interrupción del transporte retrógrado de esta neurotrofina induce alteraciones en la expresión génica similares a las producidas en una axotomía (Shadiack et al., 2001), además se ha observado que la infusión de NGF en el cuerpo celular retrasa la regeneración en neuronas lesionadas (Gold, 1997).

1.9 Señalización axonal de la injuria

1.9.1. Señales positivas de injuria.

Las señales positivas de injuria son identificadas como un amplio grupo de proteínas funcionalmente diferentes que incluyen miembros de la familia de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK), citoquinas y sus factores de transcripción río abajo, así como también la proteína localmente traducida importina, el principal regulador de importación y exportación nuclear. El transporte axonal de varias quinasas juega un rol importante al llevar información desde la terminal axonal hasta el cuerpo celular. La injuria induce la activación local y el transporte retrógrado de varias MAPKs que incluyen erk, c-jun (JNK) y la proteína quinasa G. Debido a que la activación de estas proteínas está dada por una fosforilación reversible que sin una protección apropiada no podría llegar al cuerpo celular. Un mecanismo de protección es proteger la señal con proteínas de andamiaje como los filamentos intermedios de vimentina (Perlson et al., 2005).

La injuria axonal activa varios factores de transcripción (gp130) a través de la liberación local de citoquinas inflamatorias. La señal de las citoquinas a través del receptor gp130 y del camino de señalización vía JAK-STAT es el que lidera la fosforilación de STAT3 y su translocación a núcleo (Heinrich et al., 2003). Pero también es muy importante la síntesis de novo de proteínas en la terminal axónica como las ya mencionadas importina-beta y vimentina (Perlson et al., 2005).

1.9.2. Factores de transcripción.

Con la injuria axonal, se produce enseguida la activación del camino de señalización de MAPK, con la fosforilación y localización nuclear de factores de transcripción que incluyen c-jun, jun D, ATF3, P311, Sox11 y STAT3 (Herdegen et al., 1991; Schwaiger et al., 2000). Por otro lado disminuye la expresión y actividad de otros

factores de transcripción como islet-1, ATF2 y el factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) (Povelones et al., 1997). Estos cambios en los factores de transcripción contribuyen a la expresión de las proteínas necesarias para una regeneración exitosa.

1.9.3. Señales negativas de injuria.

Un importante mecanismo para disparar una respuesta neuronal a la axotomía es la pérdida de señales negativas. Las moléculas de señalización negativa son liberadas por las células blanco o por otros elementos del microambiente que luego son transportadas retrógradamente al cuerpo celular, donde generan una señal inhibitoria del crecimiento axonal. Estas moléculas de inhibición del crecimiento son las que permiten la maduración de las sinapsis y la formación de redes neuronales estables en el sistema nervioso (Abe and Cavalli, 2008).

1.10. Expresión de genes asociados al crecimiento neuronal

Normalmente la regeneración neuronal está acompañada por la expresión diferencial de ciertas proteínas que regulan las interacciones celulares entre la membrana y el citoesqueleto. Un grupo de proteínas presentan aumentada su expresión luego de la injuria son GAP-43, MARCKS y CAP-23 (GMC) (Bomze et al., 2001; Frey et al., 2000; Verhaagen et al., 1986). Estas proteínas tienen características particulares en su asociación a la membrana como la co-distribución con fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI(4,5)P₂) en las regiones rafts de la membrana celular (Laux et al., 2000). Además sus funciones son intercambiables ya que se asocian tanto a fosfolípidos ácidos como PI(4,5)P₂, calcio/calmodulina, proteína quinasa C y filamentos de actina. También regulan la polimerización del citoesqueleto de actina y la organización del desensamble, teniendo un rol importante en la formación de filopodios y micro espinas en el proceso de crecimiento de neuritas (Caroni, 2001).

Otra familia de proteínas involucradas y aumentadas en la regeneración son moléculas de desensamblaje de microtúbulos (SG10, stathmin y RB3) (Iwata et al., 2002); sus contrapartes asociadas como la proteína CRMP2 (collapsina response-mediated protein) (Suzuki et al., 2003) y el grupo de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP1B) (Bouquet et al., 2004).

Un tercer grupo de proteínas son la superfamilia de las proteínas G pequeñas, la cual está conformada por al menos 50 proteínas monoméricas de unión a GTP. Los miembros de esta superfamilia están involucrados en muchas funciones celulares, incluyendo regulación del crecimiento y diferenciación, tráfico intracelular y control del citoesqueleto (Downward, 1990; Downward, 1991; Kahn et al., 1992). Cinco subfamilias se han descrito basándose en similitudes básicamente estructurales más que funcionales. Tres de las más importantes son las subfamilias estrechamente relacionadas: ras, rab y rho.

La familia de las rho GTPasas, cuyos miembros más importantes son rho, rap, rac y cdc42, actúan regulando la estructura y dinámica del citoesqueleto (Etienne-Manneville and Hall, 2002). La activación de las GTPasas es mediada por moléculas adaptadoras que están conectadas con receptores de la superficie celular como la proteína slit-robo de activación de GTPasa (Madura et al., 2004). La familia ras tiene tres genes identificados en mamíferos, llamados Neural (N), Harvey (H) y Kirsten (K) los cuales codifican para proteínas altamente homólogas de aproximadamente 21 kDa que juegan un rol central en el control del crecimiento (Barbacid, 1987; Hall, 1990).

1.11. GAP-43

La proteína GAP-43 también denominada históricamente neuromodulina, B-50, P-57, F1 y pp46 (Benowitz and Routtenberg, 1997), fue inicialmente identificada como una de las proteínas más abundantes de los conos de crecimiento neuronales, así como de las terminales nerviosas adultas. Funcionalmente se la vio involucrada en la extensión de neuritas, plasticidad neuronal y en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Dekker et al., 1989).

En trabajos de delección se observó que la pérdida del gen que codifica para la proteína GAP-43 en ratones resulta en la muerte temprana en el período postnatal (Strittmatter et al., 1995). Los ratones knockout (KO) para GAP-43 presentan defectos en mapas corticales del cerebro (Kruger et al., 1998; Maier et al., 1999; Shen et al., 2002; Sretavan and Kruger, 1998; Zhu and Julien, 1999), lo que es atribuible a un defectivo direccionamiento axonal. Debido a esta importante observación se realizaron ratones transgénicos para GAP-43, con expresión exclusiva en las células de Purkinje bajo un promotor específico para estas células el L7. Esta sobre-expresión modificó sustancialmente la respuesta a la axotomía, mediante una inducción del proceso de

crecimiento y una disminución de resistencia a la injuria. Sin embargo la presencia de esta proteína no es suficiente para activar completamente en estas neuronas el complejo programa de regeneración axonal (Buffo et al., 1997). Otros estudios a nivel celular, han demostrado que los conos de crecimiento depletados de GAP-43 fueron deficientes en la extensión, ramificación y adhesión (Aigner and Caroni, 1995). Todos los resultados de la delección génica sugieren un rol fundamental de GAP-43 en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso.

Otro importante rol de esta proteína es ser uno de los principales sustratos de la proteína quinasa C (PKC) en el cerebro (Widmer and Caroni, 1993), en la serina 41 en el dominio efector de unión a calmodulina. Cuando GAP-43 es fosforilada por PKC se elimina la unión de la proteína a $PI(4,5)P_2$ de la membrana (Laux et al., 2000) y a la proteína calmodulina (Chapman et al., 1991), también provoca cambios en la interacción de GAP-43 con los filamentos de actina (He et al., 1997). La serina 41 fosforilada de GAP-43 estabiliza filamentos de actina y promueve el crecimiento axonal. En contraste, GAP-43 defosforilada reduce el largo de los filamentos de actina (Dent and Meiri, 1998; He et al., 1997). La defosforilación es llevada a cabo por varias fosfatasas incluida la calcineurina.

GAP-43 también afecta la plasticidad sináptica y regula las propiedades presinápticas aumentando dramáticamente la potenciación a largo plazo o LTP (long-term potentiation) y el aprendizaje (Hulo et al., 2002; Lovinger et al., 1986; Routtenberg et al., 2000). La LTP es un proceso complejo considerado como un mecanismo que lleva al almacenamiento de algunos tipos de memorias, como la memoria explícita. El fenómeno se ha estudiado en diferentes tipos de sinapsis, siendo las del hipocampo una de las más exploradas. La LTP es la consolidación funcional y duradera de la conexión entre dos células nerviosas y es típicamente inducida por estimulaciones de alta frecuencia del estímulo excitatorio llevando a una rápida elevación de la concentración de calcio en las espinas dendríticas. Algunos trabajos también han descrito otras funciones de GAP-43 como la interacción con proteínas heterotriméricas G y la activación de receptores acoplados a proteínas G (Strittmatter et al., 1993).

1.12. Familia de proteínas src (SFKs)

Esta familia consiste en un grupo de diez enzimas que catalizan la fosforilación en tirosina y forman parte de muchos caminos de señalización en las células de mamíferos (Thomas and Brugge, 1997). Sus principales miembros, lyn, hck, lck, blk, src, fyn, yes, y fgr muestran similitudes en su modos de activación y a través de los años fueron implicadas en el control de las redes de señalización de la regulación del metabolismo, viabilidad, proliferación y diferenciación celular en un sin número de linajes celulares (Frame, 2002; Ingley, 2008). Cinco de estas enzimas (src, fyn, lck, lyn y yes) juegan importantes funciones en el sistema nervioso central, particularmente en la plasticidad sináptica mediante la regulación de los canales calcio voltaje dependientes (Ca(V)) y receptores NMDA (Chen et al., 2010; Kalia et al., 2004).

Todos los miembros de esta familia comparten similares arreglos de dominios (Boggon and Eck, 2004), las cuales poseen una única región N-terminal de una alta variabilidad entre los miembros de la familia, pero siempre con un sitio de miristoilación y a veces uno de palmitoilación (Koegl et al., 1994; Resh, 1999). Seguido a esta región N-terminal se encuentra un dominio de 50 amino ácidos denominado dominio src de homología 3 (SH3) el cual tiene una asociación directa y específica con motivos ricos en prolina relacionados al sitio consenso PXXP (donde P es prolina y X cualquier aminoácido) (Koch et al., 1991). Le sigue a esta secuencia otra de aproximadamente 100 aminoácidos que componen el dominio src de homología 2 (SH2), el cual provee a la proteína interacción con motivos fosfotirosinas. El último dominio es el de quinasa (~300 residuos), o de homología de src 1 (SH1), responsable de la actividad enzimática (Koch et al., 1991) (Figura 1.11).

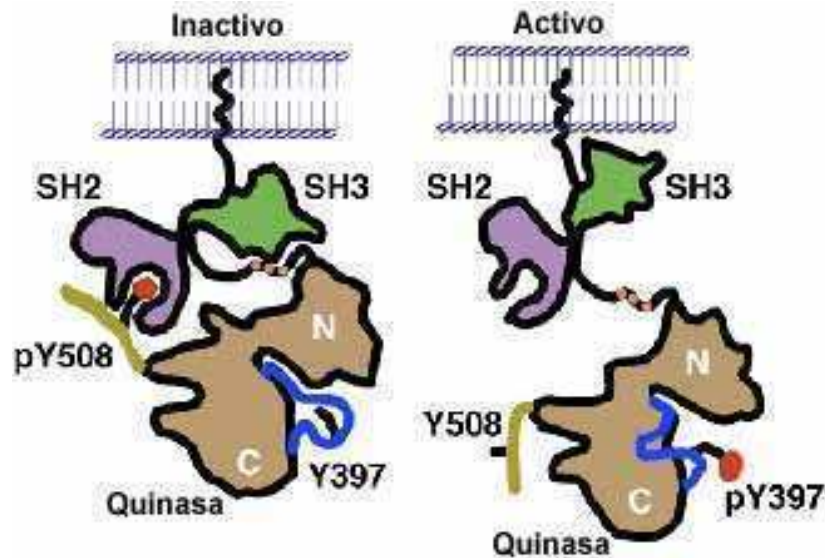


Figura 1.11- Esquema general de la estructura de la familia de proteínas src quinasa es las configuraciones activa e inactiva. A la izquierda se muestra la configuración inactiva, en la que el dominio SH2 interactúa con el extremo C-terminal fosforilado en tirosina (pY508). El dominio SH3 interactúa con el dominio conector del SH2 el cual forma un bolsillo de poliprolinas de tipo II hélice, y el loop de activación defosforilado (Y397) se pliega sobre el sitio de unión de sustrato. A la derecha se muestra la configuración activa con los dominios SH2 y SH3 liberados de sus interacciones intramoleculares y capaz de unir sustrato y moléculas regulatorias. El extremo C-terminal se encuentra defosforilado en su tirosina (Y508), y el loop de activación es fosforilado y acomodado lejos del sitio de unión de sustrato permitiendo a los dos lóbulos (N y C) de la quinasa formar la hendidura catalítica. Figura tomada y modificada de Ingley *et al* 2008.

1.13. Trombina y receptores activados por proteasas (PARs)

La trombina es una serina-proteasa esencial en la cascada de coagulación, cuya función es convertir al fibrinógeno en fibrina (Coughlin, 1998). Esta proteína es sintetizada como protrombina y es clivada por el factor Xa generando la trombina activa. Esta función no es la única descrita para esta proteína, la trombina puede inducir alteraciones morfológicas en neuronas y células gliales lo que ha llevado a especular que esta proteasa regula procesos de crecimiento y diferenciación (Beecher et al., 1994).

Su función en la injuria cerebral es aún controversial ya que luego de una hemorragia cerebral o de la ruptura de la barrera hematoencefálica la trombina es producida inmediatamente en el cerebro (Lee et al., 1996). Evidencias de trabajos *in vivo*, e *in vitro* indican que en altas concentraciones la trombina en el parénquima cerebral puede causar lesión (Lee et al., 1996; Striggow et al., 2000; Xi et al., 1998). Sin embargo otros trabajos describen que la trombina a muy bajas concentraciones puede tener efectos neuroprotectores. Esta dicotomía en los efectos de la trombina puede reflejar sus múltiples y complejas acciones.

Principalmente las funciones de la trombina en el sistema nervioso las cumple mediante la activación de los receptores activados por proteasas (PAR) que están ampliamente distribuidos en el SNC. Estos receptores tienen un mecanismo de activación muy particular, la trombina cliva un exodominio amino terminal y el nuevo extremo amino es capaz de interactuar con el receptor, activándolo. La trombina cliva los receptores PAR-1, 3 y 4, mientras que los PAR-2 son activados por tripsina (Noorbakhsh et al., 2003). En células del sistema nervioso la activación de estos receptores acoplados a proteínas G, gatilla varios caminos de señalización intracelular, incluyendo el incremento del calcio, la disminución de AMPc y la activación de la proteína quinasa C (Smith-Swintosky et al., 1995; Wang et al., 2002; Yang et al., 1997).

1.14. Thy-1

Otra proteína involucrada en la regeneración neuronal es la glicoproteína Thy-1 (CD90), perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Williams and Gagnon, 1982). Esta proteína se encuentra asociada a la membrana plasmática externa mediante un ancla GPI (glicosilfosfatidilinositol), y está especialmente localizada en dominios membranales tipo rafts (Williams and Gagnon, 1982). Thy-1 se expresa en fibroblastos humanos, neuronas, células madre de la sangre, y células endoteliales; como así también en células T murinas (Craig et al., 1993; Haeryfar and Hoskin, 2004; Saalbach et al., 1998; Saalbach et al., 1999).

Las funciones de esta proteína son muy variadas, Thy-1 tiene tanto importantes funciones inmunológicas en la activación de las células T como también muchos otros roles como por ejemplo la inhibición del crecimiento de neuritas; señalización apoptótica; adhesión y migración en células de melanoma y leucocitos; supresor de tumores y la migración de fibroblastos. Todas estas funciones en su conjunto indicarían que Thy-1 es un importante regulador de las interacciones célula-célula y célula-matriz (Rege and Hagood, 2006a; Rege and Hagood, 2006b).

Cuando se analizaron las funciones de Thy-1 a través de la creación del ratón knockout (K.O.) para esta proteína, se observó que el ratón era viable y aparentemente neurológicamente normal. Sin embargo mostraba una excesiva inhibición GABAérgica en el giro dentado y una inhibición regional de la potenciación de largo plazo (Hollrigel et al., 1998; Nosten-Bertrand et al., 1996). El fenotipo del ratón K.O. para Thy-1 además

incluye una deteriorada respuesta inmune cutánea y un desarrollo anormal de la retina (Beissert et al., 1998; Simon et al., 1999).

Además de servir como ligando, Thy-1 ha sido implicada en señalización celular, posiblemente mediante el incremento de calcio intracelular (Barboni et al., 1991) y la estimulación de fosforilación de tirosinas (Garnett et al., 1993). Thy-1 es una proteína anclada a la membrana mediante un glicolípido (GPI), y no posee un dominio transmembrana. No se conoce exactamente cómo se traduce su señal de activación hacia el citoplasma celular.

Varios trabajos han postulado como muy importante para la señalización por Thy-1 su ubicación en microdominios lipídicos o rafts. Cuando el ancla GPI de la proteína es reemplazada por la secuencia del dominio transmembrana de la molécula de adhesión celular (NCAM), la función inhibitoria del crecimiento neuronal de Thy-1 fue bloqueada (Tiveron et al., 1994). Esta modificación GPI es necesaria para su ubicación en los microdominios correctos de la membrana que le permiten interactuar con determinadas proteínas adaptadoras para, de esta manera, activar la cascada de señalización celular.

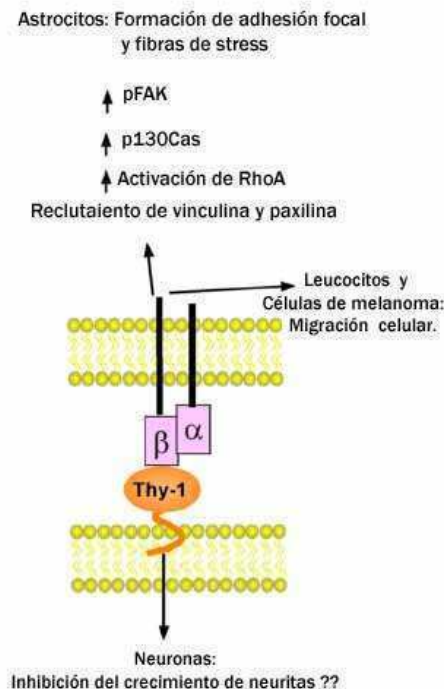


Figura 1.12. Esquema de la vía de señalización de Thy-1 por integrinas.

Thy-1 interacciona con ambas integrinas β_2 y β_3 . La asociación de Thy-1 neuronal con la integrina β_3 en astrocitos induce la activación de FAK, vinculina, paxilina, p130Cas y rhoA, promoviendo la adhesión focal y la formación de fibras de stress. Esta interacción induce la señalización de manera bidireccional provocando la inhibición del crecimiento de neuritas en neuronas maduras. En células endoteliales Thy-1 también interacciona con la integrina β_2 de leucocitos y β_3 en células de melanoma promoviendo la migración transendotelial *in vitro*.

Figura tomada y modificada de Rege et al 2006.

En astrocitos el ligando de Thy-1 está bien identificado como la integrina β_3 (Avalos et al., 2002; Dreyer et al., 1995; Leyton et al., 2001). En este tipo celular, la interacción de la proteína con su ligando induce la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK, focal adhesión kinase F-actin), p130Cas y rhoA, lo que lleva al reclutamiento de paxilina, vinculina y FAK en el contacto focal, promoviendo la adhesión focal y la formación de fibras de stress (Avalos et al., 2002; Leyton et al., 2001; Rege and Hagood, 2006a) (Figura 1.12).

El crecimiento de neuritas es un proceso muy importante tanto para el crecimiento neuronal como para la formación de las sinapsis. Como los axones no pueden repararse ante una lesión sino que deben generar neuritas y crecer hasta reconectarse, el conocimiento de la señalización molecular en la extensión de neuritas es fundamental para el tratamiento de lesiones cerebrales o espinales, así como también para enfermedades neurodegenerativas (Luo and O'Leary, 2005).

1.15 Modelo de Sinaptosomas

Como hemos descrito anteriormente el tejido neuronal está formado principalmente por dos tipos celulares: las neuronas y las células de la glía. Las neuronas se caracterizan por tener una forma muy elaborada, poseer largas y generalmente muy ramificadas prolongaciones. Estas células no sobreviven intactas una homogenización mecánica del tejido, los cuerpos celulares son desprendidos de sus prolongaciones las cuales se rompen en fragmentos discretos. La membrana plasmática de estos fragmentos celulares puede sellarse y formar partículas osmóticamente activas denominadas sinaptosomas (Gordon-Weeks, 1987). Con el desarrollo de esta técnica la liberación de neurotransmisores pudo estudiarse independiente de interacciones multineurales o glía-neurona (de Belleruche and Bradford, 1972a; de Belleruche and Bradford, 1972b; Levy et al., 1976).

Los sinaptosomas tienen usualmente porciones de la célula blanco adheridas a la superficie externa, por lo tanto las terminales presinápticas poseen parte de la fracción postsináptica (Figura 1.13). Los sinaptosomas contienen las terminales sinápticas completas con toda su maquinaria de exocitosis, incluyendo mitocondrias y vesículas sinápticas, así como también la membrana postsináptica y la densidad post-sináptica (PSD). Esta morfología puede observarse claramente por microscopía electrónica (Figura 1.3.). Debido a que poseen toda la maquinaria de liberación y almacenado de

neurotransmisores, los sinaptosomas fueron durante más de treinta años el modelo utilizado para el estudio de la función sináptica (Cotman et al., 1976). Algo muy importante a resaltar es que los sinaptosomas poseen su capacidad metabólica intacta lo que hace a estas partículas funcionar metabólicamente como células, en las cuales las mitocondrias están presentes en un citoplasma fisiológico, alimentado por caminos metabólicos y producción de ATP por las mitocondrias (Nicholls, 2010).

Mediante pequeñas modificaciones en la técnica de purificación de sinaptosomas pueden obtenerse otras partículas relacionadas como los conos de crecimiento. Los conos de crecimiento están definidos como la zona apical de crecimiento de los axones, y solo pueden purificarse en animales en desarrollo debido a que en el adulto el crecimiento de axones es mínimo en el sistema nervioso central. Los conos de crecimiento son de gran utilidad para el estudio de las moléculas involucradas en el desarrollo y la regeneración neuronal (Gordon-Weeks, 1987; Landis, 1983).

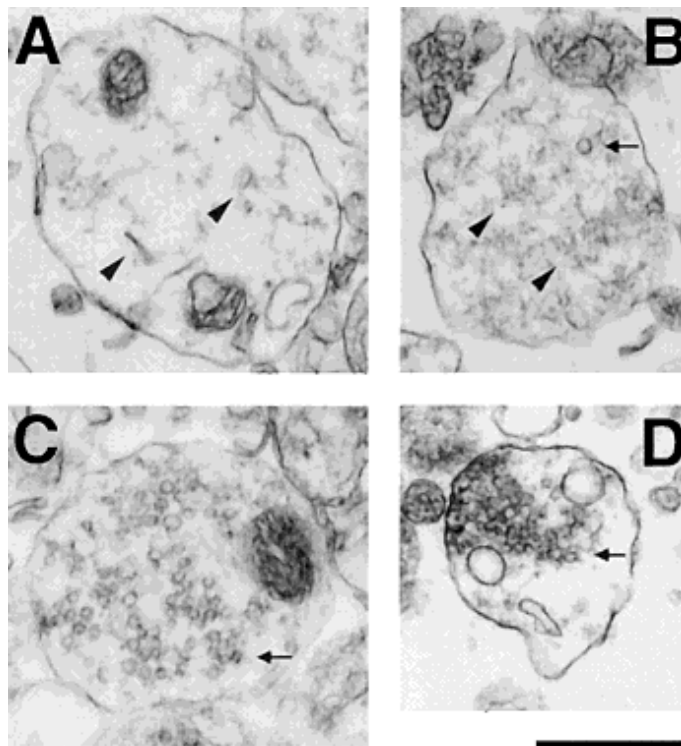


Figura 1.13- Micrografía electrónica de preparaciones terminales nerviosas. Las fracciones de conos de crecimiento de cortezas cerebrales de ratas de estadio postnatal 5 (A, B) contienen partículas que muestran el característico retículo endoplasmático liso (cabeza de flechas), y algunas partículas que contienen pequeñas cantidades de vesículas sinápticas [(B), Flechas]. La fracción sináptica de la misma edad esta enriquecida en partículas que contienen vesículas (C), las cuales en algunos casos aparecen acumuladas en la zona activa opuesta a la densidad postsináptica (no mostrada). Sinaptosomas adultos (D) contienen pequeño retículo endoplasmático liso, pero varias vesículas sinápticas se concentran en la membrana de la zona activa. Escala barra 0.5 μm . Figura tomada y modificada de Patterson *et al* 1999.

1.16. Dominios membranales ricos en colesterol

En el modelo del “mosaico fluido” de Singer y Nicolson, se propone a la membrana plasmática como un mosaico de proteínas integrales flotando en un mar fluido de lípidos (Singer and Nicolson, 1972). Más recientemente, se ha propuesto una visión en la cual los lípidos no están distribuidos homogéneamente o al azar sino conformando dominios lipídicos de diferentes tamaños y tiempo de vida media. La hipótesis original propone que los dominios lipídicos formados en la membrana plasmática están integrados por grupos de esfingolípidos y colesterol mayoritariamente (Brown and London, 2000). El estado físico de estos grupos es presumiblemente similar a fases líquido ordenadas en modelos de membranas, lo que puede conferir resistencia a detergentes tanto a los lípidos que lo forman como las proteínas que se encuentran en ellos. Basado en este concepto los DRMs o dominios resistentes a detergentes son considerados funcionalmente un reflejo de los rafts preexistentes, aunque no sean exactamente los rafts persistentes en la célula viva (Brown, 2002).

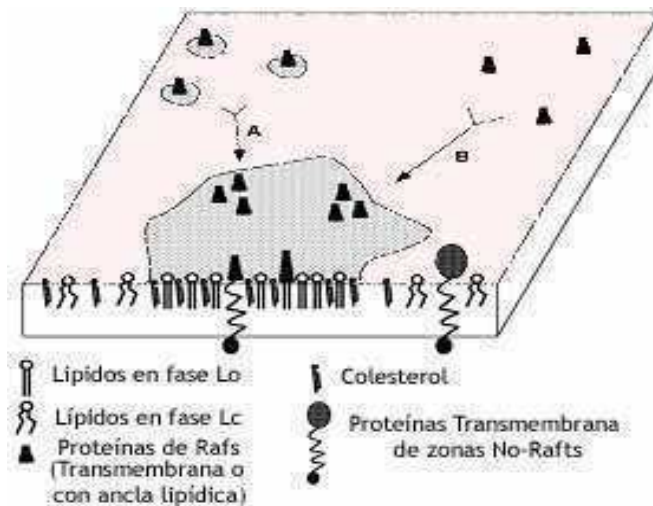


Figura 1.14- Modelo de organización de rafts. Esfingolípidos altamente empaquetados enriquecen la fase L_o de los rafts (gris claro) en la membrana plasmática rica en colesterol. Grupos de proteínas que tienen afinidad por los rafts (se indican con flechas) puede causar tanto pequeños y dispersos rafts conteniendo la proteína como unirse en grandes rafts (A) o incrementar sobre todo la afinidad de los rafts por los clusters de proteínas suficiente para reclutarla en los rafts (B). La formación de grupos de proteínas puede también inducen la formación de rafts. Figura tomada y modificada de Brown, D.A. y London, E. 2000 .

Otro tipo de dominio submembranal son las invaginaciones de la membrana plasmática denominadas caveolas. Estas estructuras están dirigidas por proteínas denominadas caveolinas. Por la técnica de clonado molecular se han descrito tres genes distintos de caveolina (Glenney, Jr. and Soppet, 1992; Scherer et al., 1995; Scherer et al., 1996) y dos isoformas de caveolina-1 (cav-1 α y cav-1 β) derivadas de una iniciación alternativa de la transcripción.

Las caveolinas interactúan con ellas mismas para formar homó u heterooligómeros (Monier et al., 1995; Sargiacomo et al., 1995) los cuales se unen directamente a colesterol y requieren de colesterol para su inserción en modelos de membranas (Li et al., 1996b; Li et al., 1996a; Murata et al., 1995). Los oligómeros de caveolina también interactúan con los glicosfingolípidos (Fra et al., 1995). Estas interacciones proteína-proteína y proteína-lípido son las que dan la fuerza para la formación de la caveola (Sargiacomo et al., 1995).

Caveolina-1 tiene una inusual topología, posee un dominio hidrofóbico central que forma una horquilla dentro de la membrana. Como consecuencia del posicionamiento de este dominio tanto los extremos N-terminal como C-terminal están orientados hacia la cara citoplasmática. Además posee tres sitios de palmitoilación, los cuales no presentan importancia para su asociación a membranas. Esto sugiere que estos grupos palmitoil pueden servir tal vez para otras funciones como la interacción con otras proteínas caveolares (Dietzen et al., 1995; Uittenbogaard and Smart, 2000).

1.17. Acilación de proteínas

Desde que las proteínas son sintetizadas, tanto en ribosomas libres como en el retículo endoplasmático rugoso, tienen la potencialidad para ser modificadas por fosforilación, ubiquitinación, glicosilación, acetilación y lipidación. Estas modificaciones postraduccionales juegan un rol crucial en la respuesta de la célula a estímulos externos. Las modificaciones lipídicas no solo alteran la estructura de la proteína sino también su interacción con membranas lipídicas o otras proteínas. Cuatro tipos principales de lipidación se han identificado: N-miristoilación, prenilación, S-palmitoilación y glipiación (Patterson, 2002).

La N-miristoilación es la adición covalente de un ácido graso de cadena corta, de 14 carbonos o miristato, a un residuo glicina N-terminal vía una unión amida. El mecanismo enzimático es bien conocido, consiste en la remoción de la metionina inicial

por una enzima metionina aminopeptidasa y luego el ácido graso es incorporado mediante una enzima especializada, la N-miristoil transferasa (NMT). Esta modificación se realiza de manera simultánea con la traducción de la proteína, o co-traduccionalmente (Taniguchi, 1999).

La prenilación es la adición de un grupo isoprenoide mediante una unión covalente, tioeter. El grupo adicionado puede tener 15 carbonos, grupo farnesil o 20 carbonos, grupo genanilgeranilo. Esta modificación ocurre de manera postraduccional, y se realiza en la cisteína c-terminal (Sinensky, 2000).

La palmitoilación es la adición covalente de un ácido graso de cadena larga, preferentemente palmitato a un residuo de cisteína mediante una unión tioester, denominándose S-palmitoilación. Sin embargo la palmitoilación también puede ocurrir, aunque en mucha menor frecuencia, mediante una unión estable como la amida a un residuo cisteína o glicina, N-palmitoilación. Un ejemplo bien conocido de esta modificación es la proteína Sonic hedgehog (Pepinsky et al., 1998).

	<i>N-Miristoilación</i>	<i>S-palmitoilación</i>	<i>Prenilación</i>	<i>Glipiación</i>
Grupo y unión	Acido graso y unión Amida	Acido graso y unión tioester	Grupo isoprenoide y unión tioeter	Polisacárido unido a fosfatidilinositol
Localización de la modificación	Glicina N-terminal	Cisteína en cualquier lugar de la proteína	Cisteína C-terminal	Aminoácido C-terminal luego de la señal de clivaje.
Reversibilidad	Unión estable	Unión reversible	Unión estable	Unión estable con remodelación del ácido graso.
Asociación con la síntesis proteica	Cotraduccional	Postraduccional	Cotraduccional	Cotraduccional y postraduccional
Enzimología	Un paso, NMT	Desconocido	Dos pasos, GGtasa	Complejos de síntesis
Tipo de asociación	Con proteínas	Inserción en la membrana	Con proteínas tal vez inserción a membranas	Inserción a membranas
Tipo de proteínas modificadas	Proteínas intracelulares	Proteínas intracelulares o transmembrana	Proteínas intracelulares	Proteínas de la superficie celular
Efecto de la modificación	Asociaciones reversibles inter o intraproteicas	Localización de proteínas a los rafts y compartimentos en células polarizadas	Las proteínas se asocian reversiblemente con varias proteínas intracelulares o membranas	Las proteínas se localizan a los rafts de los dominios membranales apicales o axonales.

Tabla 1- Características de las cuatro mayores clases de acilación proteica. Abreviaciones: NMT, miristoiltransferasa; Ftasa, farnesiltransferasa; GGtasa, geraniltransferasas. Figura tomada y modificada de Patteson *Biol Res* 35, 2002.

La gliptación es la incorporación a la proteína de un ancla de glicosilfosfatidilinositol, (GPI) (Englund, 1993), formada por un fosfatidilinositol conectado a través de un carbohidrato a la proteína. Esta modificación se lleva a cabo en el retículo endoplasmático (ER), y una vez modificada entra en el tráfico de proteínas a través del vía secretora hacia la superficie celular (Ferguson, 1999).

1.18. S-palmitoilación de proteínas

A diferencia de las otras formas de acilación, la S-palmitoilación, es la única modificación lipídica descrita hasta el momento que es un proceso dinámico *in vivo* y puede de esta manera regular la función y localización de proteínas. La naturaleza reversible de la palmitoilación permite a la proteína intercambiarse entre el citoplasma y la membrana plasmática o entre organelas de acuerdo a las señales extracelulares.

A la S-palmitoilación se le ha atribuido numerosos roles biológicos ya que afecta la localización y actividad de numerosas proteínas de señalización, incluyendo la proteína asociada al crecimiento GAP-43 (Skene and Virag, 1989), la subunidad alfa de la proteína G (Degtyarev et al., 1993; Linder et al., 1993), proteínas tirosina quinasas no receptores (Robbins et al., 1995), numerosas proteínas acopladas a proteínas G (Bouvier et al., 1995) y proteínas involucradas en la sinapsis como PSD-95 (El-Husseini et al., 2002).

Como ya mencionamos la palmitoilación es una modificación, dinámica y reversible, capaz de ser regulada por señales extracelulares (Hess et al., 1993). Debido a esta sensibilidad de regulación esta modificación es muy común dentro de las familias de proteínas de señalización. En ciertos casos la palmitoilación confiere una fuerte adhesión a membrana y en otros casos también puede proveer una señal para la localización en dominios tipo rafts (Arni et al., 1998; Robbins et al., 1995; van't and Resh, 1997). En el caso de las proteínas transmembrana se ha encontrado que influye en su actividad y localización en los microdominios membranales, por ejemplo la enfermedad de Huntington. Se ha demostrado que previniendo la palmitoilación de la proteína huntingtina mutada causa una elevación de la toxicidad neuronal (Huang et al., 2004). Lo que sugiere un rol preventivo de la palmitoilación en la enfermedad de Huntington. Por otro lado estudios *in vitro* con la proteína sináptica SNAP-25 también sugieren que la palmitoilación puede intervenir directamente en las interacciones proteína-proteína (Fukata et al., 2004; Washbourne et al., 2001; Washbourne, 2004).

La palmitoilación juega un importante rol en el direccionamiento de axones tráfico de proteínas neuronales y en las interacciones de receptores con proteínas de andamiaje en las sinapsis (El-Husseini and Brecht, 2002; Guirland et al., 2004; Guirland and Zheng, 2007). Un ejemplo bien estudiado es el direccionamiento de la proteína PSD-95 a la membrana postsináptica a través de la palmitoilación y el anclaje de los receptores AMPA a la post-sinapsis excitatoria. Luego de la estimulación con glutamato, la depalmitoilación de PSD-95 es acelerada y este proceso disocia a la proteína PSD-95 y a los receptores AMPA de los sitios postsinápticos, contribuyendo a la regulación negativa de los receptores AMPA (El-Husseini and Brecht, 2002).

Debido a la importancia de la palmitoilación, las proteínas que catalizan esta reacción son de especial interés como nuevos blancos para el tratamiento de muchas enfermedades y desordenes neuronales en los que están involucradas tanto proteínas palmitoiladas como las enzimas palmitoil-transferasas (DHHC). Por ejemplo en la enfermedad de Huntington se ha descrito la enzima DHHC17/HIP14 como la responsable de palmitoilar la proteína hungtingtina, cuya acumulación es la responsable de los síntomas de la enfermedad (Singaraja et al., 2002; Yanai et al., 2006).

A pesar de que la palmitoilación de proteínas está involucrada en importantes funciones fisiológicas, las enzimas que agregan el palmitato a las proteínas, palmitoil-aciltransferasas (PATs) y las que clivan el enlace tioester, palmitoil-proteína-tioesterasa (PPTs), aún después de 30 años del conocimiento de su existencia (Fukata et al., 2004; Greaves and Chamberlain, 2007) .

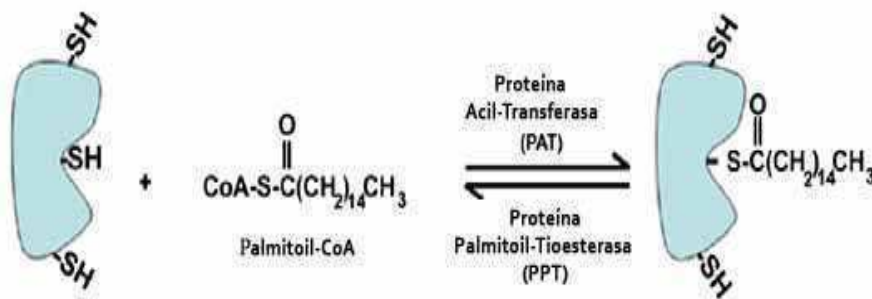


Figura 1.15- Dinámica de la palmitoilación de proteínas. La palmitoilación de proteínas es dinámica y llevada a cabo por enzimas específicas (PATs), las cuales han sido recientemente descritas como una familia de proteínas conocidas como proteínas DHHC. Estas catalizan la adición del palmitato (del palmitoil-CoA) a residuos de cisteínas a través de una unión tioester. Un grupo de enzimas diferentes, palmitoil-Tioesterasas (PPTs) remueve el palmitato de las proteínas. Figura tomada y modificada de Drisdell et al 2006.

Numerosos trabajos bioquímicos han tenido muchas dificultades en el desarrollo de un específico ensayo de palmitoilación y purificando auténticas enzimas PATs. Algunos resultados han sugerido que la palmitoilación en la célula ocurre de manera no enzimática (Duncan and Gilman, 1996) debido a que la formación de la unión tioester en proteínas puede ocurrir espontáneamente *in vitro* en presencia de palmitoil-coenzima-A. Otro punto que puso en duda la real existencia de estas enzimas es la falta de una secuencia consenso conservada en las proteínas palmitoiladas.

Por mucho tiempo se cuestionó la existencia real de las enzimas responsables de la palmitoilación y depalmitoilación, pero recientemente numerosos estudios realizados en levaduras han echado luz sobre este tema tan enigmático. Mediante estudios genéticos se identificaron las proteínas erf2/erf4 (proteína efectora de ras) (Bartels et al., 1999; Lobo et al., 2002) y Akr1 (proteína que contiene repeticiones de ankirina) (Roth et al., 2006) como las palmitoil-transferasas de levaduras para la proteína ras2 y yck2, respectivamente. Deleciones en los genes de erf2/erf4 o Akr1 previenen la palmitoilación de ras2 o yck2, respectivamente. También estas enzimas recombinantes son capaces de palmitoilar *in vitro* sus sustratos específicos.

Resulta interesante que erf2/erf4 y Akr1 tienen cuatro a seis dominios transmembrana y comparten un dominio al que se denomina DHHC, un dominio rico en cisteínas en el que está conservada la secuencia aspartato-histidina-histidina-cisteína. Este dominio es necesario para la actividad de PAT de la proteína erf2 y Akr1, sugiriendo que el dominio DHHC que contienen estas proteínas puede tener funciones generales de PATs. En los siguientes años se han identificado varias proteínas DHHC con funciones de PATs en levaduras, por ejemplo paf3 y paf4 que median la palmitoilación de las proteínas vac8 y chs3 respectivamente (Hou et al., 2005; Lam et al., 2006; Roth et al., 2006; Smotrýs et al., 2005).

Otra gran duda es la existencia de otra clase de PATs además de la DHHC en la célula y si el mecanismo no enzimático tiene importancia biológica dentro de ella. Estas preguntas fueron respondidas por el trabajo de proteómica sistemática realizado por el grupo de Roth (Roth et al., 2006). En este trabajo se estableció un método para purificar palmitoil-proteínas y subsecuentemente analizarlas por espectrometría de masa. Ellos identificaron 35 nuevas palmitoil-proteínas en levadura, además de las 12 conocidas. Aplicaron este método de proteómica a cepas mutantes para las siete proteínas DHHC de la levadura. Cuando se delecionan seis de los siete genes DHHC, 29 de las 30 palmitoil-proteínas no se detectaron palmitoiladas (Roth et al., 2006). Estos resultados

demuestran que las proteínas DHHC pueden ser consideradas auténticas PATs que catalizan la palmitoilación de la mayoría de las proteínas palmitoiladas en levaduras. También en estudios de pérdida de función se observó que la familia DHHC tiene una discreta y parcial superposición de especificidades (Roth et al., 2006).

La familia DHHC posee siete genes en levaduras pero también está muy conservada en otros organismos como el nematodo *Caenorhabditis elegans* (15 genes predichos), la mosca *Drosophila melanogaster* (23 genes predichos) y en mamíferos (23 genes predichos). Es de esperar que la función de esta familia de proteínas este conservada en muchas especies (Tsutsumi et al., 2008).

En el genoma de mamíferos (humano y ratón), fueron predichas 23 clases de proteínas DHHC. Luego varias de estas proteínas fueron identificadas con enfermedades humanas. Por ejemplo mutaciones en la proteína DHHC2 han sido encontrada en varios tipos de cánceres colorectales (Oyama et al., 2000). La proteína DHHC17 la contraparte homóloga de Akr1 en levaduras, fue identificada como la proteína HIP14 que interacciona con huntingtina en vertebrados (Huang et al., 2004; Singaraja et al., 2002). Otras palmitoil-transferasas como DHHC9 y DHHC15 también fueron reportadas por estar asociadas a enfermedades de retardo mental asociado al cromosoma X (Mansouri et al., 2005; Raymond et al., 2007).

Trabajos donde se analizó la pérdida de función en levaduras demostraron una cierta especificidad de sustrato (Roth et al., 2006). De acuerdo a esta especificidad se pueden clasificar las DHHC en subfamilias, debido a que estas especificidades pueden deberse a similitudes estructurales de las mismas. DHHC3 y DHHC7 palmitoilan las proteínas $G\alpha$, SNAP-25, subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A (GABA_AR $\gamma 2$), PSD-95 y GAP-43, sugiriendo que DHHC3 y DHHC7 muestran un amplio campo de especificidad de sustrato. DHHC3 es también conocida como GODZ, DHHC17 como HIP14, DHHC11 como NIDD, y DHHC2 como la proteína ream (Figura 1.16) (Tsutsumi et al., 2008).

La palmitoilación puede ocurrir en cisteínas ubicadas en diferentes partes de la proteína: la región amino terminal en PSD-95, $G\alpha$ y GAP-43; en una región interna en SNAP-25 y GAD-65; en la región carboxiterminal en H-ras y rhoB y en la región yuxtamembranal en proteínas transmembranas. Se espera encontrar una secuencia consenso para cada subfamilia de DHHC, pero hasta el momento solo se pudo ver en resultados preliminares que la DHHC21 favorece sustratos con cisteínas cerca de la

glicina miristoilada, como las proteínas Ick, fyn y eNOS (Figura 1.16) (Tsutsumi et al., 2008).

El fino balance entre la palmitoilación por PATs y la depalmitoilación por PPTs determina los niveles de palmitoilación de un sustrato. La palmitoilación puede ser vista como una segunda señal fuerte de unión a membrana ya que debe haber alguna señal primaria que permita la unión a membrana para la modificación por las enzimas PATs. Debido que hasta la actualidad las proteínas identificadas como PATs fueron únicamente las proteínas transmembranas de la familia DHHC, para que ocurra la palmitoilación debe haber una primera unión a membrana. Esta asociación de la proteína sustrato a la membrana puede ser tanto electrostática en la proteína y los lípidos cargados de la membrana, como por otros grupos lipídicos irreversibles (miristoilación o prenilación).

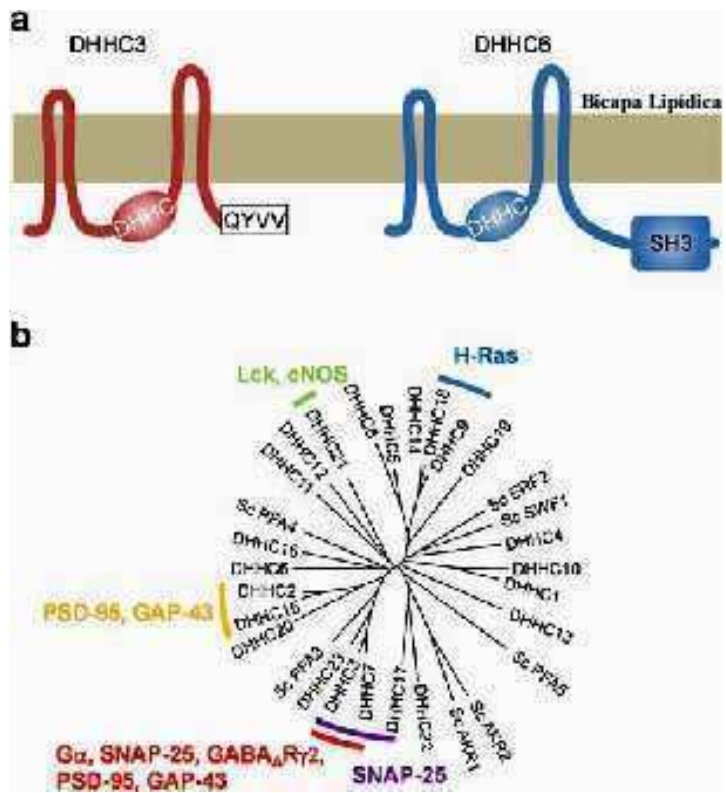


Figura 1.16- Familia de proteínas DHHC en mamíferos. a- Estructura representativa de los dominios de las proteínas DHHC, DC y DC. Estas proteínas tienen cuatro dominios transmembrana y un dominio rico en cisteínas conteniendo el dominio DHHC en el Loop citoplasmático. La secuencia DHHC es esencial para la actividad enzimática de palmitoilación. **b-** Árbol filogenético de la familia de proteínas DHHC de ratón y un resumen las enzimas PATs candidatas para algunas proteínas sustrato. El árbol está basado en el alineamiento de los dominios DHHC. Figura tomada y modificada de Tsutsumi *et al.* 2008

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos

2.1. Animales

Se utilizaron ratas de la cepa *Sprague Dawley* provistas por el Bioterio del Instituto de Embriología e Histología, IHEM-CONICET. Se usaron indistintamente machos o hembras, adultos jóvenes de una edad mínima de 3 meses con un peso aproximado de entre 200-300g. El protocolo de axotomía ciática fue aprobado por el Comité de ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuyo. Según regula este Comité las operaciones deben ser llevadas a cabo por personal médico idóneo, en nuestro caso fue un estudiante avanzado de la carrera de medicina entrenado en cirugía y anestesia de animales de laboratorio. Dicho trabajo fue realizado por el actualmente médico Luis Savastano.

2.2. Reactivos

El medio de cultivo para bacterias LB (Luria-Bertoni) fue preparado con reactivos comercializados por la empresa Britania (Buenos Aires, Argentina). El antibiótico utilizado para la selección del plásmido fue ampicilina comercializada por BAGO Argentina. El medio de cultivo F12 fue de GIBCO (Nutrient Mixture-Invitrogen Corporation, USA). Los marcadores de peso molecular estándar utilizados fueron de BOSTON BioProducts Inc. (Worcester, MA, USA) y de GE healthcare (Uppsala, Sweden). La columna de intercambio iónico QXL prearmada para AKTA fue de GE Healthcare (Uppsala, Sweden). El reactivo ProLong™, Gold Antifade Reagent, fue adquirido en de Invitrogen (Life Technologies). Los lípidos usados en la preparación de los liposomas fueron de Avanti Polar Lipids Inc. (Alabama, USA). La enzima acil-CoA sintetasa fue de Boehringer, Alemania y la coenzima A, el palmitato y la palmitoil-CoA de Sigma Chemicals, (St. Louis, MO, USA).

Todos los otros reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico y obtenido de Sigma Chemicals, (St. Louis, MO, USA), de ICN Biochemicals, (Aurora, OH, USA), USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA) o GE healthcare (Uppsala, Sweden). También se usaron reactivos de empresas locales como Chemeia (Mendoza, Argentina) y Laboratorio Andes (Mendoza, Argentina). El agua utilizada en los ensayos fue de calidad analítica y purificada con un sistema purificador de agua (Barnstead EASY pure; Barnstead/Thermolyne Corp., Dubuque, IA).

2.3. Preparación de sinaptosomas

El protocolo utilizado es una modificación del desarrollado y descrito por Gordon-Weeks en 1987 (Gordon-Weeks, 1987). Se sacrificaron las ratas por medio de la administración de anestesia en forma intraperitoneal y posterior decapitación. La mezcla anestésica elegida fue ketamina 70mg/kg y clorhidrato de xilacina clorhidrato 5mg/kg de peso corporal. De los cerebros separamos el material cortical quitando el material subcortical de ambos hemisferios. Las cortezas fueron homogeneizadas mecánicamente en buffer SHE a 4°C (0.32M sacarosa, 1mM EDTA, 5mM Hepes pH7.4) con homogenizador de vidrio-teflón. Luego se centrifugó el homogenato (1,000xg por 5 minutos), se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se resuspendió el pellet en igual volumen de SHE y se centrifugaron ambas alícuotas nuevamente (1,000xg por 5 minutos). Se juntaron los sobrenadantes y se volvieron a centrifugar a una mayor velocidad (17,500xg por 15 minutos). Finalmente se resuspendieron los pellets suavemente en un volumen equivalente de SHE y se centrifugaron otra vez los tubos (17,500xg por 15 minutos). Se colectaron los pellets en 12 ml de SHE el material con jeringa (aguja 16gx1.5”), el material recolectado en este paso se denomina fracción postnuclear 2 (P₂).

Sobre un gradiente de Ficoll previamente armado y equilibrado a 4°C (8ml 12.5% (p/v) y 18ml 7.25% (p/v)), se sembró en la parte superior la fracción P₂ obtenida. Se separaron los sinaptosomas de impurezas como mielina por ultracentrifugación a 27,000xg durante 60 minutos. Luego se colectó el material de la interfase inferior (entre 7.25% y 12.5%), se procedió a diluir en 5 volúmenes con medio de cultivo F12 (GIBCO) agregando gota a gota durante aproximadamente 30 minutos, permitiendo así que el equilibrio osmótico sea lento. Finalmente se hicieron 3 lavados rápidos a alta velocidad (17,500xg por 5 minutos) para remover todo resto de Ficoll que haya en la muestra final de sinaptosomas.

La concentración proteica se midió mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976) y se ajustó la concentración a 1mg/ml. Finalmente se activaron los sinaptosomas incubando la suspensión a 37°C por 30 minutos. De esta manera el material quedó listo para la marcación con ³H-palmitato o análisis ultra estructural. Para análisis por Western blot de los sinaptosomas se lavan 3 veces con PBS/1mM EDTA. Se disolvió el sobrenadante en buffer de siembra (Tris-HCl pH6.8 125mM/Glicerol 10%/SDS 2%) conteniendo 1mM EDTA y 10mM DTT con calor (98-100°C).

2.4. Preparación de membranas resistentes a detergente DRMs.

A partir de los sinaptosomas purificados, 100mg de peso húmedo, se hicieron dos lavados con PBS/EDTA. Se resuspendió el material en 1ml de TNEX (25mM Tris, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% v/v Triton X-100, pH6.5) a 4°C con inhibidores de proteasas. Se incubó a 4°C por 20 minutos, mezclando cada 5 minutos suavemente con pipeta. Se transfirió 1ml del material tratado con TNEX a un tubo conteniendo 90% (p/v) sacarosa/TNEX y se mezcló con vortex hasta homogeneidad total. A dicho tubo se agregó (desde la parte superior para evitarla mezcla) una solución de 35% (p/v) sacarosa/TNEX (5ml), y luego otra solución de 5% (p/v) sacarosa/TNEX. Se centrifugó 20 horas a 100,000xg y finalmente colectaron fracciones de 1ml desde la superficie y resuspendió el pellet en 1ml TNEX + 2% SDS.

2.5. Electroforesis en gel (SDS-PAGE)

Se utilizaron mini-geles (equipos Hoefer, Inc: SE25 o Mini-VE) de poliacrilamida según protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras se mezclaron con un volumen adecuado de buffer de siembra y se calentaron a 98-100°C durante 2-3 minutos. Las corridas electroforéticas se realizaron con buffer de corrida (glicina 1.5% /Tris base 0.3%/SDS 0.1%) a un amperaje constante de 20-25mA por gel, hasta lograr la separación deseada de las proteínas.

2.6. Western Blot

Luego de la separación electroforética los geles de poliacrilamida se transfirieron mediante una electro-transferencia a una membrana de nitrocelulosa de un tamaño de poro de 0.45µm, en buffer de transferencia (Glicina 1.5%/Tris base 0.3%/Metanol 20%) durante 120 min. a 25 voltios constantes.

La señal inespecífica se bloqueó con solución de leche descremada al 5% con TBS-Tween 20 (Tris-HCl 50mM, pH8; NaCl 150mM; Tween 20 0,1% (v/v)), incubando 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo primario, realizando las diluciones con TBS (Tris-HCl 50mM, pH8; NaCl 150mM) con leche al 5% y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se lavó el exceso de anticuerpo con TBS-Tween 20 al 0.1% (v/v). Finalmente se incubó con el anticuerpo secundario apropiado

conjugado a peroxidasa a la dilución adecuada, realizada en TBS con leche al 5% y se incubó 60 minutos a temperatura ambiente. Por último, se volvió a lavar con TBS-Tween 20 al 0.1% (v/v).

2.7. Quimioluminiscencia

Durante la realización de la tesis doctoral se usaron varios kits comerciales de quimioluminiscencia como ECL (GE healthcare) y Western Lightning (Perkin Elmer). Finalmente optamos por preparar el reactivo quimioluminiscente en el laboratorio. Este reactivo consiste en la mezcla de volúmenes iguales de dos soluciones, la solución 1 (Tris 100mM pH8.5; luminol 2,5 mM; ácido cumárico 0,5mM) y la solución 2 (agua oxigenada al 0,1% en Tris 100mM pH8.5). Obtuvimos excelentes resultados en la intensidad de la señal con la preparación fresca de los reactivos quimioluminiscentes antes de su uso.

La detección de la señal se realizó con un sistema de quimioluminiscencia y siguiente exposición en una placa fotosensible. Se utilizaron dos marcas diferentes de placas con similares características HyperFilm TM ECL High performance (GE healthcare) o CL-XPosure (Pierce, Tecnolab, Buenos Aires, Argentina). También en los últimos experimentos se utilizó un sistema de detección de quimioluminiscencia digital, LAS Fuji.

2.8. Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales anti-GAP-43, fueron producidos y donados por el laboratorio del Dr. David J. Schreyer, Universidad de Sackatchewan, Canadá. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-fyn, rhoB y lyn fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Los anticuerpos anti Thy-1 fueron de BD-Pharmingen (California, USA) (mAb OX.7). Los anticuerpos anti- SNAP-25, VAMP y syntaxina fueron adquiridos en Synaptic System (Goettingen, Germany). Para detectar la enzima PKC se utilizó un anticuerpo solamente contra el subtipo alfa producido por Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Los anticuerpos de las subunidades de las integrinas α_v (Clon F4, Pharmingen) y β_3 (Clon F11, Pharmingen), fueron donados por la Dra. Leyton. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo

conjugados con peroxidasa de rabanito fueron comprados al laboratorio LETH, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

2.9. Cepas de *E. coli*

Para la amplificación del plásmido se utilizó la cepa de *E. Coli* TOP 10, de genotipo: F⁻ end A1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ (ara, leu) 7697 mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻. Para la expresión de la proteína GAP-43 se utilizó la cepa de *E.Coli* BL21 (DE3) de genotipo: F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]).

2.10. Plásmidos

Para la expresión en bacterias de la proteína GAP-43 se utilizó el plásmido pkr172/GAP-43(McLeod et al., 1987), generosamente cedido por el Dr. Díaz Guerra (Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, España). Este plásmido tiene insertada la secuencia codificante para la expresión de la proteína GAP-43 de rata, bajo la dirección de un promotor regulado por IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido).

2.11 Preparación de bacterias Competentes

Se prepararon las bacterias competentes para la recepción y amplificación del plásmido pkr172/GAP-43, por la técnica de CaCl₂. Se partió de un cultivo de 10 ml de medio LB de la cepa bacteriana *E.coli* Top10, crecido durante toda la noche a 37°C. Luego se diluyó con un factor de 1/50 el cultivo crecido durante toda la noche y se crece hasta obtener una densidad óptica de 0,4 (DO₆₀₀=0,4). Se centrifugaron las células y se resuspendieron en ST1 (KCl 10 mM, MOPS 10 mM pH7). Nuevamente se centrifugó, se resuspendió en ST2 (KCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, MOPS 100 mM, pH6.5) y se incubó en hielo durante 20 minutos. Finalmente se centrifugó y resuspendió en ST2 para transformar en el momento o en ST2 con 10% (v/v) de glicerol para guardar a -80°C.

2.12. Transformación de bacteria *E.coli* competentes.

La transformación se realizó agregando el ADN plasmídico a las células competentes e incubando 1 hora en hielo, para luego realizar un shock térmico de 45 segundos a 42°C. Se crecieron las bacterias en medio LB/glucosa 2% 1 hora a 37°C con agitación, y se centrifugaron para sembrar en medio sólido LB-Ampicilina lo que nos permitió seleccionar a las bacterias que habían incorporado el plásmido por su resistencia al antibiótico.

2.13. Extracción de ADN plasmídico

Se utilizó el método alcalino, el cual consistió en inocular 50ml de medio LB-Ampicilina (100µg/ml) con una colonia bacteriana que posea el plásmido que deseábamos aislar. Crecimos a 37°C durante toda la noche y se cosecharon las células por centrifugación. Luego se resuspendió en 2ml de la solución I (Tris-HCl 25mM, pH8; EDTA 10mM), se agregaron 4ml de la solución II (NaOH 0.2 M; SDS 1%) y se mezcló suavemente por inversión. Se dejó 10 minutos en hielo y se agregaron 3ml de la solución III (Acetato de potasio 3M, pH 5.2). Se mezcló suavemente por inversión, se dejó 10 minutos en hielo y finalmente se centrifugó 20 minutos a 10,000xg a 4°C.

Al sobrenadante, se le agregaron 20 ml de etanol 100% y se incubó durante 10 minutos a una temperatura de -20°C. Pasada esta incubación se volvieron a centrifugar 20 minutos a 10,000xg. Se secaron los pellets y se resuspendieron en 0.5ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA). El producto obtenido se trató con RNAsa en una concentración final de 20µg/ml y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se realizaron 2 extracciones fenólicas agregando un volumen de fenol: cloroformo (1:1), se mezcló por inversión, y se separaron las fases por centrifugación (10 minutos a 5,000xg). Se tomó la fase acuosa y se precipitó el ADN con el agregado en una dilución de 1:10 de la solución III antes mencionada, dos volúmenes de etanol 100% se incubó a -20°C durante 20 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 12,000xg, se lavó el pellet con etanol 70%, para eliminar restos de sales y se resuspendió en 0.5ml de agua estéril.

2.14. Expresión y purificación de la proteína GAP-43

Se partió de un cultivo de toda la noche a 37°C en LB-ampicilina, inoculado desde el glicerol. Luego se realizó la expansión del cultivo al día siguiente realizando una dilución 1:100 en medio LB-ampicilina y se creció hasta llegar a una densidad óptica (DO) de 0.4-0.6. Para la inducción se agregó el inductor de la expresión IPTG a una concentración final de 0.4mM, se incubó a 22°C durante toda la noche. Se cosecharon las células a la mañana siguiente centrifugando a 3,000xg 10 minutos y se resuspendió en buffer de lisis (Tris Cl 50mM pH7.5, EDTA 2mM, EGTA 1mM, NaCl 100mM, PMSF 1mM y DTT 50mM). Para la lisis se utilizó la sonicación (8 pulsos de 1 minuto neto, 2 minutos totales 80%). Se centrifugó por 5 minutos a 14,000xg y se trata el sobrenadante con calor 80°C, durante 5 minutos y se centrifuga nuevamente 10 minutos a 14,000xg. Luego se trató con ácido perclórico a 2.5% (v/v) y se centrifugo 30 minutos a 14,000xg. Finalmente el sobrenadante se precipitó con TCA (ácido tricloroacético) al 15% (p/v) final, y se centrifugó por 30 minutos a 14,000xg. Se lavó el pellet 2 veces con la mezcla etanol: eter etílico (1:1), para lavar los restos de TCA. Se resuspendió el pellet en el volumen adecuado y se sembró en una columna de intercambio iónico fuerte QXL para el equipo de purificación FPLC modelo AKTA-GE. Se eluyó con un gradiente de Tris 50mM pH7.4, hasta llegar a Tris 50mM, 1M NaCl y se tomaron alícuotas de 1ml. Luego mediante SDS-PAGE se analizaron las alícuotas eluidas para ser utilizadas en el resto de los ensayos con GAP-43.

2.15. Fosforilación *in vitro* de GAP-43

2 µg de proteína GAP-43 fueron incubados durante 40 min a 37°C con 2 mM DTT, 5mM Cl₂Mg, 10 µM ATP marcado con 100µCi/ml $\gamma^{32}\text{P}$ (NEN PerkinElmer, Migliore Laclaustra), 100µM Cl₂Ca, 140µM fosfatidilserina, 325nM forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), PMSF 1mM, 20mM Hepes pH7.4, en presencia o ausencia de 0,6 U/ml de PKCβII (Calbiochem). Las muestras se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 12,5%, este fue teñido con Coomassie blue, secado y luego expuesto en una placa Pierce CLXPosure.

2.16. *Palmitoilación in vitro de GAP-43 o BSA*

La incorporación del palmitato a las cisteínas libres de las proteínas se realizó incubando la proteína con palmitoil-CoA en buffer Hepes 100mM a un pH determinado (7 u 8) a una temperatura de 30°C durante dos horas. La relación molar palmitoil-CoA: proteína fue variable como se describe en cada ensayo.

2.17. *Preparación de ³H-palmitoil-CoA.*

Se evaporó una alícuota de ³H-palmitato (en etanol) y luego se resuspendió en 10µl de Triton X-100 al 1%. Se agregó coenzima-A 1mM, ATP 10mM, MgCl₂ 10mM y la enzima acil-CoA sintetasa (Boehringer, Alemania) (1 unidad/ml), en buffer Hepes 10mM pH7.5. La reacción se realizó en 200 µl incubando a 37°C durante 2 horas, para detener la reacción se agregó 1ml volúmenes de cloroformo: metanol (1:1). Para hacer evidente la transformación se tomó una alícuota la cual se llevó a un volumen final 100µl, se agregó 275µl de agua y 500µl cloroformo, separó las fases orgánica y acuosa mediante centrifugación. Sobre las fases separadas se realizó una cromatografía en capa delgada (TLC) con una fase móvil compuesta por butanol/ácido acético/agua (5:2:3). Se realizó la fluorografía con PPO (2,5-difeniloxazole) en éter etílico al 10% (p/v) y se expuso a una placa sensible a -70°C.

2.18. *Fluorografía de geles SDS-PAGE*

Se tiñó el gel con Coomassie blue (solución de Azul de Coomassie R-250 0.1% en metanol 40%, ácido acético 10%) y se destiñó con ac.acético/ etanol (5% / 30%). Luego se trató el gel con una solución APEX (55% AC. acético, 2% PPO, 30% Xileno, 15% etanol) durante una hora. Se lavó dos veces durante 20 minutos con agua destilada. Finalmente se trató con una solución de metanol/glicerol (30%/10%) y se secó para exponer a una placa fotosensible a -70°C.

2.19. Preparación de liposomas

Los lípidos se disolvieron en solvente orgánico (cloroformo o cloroformo: metanol dependiendo del lípido) asegurando una mezcla homogénea y se armaron así las diferentes composiciones. Luego la mezcla de lípidos se secó suavemente inyectando nitrógeno líquido con una aguja. Para asegurar una total evaporación del solvente se dejó en una cámara de vacío toda la noche. La hidratación del film de lípidos se realizó agregando lentamente el medio acuoso con agitación continua. La temperatura de hidratación debía estar por encima de la temperatura de transición (T_m). Para la hidratación de las vesículas se utilizó buffer Hepes pH7. El producto de la hidratación fueron vesículas multilamelares (LMV) con una estructura análoga a las capas de una cebolla. Una vez que la muestra estaba totalmente hidratada, se cargó en una de las jeringas del equipo y colocamos cuidadosamente en un extremo del extrusor (Avanti lipids). Se empujó suavemente el embolo de la jeringa para que la solución de lípidos pasara por la membrana y las vesículas pasen a ser unilamelares (LUV). Se pasó 10 veces la misma muestra de lípidos hasta que la suspensión se volvió una solución transparente.

2.20. Resonancia paramagnética electrónica (EPR)

Los marcadores de espín liposolubles utilizados fueron 5, 12 y 16 SASL adquiridos a Sigma. Se prepararon soluciones madre (8.67 mM) en etanol 100% (Merck), que se conservaron a -70 °C. La incorporación del marcador de espín en las muestras se realizó de la siguiente manera: primero se depositó en un eppendorf una cantidad de la solución madre conteniendo como máximo el 1% molar de los lípidos totales a marcar y se dejó evaporar el solvente (etanol absoluto). Luego se incorporó la suspensión de membranas y se incubó la mezcla a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Cumplido el tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue descartado de manera de eliminar el marcador no incorporado. Los espectros de EPR fueron registrados a $25 (\pm 1)$ °C y a 9.7 GHz (banda X) en un espectrómetro Bruker ER 200. Las muestras fueron ubicadas en capilares de vidrio, sellados en un extremo y ubicadas en tubos de cuarzo de 4 mm de diámetro exterior. La frecuencia de modulación del campo fue de 100 KHz y la amplitud del campo de modulación se mantuvo siempre por debajo del 30% de los anchos de línea, para evitar

distorsionar los espectros por sobre modulación. El campo central fue de 3340 G y se barrieron 100G en 200 segundos.

2.21. Marcación metabólica de sinaptosomas con ^3H -palmitato.

Luego de su purificación en el gradiente de Ficoll se lavaron los sinaptosomas con medio F12, dos veces. Se diluyeron a una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ final se incubaron los sinaptosomas con ^3H -palmitato a $1\text{mCi}/\text{ml}$, a 37°C por 30 minutos o una hora. Luego se precipitaron las proteínas con la técnica de cloroformo metanol, se resuspendió en buffer de muestra y se realizó un SDS-PAGE para analizar la señal por fluorografía.

2.22. Ensayo de intercambio químico del ácido graso (ABE)

2.22.1. Bloqueo con *N*-etilmaleimida (NEM)

Se bloquearon las muestras durante toda la noche a 4°C , con NEM a distintas concentraciones. Se utilizaron diferentes buffers para el bloqueo: para la fracción P_2 se uso un buffer de lisis (PBS/EDTA 1mM /Triton 1% (v/v) y para el bloqueo de BSA se probaron varios búferes PBS, Tris y Hepes como se describe en el capítulo 2.

2.22.2. Clivaje de palmitatos con Hidroxilamina

Se trataron las muestras con hidroxilamina 1M , $\text{pH}7$ (preparada en el momento) durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de este tratamiento las proteínas se precipitaron con TCA al 15% y el pellet se lavó con la mezcla de etanol:éter etílico (1:1) antes de resuspender en buffer de siembra para SDS-PAGE.

2.22.3. Marcación de cisteínas libres con biotina-maleimida

Se resuspendió en $200\mu\text{l}$ de 50mM Tris $\text{pH}7.4$, 1mM EDTA, inhibidores de proteasas y $20\mu\text{l}$ de 4mM biotina-maleimida disuelta en DMSO y se mezclaron suavemente por una hora a temperatura ambiente. Luego se precipitaron las proteínas a temperatura ambiente con la técnica de cloroformo:metanol. Finalmente se resuspendieron en $200\mu\text{l}$ de buffer de siembra. Las muestras se analizaron por Western blot.

2.22.4 Revelado de las biotinas con estreptavidina-peroxidasa

La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 (Tris-HCl 50mM pH8, NaCl 150mM; 0.1% Tween20(v/v)) durante 30 minutos, luego se agregó la estreptavidina conjugada a peroxidasa y se incubó durante una hora. Finalmente se lavó con TBS-Tween y se reveló por quimioluminiscencia.

2.23. Axotomía unilateral

Se expuso el nervio ciático mediante una incisión cutánea en el segmento medio del muslo, y se procedió a la identificación del nervio ciático entre los haces musculares. Una vez localizado el nervio, se utilizó una pinza de microcirugía (nº7) con la cual se comprimió el nervio intensamente 2 veces durante 10 segundos, produciendo de esta manera una axonotmésis (o lesión axonal por compresión). Al realizar los pinzamientos podemos observar una contracción refleja del miembro inferior ipsilateral (lo que indica que realmente se está comprimiendo el nervio ciático). Este procedimiento es equivalente a una neurotomía, pero con la ventaja de dejar intacta la vaina y los tejidos de sostén del nervio permitiendo la regeneración axonal a través de la lesión. Una vez finalizado el procedimiento se cerró la piel con puntos separados con hilo seda o con grampas. Se administró por única vez durante las primeras 48hs un analgésico potente (0,1ml de Ketorolac 15mg/ml) por vía intraperitoneal.

2.24. Preparación de las muestras para Western Blot

Luego de 2, 7 o 14 días de la cirugía las ratas se sacrificaron por anestesia y posterior decapitación para la extracción del segmento medular lumbo-sacro con sus respectivas raíces, ganglios y el nervio ciático. Dichas muestras de tejido se procesaron sumergiéndolas en buffer de siembra (Tris-HCl pH6.8 125mM, glicerol 10%, SDS 2%) y se trituraron con ultraturrax durante 30 seg. a velocidad media. Luego fueron tratadas por ciclos de calor y sonicación en baño para la lisis total del tejido.

2.25. Preparación de las muestras para inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Luego de 2, 7 o 14 de la cirugía, las ratas fueron anestesiadas, profundizadas intracardiamente con una solución de lavado para luego profundizar con una solución de fijado (paraformaldehído al 4% v/v). Luego se extrajo el segmento medular lumbo-sacro con sus respectivas raíces, ganglios y el nervio ciático. Se sumergió el tejido durante 24hs en paraformaldehído al 4% completando la fijación y una vez finalizado dicho tiempo fue sumergido en sacarosa al 30% durante 48hs para lograr la crioprotección.

Las muestras para IFI (médula espinal de la zona L4-L5, DRG control, DRG crush, nervio ciático control y nervio ciático crush [zona de lesión]) fueron diseccionadas, colocadas cuidadosamente sobre pequeños fragmentos de nitrocelulosa, de un tamaño aproximado al del tejido, luego se cubrió este con alcohol polivinílico (Frozen Section Medium, StepHen Scientific™), que sirvió para proteger el tejido y facilitar su manipulación; a continuación las muestras son sumergidas en isopentano a -80°C durante 2 minutos. Después, las mismas son colocadas en tubos de plástico enfriados y guardadas a -80° C, hasta el momento de su utilización.

En el momento de montar las muestras sobre portaobjetos, éstas fueron llevadas al crióstato (-27° C) y dejadas durante 20 minutos, para permitir que se equilibre la temperatura. A continuación se colocaron las muestras sobre un taco de aluminio, y se cortaron secciones transversales (médula) y longitudinales (nervios y DRGs), de 18 µm de espesor. Las secciones fueron luego colocadas sobre portaobjetos cubiertos con polilisina (médula) ó gelatina 1% (nervios y DRGs). Las muestras fueron guardadas en freezer a -20° C, en cajas de plástico y con grageas de sílica gel (para mantener un ambiente seco) hasta su utilización.

2.26 Preparación de portaobjetos para montaje de secciones

Los portaobjetos se sumergieron durante 60 minutos, a temperatura ambiente (RT) en HCl 2N para limpiarlos, luego se enjuagaron bajo agua corriente durante 20 minutos, y se realizaron 2 lavados más con agua bidestilada. A continuación se secaron en estufa durante 1 hora. Los portaobjetos para cubrir con poli-Lisina fueron sumergidos en una solución 1/10 de poli-L-Lys (Sigma-Aldrich™, concentración stock: 0.1% (w/v), P.M: 150,000-300,000) durante 5 minutos y secados en estufa durante una hora. Para los portaobjetos con gelatina 1%, se preparó una solución de 2,5 gr. de

gelatina (Merck) y 0,25 gr. de dicromato de potasio (Merck), en agua bidestilada a 60°C, se sumergieron los portaobjetos en la solución y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente.

2.27 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Las muestras fueron sacadas de -20°C y se las dejó tomar temperatura ambiente en su caja cerrada. Luego los portaobjetos utilizados fueron colocados en cámara húmeda e hidratados durante 5 minutos con buffer inmuno-Tris pH6.9 (Tris-HCl 1 M, NaCl 5 M). A continuación fueron llevados a 120° C y 2 atmósferas de presión en buffer citrato pH6 (citrato de sodio 0.1 M). Se enjuagaron 5 minutos en buffer inmuno-Tris, se hicieron 2 lavados. Después, las muestras se incubaron con NH₄Cl 50 mM durante 20 minutos, seguidos de 3 lavados de 5 minutos cada uno. A continuación las muestras se incubaron con la solución de bloqueo (BSA, 5% p/v; Tween- 20, 0.01% v/v y suero de la especie animal de la cual se obtuvo el anticuerpo secundario, 10% v/v; en buffer inmuno-Tris), durante 20 minutos. Luego se incubaron las muestras con anticuerpos primarios en solución carrier (misma composición que el bloqueador, sin el suero animal) reactivo para: Thy-1 (1:1000, monoclonal), subunidad α_v de integrina (1:500, cabra o 1:1000, monoclonal), subunidad β_3 de integrina (1:500, cabra o 1:1000, monoclonal), GAP-43 (1:1000, monoclonal), , GFAP (1:200, cabra) y control negativo (sin anticuerpo primario). La incubación se hizo a 4°C durante toda la noche en cámara húmeda.

Al día siguiente se retiró la cámara de la heladera y se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno con inmuno-Tris, y 2 lavados de 15 minutos cada uno con la misma solución. Luego se incubaron las muestras (con el mismo carrier del anticuerpo primario) con el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo: Ig de conejo anti ratón-Alexa 488 (verde, 1:600), Ig de burro anti-cabra-Cy3 (rojo, 1:800), Ig de burro anti cabra-Alexa 488 (verde, 1:300); o bien, un anticuerpo secundario conjugado a biotina: Ig de caballo anti ratón-biotina (1:200) o Ig de caballo anti cabra-biotina (1:200). El tiempo de incubación de los anticuerpos secundarios fluorescentes fue de 90 minutos a temperatura ambiente. En el caso de los anticuerpos conjugados a biotina, terminada la incubación, se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno y se incubó la muestra con un conjugado estreptavidina-FITC (verde, 1:400), o bien estreptavidina-Texas Red (rojo, 1:400) durante 1 hora más; el propósito de este método, se basa en la

afinidad de la estreptavidina por la biotina, lo que hace la localización más específica. Todas las incubaciones, lavados y tratamientos posteriores se hicieron en oscuridad, para no agotar los fluoróforos.

Terminada las incubaciones de anticuerpos secundarios y/o conjugados de estreptavidina, se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno y 2 más de 15 minutos cada uno, con inmuno Tris, seguido de un lavado más con PBS o bien con un buffer de equilibrio (Molecular Probes), durante 5 minutos, se retiró el líquido y se dejó secar levemente. A continuación se realizó el montaje de las muestras, en este paso se agregó a la muestra un medio de montaje, que por un lado impide la deshidratación y contaminación de la muestra, y por otro contiene un compuesto que impide que la muestra pierda fluorescencia rápidamente, el más usado de estos compuestos es el n-propil galato.

Entonces se agregó el medio de montaje, que puede ser preparado por nosotros (glicerol 80% (v/v), PBS 1M 16% (v/v) y n-propil gallato 4% (p/v), ó comercial (ProLong™, Gold Antifade Reagent, de Invitrogen), este último contiene además 2% (w/v) de DAPI (colorea núcleos, azul fluorescente). Cualquiera de los dos medios contiene 0.001% (p/v) de azida sódica, para prevenir contaminaciones biológicas. A continuación se colocó el cubreobjetos, con el cuidado de no dejar burbujas, y sin presionar el centro del portaobjetos, ya que se podrían dañar las muestras, y se sellaron los dos vidrios con esmalte común para uñas, se dejaron secar 20 minutos y se guardaron hasta su uso a 4°C en oscuridad.

Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Nikon EZ-C1™ y fueron analizadas con el programa Nikon EZ-C1 freeviewer™, o con un microscopio confocal Olympus FV-1000™ y con el programa FV10-ASW™ viewer.

2.28. Análisis estadístico

Las diferencias entre las condiciones experimentales y controles se analizaron por el test ANOVA de una vía o el Test T de student. También se utilizó el test de Tukey-Kramer post hoc para el ANOVA. Las diferencias serán consideradas significativas con un $p < 0,05$ entre los grupos experimentales.

RESULTADOS

CAPÍTULO 3

***Regulación de la
composición de complejos
submembranales en
respuesta a señales
relacionadas con el
desarrollo y la regeneración
neuronal.***

3.1 Introducción al capítulo 3

Desde hace varios años que se ha planteado un debate acerca de las ventajas y/o desventajas del uso de las diferentes técnicas para la identificación de los dominios lipídicos presentes en la membrana plasmática. Estos dominios lipídicos pueden ser identificados mediante distintas técnicas, que pueden ser bioquímicas, físicas o de microscopía. El debate sigue abierto en la actualidad en torno a si los microdominios observados por las diferentes técnicas tienen su correlación como dominios biológicos similares dentro de la membrana en la célula viva (Munro, 2003).

En el desarrollo de esta tesis por razones históricas y metodológicas utilizamos la técnica bioquímica de solubilización de proteínas en membranas con detergente no iónico. Esta técnica consistió en el tratamiento de las membranas con Triton X-100 en frío (ver sección 2.4) y posteriormente purificar las proteínas de los dominios resistentes a detergentes (DRMs) mediante ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa. De esta manera se pueden separar las proteínas extraídas de la membrana por su densidad, que la ubica a distintas densidades del gradiente dependiendo de la cantidad y calidad de lípidos asociados a la proteína. Cuando la solubilización no es total debido a la naturaleza de los lípidos que acompañan a la proteína haciendo que su densidad sea menor por lo tanto en el gradiente se ubica en fracciones superiores del mismo. La resistencia, parcial o total a la solubilización por detergentes en frío está dada principalmente por el grado de ordenamiento lipídico de los dominios en los que están presentes las proteínas en la membrana (Brown, 2006).

Los lípidos que conforman las membranas pueden encontrarse básicamente en tres estados de ordenamiento: 1) gel o sólido, 2) líquido cristalino también llamado desordenado y 3) líquido ordenado. La fase de ordenamiento o estado adoptada por los lípidos en la membrana depende en gran parte de la estructura lipídica (longitud y saturación de las cadenas de carbono) como así también de la temperatura del medio. Por ejemplo la esfingomielina tiene cadenas de carbono largas y saturadas por lo que mezclas lipídicas ricas en esfingomielina tienden a adoptar fases sólidas (gel), las cadenas insaturadas que se encuentran en los glicero fosfolípidos tienden a enriquecer las fases líquidas de la membrana (van Meer et al., 2008). Sin embargo también es importante para el ordenamiento lipídico las estructuras más complejas como los grupos prenoides o esteroides presentes en una gran variedad de lípidos celulares. Por ejemplo

tanto los esteroides como el colesterol, en una bicapa lipídica formada presentan una fase líquido ordenada (van Meer et al., 2008).

El alto grado de empaquetamiento de las cadenas acilo que se presentan en los estados gel y líquido ordenado es considerado la principal causa de la resistencia a detergentes en frío que presentan estos dominios. Podemos llegar a comparar a los DRMs con los dominios de la membrana en fase líquido ordenada (Lo) similares a las balsas lipídicas funcionales conocidas como “rafts”. Conocemos que los dominios identificados como DRMs no son exactamente los mismos dominios “rafts” existentes en la célula intacta, pero a nivel funcional pueden ser considerados equivalentes. Esta técnica de purificación de DRMs nos permite estudiar las proteínas presentes en estos dominios lipídicos y su importancia funcional, desde un enfoque bioquímico.

La ventaja de la utilización de aparatos de baja complejidad en el desarrollo de esta técnica se ve opacada por la desventaja que presenta un protocolo bastante extenso donde la manipulación del operador es fundamental. Sin embargo en nuestro laboratorio esta técnica estaba muy bien descrita y utilizada exitosamente (Patterson, 2002) Teniendo en cuenta las limitaciones, la técnica de purificación de dominios por resistencia a detergente como en Triton X-100 frío es aceptada y utilizada en muchos trabajos para la caracterización de proteínas ubicadas en estos dominios membranales (Edidin, 2003; Gil et al., 2006; Patterson, 2002).

Cuando analizamos la funcionalidad de los dominios lipídicos podemos ver que existen muchos ejemplos de proteínas involucradas en la transducción de señales presentes en estos dominios membranales. Un ejemplo clave en nuestro estudio es la proteína relacionada al crecimiento neuronal, GAP-43, que se presenta en niveles elevados en los DRMs de sinaptosomas de cerebro de rata (Maekawa et al., 1997; Meiri and Gordon-Weeks, 1990) de manera dependiente de la palmitoilación (Arni et al., 1998; Trenchi et al., 2009) sugiriendo la importancia de estos dominios en el funcionamiento de las terminales nerviosas.

Si analizamos la maduración de las terminales nerviosas desde los conos de crecimiento hasta la sinapsis madura, podemos observar que ocurre un cambio en la composición de las proteínas encontradas en los DRMs. Entre estos cambios podemos mencionar una regulación negativa de GAP-43, y una regulación positiva de proteínas sinápticas palmitoiladas como VAMP y SNAP-25. La palmitoilación de proteínas tiene un papel importante en el reclutamiento de las moléculas de señalización a complejos membranales y un rol fundamental en la biología de la formación de las terminales

nerviosas en el adulto. La identificación de nuevas proteínas blanco para esta modificación es esencial para el estudio del sistema nervioso tanto durante el desarrollo embrionario como en la adultez en la regeneración luego de la injuria neuronal (Patterson, 2002; Patterson and Skene, 1999).

Varios grupos las proteínas que han sido descriptos como involucradas en la regeneración y desarrollo neuronal, entre los grupos que trabajaremos en este capítulo se encuentran las proteínas asociadas al crecimiento como GAP-43, la familia src (las quinasas fyn y lyn), la superfamilia de pequeñas proteínas G (rho) y las proteínas SNAREs (SNAP-25 y VAMP).

La proteína asociada al crecimiento GAP-43, es una de las proteínas más abundantes tanto en los conos de crecimiento neuronales como en las terminales nerviosas adultas. Es uno de los principales sustratos neuronales de la proteína quinasa C (PKC) y es defosforilada por la fosfatasa calcineurina (Baudier et al., 1989). Otra característica importante es que GAP-43 posee dos cisteínas palmitoiladas cuya presencia es en principio fundamental para su ubicación en diferentes dominios membranales como los DRMs (Arni et al., 1998; Trenchi et al., 2009). Funcionalmente GAP-43 está involucrada en la extensión de neuritas así como en la plasticidad neuronal y se sobre-expresa luego de una injuria neuronal (Denny, 2006; Skene, 1989).

En sistemas celulares como la línea celular PC12 la inducción a fenotipo neuronal por el tratamiento con NGF es acompañada por un marcado incremento en los niveles de GAP-43, así como cambios en su ubicación membranal (Van Hooff et al., 1986; Van Hooff et al., 1989). Se ha visto que este aumento de GAP-43 podría ser debido a que el NGF regula el tiempo de vida media del RNA mensajero que codifica para la proteína (Irwin et al., 2002). Resultados recientes describen a la fosforilación de GAP-43 por la quinasa PKC en serina 41 como un paso que modula los comportamientos de crecimiento de neuronas mediante cambios en la distribución membranal (Nguyen et al., 2009). Por otro lado también se ha demostrado que la fosforilación de GAP-43 se ve estimulada por el tratamiento con la neurotrofina NGF en conos de crecimiento (Meiri and Burdick, 1991).

La familia de proteínas src (SFKs) presenta cinco principales miembros (src, fyn, lck, lyn y yes) que juegan un rol fundamental en la señalización celular dentro del sistema nervioso. Entre los numerosos procesos en los que se encuentra involucrada esta familia podemos destacar su importancia en la plasticidad sináptica, a través de la regulación de la actividad de los canales Ca(V) y receptores NMDA (Kalia et al., 2004).

Una función llevada a cabo por este grupo de proteínas y relevante para este trabajo es la señalización en el crecimiento de neuritas durante la respuesta a la neurotrofina NGF en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Tucker et al., 2008).

Un tercer grupo de proteínas relacionadas es la superfamilia ras conformada por al menos 50 pequeñas proteínas monoméricas de unión al nucleótido GTP. Los miembros de esta superfamilia están involucrados en muchas funciones celulares, incluyendo regulación del crecimiento y diferenciación, tráfico intracelular y control del citoesqueleto (Downward, 1991). Cinco subfamilias se han descrito basándose en similitudes básicamente estructurales más que funcionales. De las subfamilias más importantes existen tres estrechamente relacionadas: ras (N-ras, H-ras y K-ras), rab (numerosas isoformas) y rho (rho, rac y cdc42, con varias isoformas de cada una). Todas las proteínas miembros de la superfamilia ras se encuentran isopreniladas, pero solo algunas son además palmitoiladas (Hancock et al., 1989; Hancock, 2003). Entre las más estudiadas se encuentran las proteínas ras, mientras las isoformas H y N-ras son farnesiladas y palmitoiladas, la isoforma K-ras es únicamente prenilada. Muchas de las isoformas de la subfamilia de proteínas rho también son palmitoiladas, entre las mejores descritas se encuentran rho-B, rac-1 y cdc42. Similar a la fosforilación de proteínas la palmitoilación es un proceso reversible dinámicamente regulado por estímulos celulares específicos. De esta manera la palmitoilación provee un potencial mecanismo de control de la señalización celular por factores neurotróficos (Huang and El-Husseini, 2005).

Muchas proteínas miembros de este grupo son traductoras de los caminos de señalización de los receptores de neurotrofinas como trk o p75NTR. Por ejemplo el receptor trk activa una vía de señalización a través de ras que regula la supervivencia neuronal y la diferenciación a través de la activación de los caminos de quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la quinasa regulada por la señal extracelular ERK (Huang and Reichardt, 2003). Las vías de señalización del receptor p75NTR son menos conocidas pero también se ven involucradas en sus caminos de activación varias de estas pequeñas proteínas G como rac1, rhoA y cdc42 hasta el momento (Roux and Barker, 2002).

Las proteínas SNAREs son proteínas unidas a membrana que intervienen activamente en el proceso de fusión de membranas mediante la formación de complejos SNARE. Básicamente el complejo SNARE está formado por tres proteínas: VAMP (vesicle-associated membrane protein) también conocida como sinaptobrevina, SNAP-25 (synaptosome-associated protein of 25kDa) y syntaxina. Las SNAREs asociadas a

neuronas son VAMP-2, SNAP-25 y syntaxina-1 (Duman and Forte, 2003). La proteína syntaxina posee dominios transmembrana para anclarse a membrana mientras que SNAP-25 y VAMP se encuentran ancladas a través de ácidos grasos de cadena larga como el palmitato. La S-palmitoilación en estas y en otras proteínas presinápticas regula su tráfico intracelular y función celular (Prescott et al., 2009).

En este capítulo nos propusimos identificar factores fisiológicos y farmacológicos que activen las cascadas de señalización involucradas en el crecimiento y regeneración axonal. De esta manera analizaremos la ubicación submembranal en los dominios membranales resistentes a detergentes (DRMs) de distintas proteínas de conocida intervención en el crecimiento neuronal ante diferentes estímulos farmacológicos y fisiológicos.

Para llevar a cabo nuestro objetivo utilizamos el modelo de sinaptosomas de corteza cerebral de rata utilizado en varios trabajos del laboratorio (Patterson, 2002; Patterson and Skene, 1999) Este modelo nos permite el estudio de aspectos fisiológicos y farmacológicos de la función sináptica de una manera simple sin ser necesaria la utilización de dificultosos cultivos primarios de neuronas.

Luego aislaremos las fracciones resistentes a detergentes o DRMs mediante la extracción de las proteínas por detergente no iónico frío, en nuestro caso utilizaremos Triton X-100 y la separación por ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. Finalmente por la técnica de Western blot analizaremos las distintas fracciones del gradiente específicamente cada una de las proteínas que nos interesa estudiar (ver capítulo 2.4 y 2.7).

3.2 Resultados y discusión

Nuestro primer objetivo específico era el estudio de la localización submembranal de ciertas proteínas palmitoiladas que intervienen en la plasticidad y regeneración neuronal. Para llevar a cabo esto realizamos una estimulación de sinaptosomas con determinadas sustancias relacionadas con cascadas de señalización. Elegimos agentes fisiológicos y farmacológicos involucrados de alguna manera en el desarrollo embrionario y la extensión de neuritas en adultos. Luego analizamos la ubicación submembranal en dominios DRMs de proteínas involucradas en la traducción de señales asociadas con crecimiento y plasticidad.

La primera estimulación que realizamos fue con una neurotrofina como el NGF (nerve growth factor) que actúa a través de los receptores celulares de neurotrofinas (trk y p75NTR) presentes en la membrana de los sinaptosomas. También elegimos utilizar una proteasa extracelular trombina, que está descrita como importante en la función de la reacción a injuria neuronal y es activadora de los receptores celulares PARs (receptores activados por proteasas).

Por otro lado decidimos utilizar agentes estimulantes de los mecanismos internos como el ionóforo A23187 que aumenta la permeabilidad al calcio aumentando las concentraciones intracelulares del ion activando las cascadas gaviadas por él. Otro estímulo interno fue un ester de forbol como en acetato de forbol miristato (PMA) que activa a la proteína quinasa C (PKC). Por último usamos el dibutilil AMPc el cual es un análogo permeable del AMPc capaz de activar la proteína quinasa A (PKA).

La glicoproteína Thy-1 es un conocido y utilizado marcador de dominios membranales DRMs. En nuestro trabajo utilizamos esta proteína como marcador de las fracciones del gradiente para la identificación de los dominios DRMs de una manera más precisa y evitar las diferencias entre experimentos. Esta proteína no solo fue un marcador para la identificación de los dominios DRMs sino que también fue utilizada como un control positivo del método de extracción y separación de los DRMs.

Analizamos las fracciones del gradiente de sacarosa mediante la técnica de Western blot utilizando anticuerpos específicos para detectar las proteínas adecuadas. Mediante el programa Image J cuantificamos las intensidades de las bandas correspondientes a dichas proteínas ubicadas en los DRMs y calculamos el porcentaje normalizando sobre el total de la señal de la proteína en todo el gradiente de sacarosa. Numerosos trabajos han responsabilizado directa o indirectamente a las anclas hidrofóbicas como palmitatos, glicosilfosfatidilinositol (GPI), miristatos u otros lípidos de ubicar a las proteínas en los subdominios DRMs dentro de la membrana (Arni et al., 1998; Greaves and Chamberlain, 2007; van't and Resh, 1999). En nuestro trabajo muchas de las proteínas analizadas están modificadas por la incorporación de lípidos en su estructura como por ejemplo ácidos grasos de cadena larga como es el caso de la S-palmitoilación. De esta manera el objetivo final de este trabajo fue analizar la importancia de la palmitoilación en la ubicación submembranas y sus cambios ante determinados estímulos.

Con este trabajo quisimos identificar los estímulos que activen la palmitoilación de determinadas proteínas neuronales relacionadas con las vías de señalización que están

involucradas en el desarrollo, plasticidad y regeneración. De manera indirecta al estudiar cuales son las palmitoil-proteínas que cambian su localización en DRMs ante los estímulos utilizados, podemos identificar las proteínas candidatas a tener un papel importante en la regeneración neuronal. La expresión de las proteínas candidatas sería luego analizada en el modelo de lesión del nervio ciático con el fin tratar de esclarecer este complejo y tan misterioso proceso como es la regeneración neuronal.

3.2.1 NGF (*Nerve Growth Factor*)

Comenzamos por analizar el sistema de sinaptosomas de corteza cerebral aislados ante el tratamiento con la neurotrofina, NGF. Habíamos leído en trabajos que la estimulación con otro factor de crecimiento como el IGF-I (insulin-like growth factor o factor de crecimiento de tipo insulina) se había observado la estimulación de la fosforilación de la proteína caveolina-1 presente en las caveolas. Esta fosforilación producía la translocación de sustratos del receptor de IGF-I como IRS-1 y src a los rafts lipídicos (Biedi et al., 2003; Maggi et al., 2002).

Nosotros elegimos para trabajar la neurotrofina NGF por su amplio rango de expresión central y por su papel en el desarrollo y la plasticidad neuronal (Campenot, 1994; Freed, 1976; Zou et al., 1999). Ambos NGF y sus receptores (trk y p75NTR) son producidos durante el desarrollo, la vida adulta y como la vejez por muchos tipos celulares tanto en el SNC como en el SNP, sistema inmune e inflamatorio y en varios tejidos (Bonhoeffer, 1996; Sofroniew et al., 2001). Luego de la estimulación con NGF analizamos varias proteínas palmitoiladas involucradas en las vías de señalización de esta neurotrofina, comparando su ubicación en los DRMs contra un control sin estimulación.

Brevemente podemos decir que el ensayo realizado consistió en la purificación de los sinaptosomas según el protocolo descrito en detalle en materiales y métodos (ver sección 2.3). Luego estos sinaptosomas son estimulados con NGF (100ng/ml) durante 30 minutos previos a la extracción de los DRMs (ver sección 2.4) y se analizan las fracciones por técnica de Western blot (ver secciones 2.5 y 2.7). En la elección de la concentración de NGF utilizada tuvimos en cuenta que fuera saturante, para una estimulación máxima y rápida de los sinaptosomas en pruebas de diferenciación y supervivencia neuronal, extensión de neuritas y activación de cadenas de señalización intracelular (Meiri and Burdick, 1991).

Finalmente mediante densitometría cuantificamos las bandas del Western blot expresando el porcentaje de la proteína total que se encuentra ubicada en DRMs, identificados por la proteína Thy-1. Ya que la separación de la proteína dentro de las fracciones livianas nos garantiza una correcta separación de las fracciones dentro del gradiente y debido a que esta técnica es larga y consta de varios pasos es muy importante un control que la misma ha sido realizada correctamente.

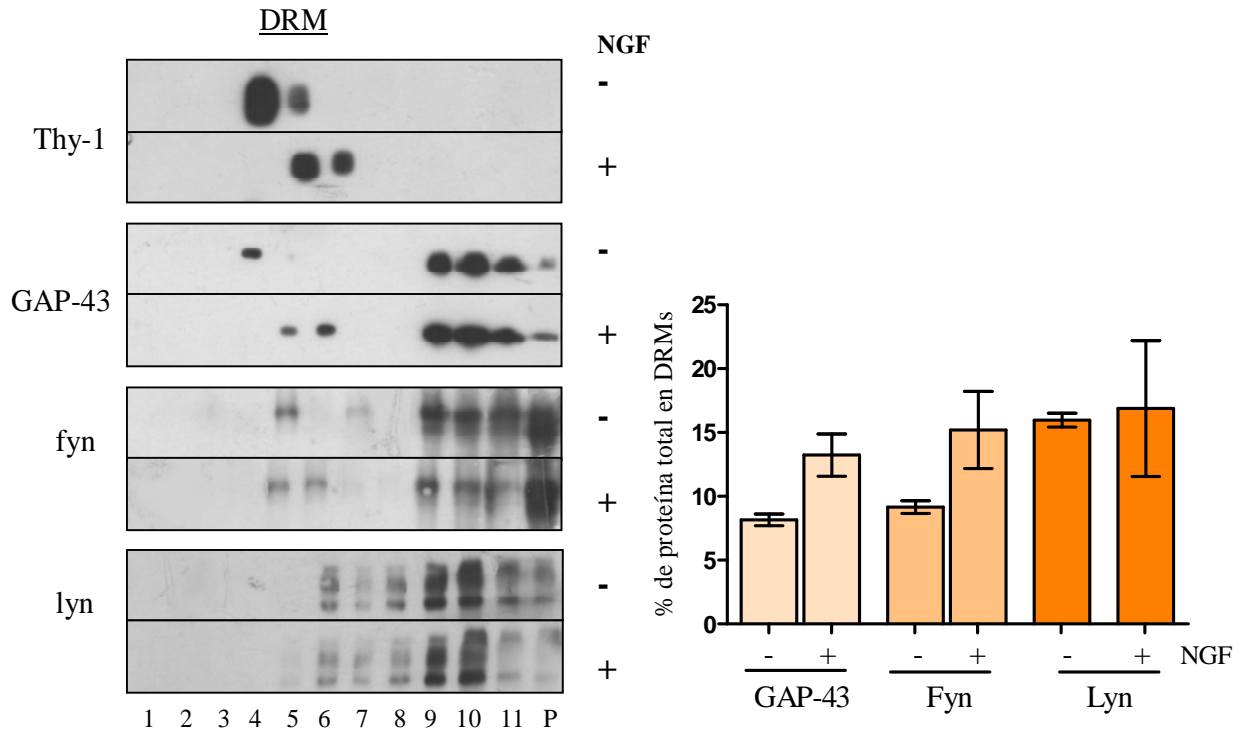


Figura 3.1- Análisis de la ubicación de las proteínas en los DRMs aislados con Triton X-100 de sinaptosomas estimulados previamente con NGF. El tratamiento se realizó sobre los sinaptosomas aislados durante 30 minutos a 37°C, en una concentración final de 100 ng/ml. En las imágenes de la izquierda se muestran los Western blots representativos de varias proteínas de señalización (Thy-1, GAP-43, fyn, lyn). Las fracciones del gradiente de sacarosa de izquierda-derecha se muestran de la superficie al fondo del gradiente (1 al pellet-P). A la derecha se graficaron los porcentajes en las proteínas ubicadas en los DRMs con respecto a su señal total en el Western blot. La proteína Thy-1 se utilizó como marcador de la posición de los DRMs en el gradiente. NOTA- La imagen de la proteína lyn que se muestra corresponde a otro experimento donde la proteína Thy-1 se ubica en ambos gradientes en las fracciones 5 y 6, que corresponde a los DRMs.

Los resultados se graficaron en la figura 3.1, en ellos podemos ver que las proteínas fyn y GAP-43 aumentaron levemente su distribución en los DRMs, aunque este cambio no llega a tener significancia estadísticas en los porcentajes de asociación a DRMs en cuanto al tratamiento con NGF de los sinaptosomas. También se puede observar la correcta separación y posicionamiento en la zona de los DRMs de la proteína

marcadora Thy-1 en el gradiente, no así la proteína lyn cuya distribución es amplia en la segunda mitad del gradiente.

No podemos confirmar la razón de esta distribución pero planteamos la posibilidad de estados intermedios de asociación con dominios resistentes a detergentes. Estos estados pueden depender del detergente utilizado en la extracción ya que cuando se utilizan otros detergentes como Brij 98 o Lubrol WX la distribución de proteínas en los DRMs presentan diferencias notables (Gil et al., 2006). Esta hipótesis de estados intermedios es la que proponemos para explicar los resultados obtenidos en varios trabajos donde la proteína Thy-1 se distribuye correctamente en los DRMs y algunas proteínas presentan esta distribución amplia en el gradiente como observamos en este caso con la proteína lyn (Gil et al., 2006; Patterson, 2002).

Otro dato a tener en cuenta es la concentración de NGF utilizada en el ensayo, nosotros decidimos utilizar la concentración de 100ng/ml ya que en bibliografía previa (Meiri and Burdick, 1991) demuestra que esa concentración es la saturante de su efecto. Sin embargo nuestro sistema de estudio podría no responder de la misma manera al tratamiento con NGF. También debemos conciderar que el tiempo de estimulación pudo no haber sido suficiente o demasiado para lograr ver un efecto en la translocación de proteínas a DRMs en nuestro sistema. Basándonos en bibliografía previa consideramos que 30 minutos era suficiente pero una curva de tiempo y concentraciones podría haber confirmado el efecto del NGF en la translocación de estas proteínas a DRMs (Meiri and Burdick, 1991). Con otras concentraciones de la neurotrofina y tiempos de estimulación los resultados podrían haber cambiado. También debemos considerar la poca estabilidad del NGF en solución, lo que dificulta la total determinación de la dosis efectiva. El problema de estabilidad no se evidenciaría en los 30 minutos de incubación en el ensayo pero si en la preparación y almacenamiento de los stocks utilizados.

Una de las principales proteínas candidatas a ser afectadas por el tratamiento con NGF era la familia de proteínas ras. Hicimos varios ensayos tratando de analizar estas proteínas pero no pudimos sacar un resultado concreto debido a la mala señal de los anticuerpos anti-ras (pan-ras, H-ras, K-ras y N-ras, Santa Cruz, USA) que disponíamos en ese momento en nuestro laboratorio. Por la falta de resultados óptimos con estos anticuerpos y las dificultades técnicas de la actividad del NGF principalmente decidimos no continuar con esta neurotrofina sino cambiar completamente el estímulo utilizado.

3.2.2. Trombina

Decidimos utilizar la proteasa trombina, trabajos previos indicaban que está involucrada en la regulación de los procesos de crecimiento y diferenciación celular en neuronas y células gliales (Beecher et al., 1994; Jalink and Moolenaar, 1992; Zoubine et al., 1996). Además esta proteasa está ampliamente expresada en el cerebro durante el desarrollo y hasta la adultez (Dihanich et al., 1991). Durante la injuria cerebral la trombina es inducida inmediatamente lo que pone en evidencia que tiene un rol en la regeneración, regulando este proceso ya sea de una manera positiva o negativa. Como describimos (ver sección 1.13) el efecto de la trombina es controversial y dependiente de su concentración. Cuando se encuentran presentes altas concentraciones la trombina en el parénquima cerebral puede causar lesión, pero otros trabajos describen que la trombina a muy bajas concentraciones puede tener efectos neuroprotectores. Este efecto dicotómico es una clara evidencia de la complejidad de la señalización de la trombina.

Los receptores activados por trombina (PARs) están acoplados a pequeñas proteína G que activan varios caminos de señalización que incluyen segundos mensajeros como AMPc, la activación de la fosfolipasa A2 (PLA_2), el aumento de calcio intracelular y la activación de la proteína quinasa C (Jia et al., 1999; Lents et al., 2009; Yang et al., 1997). En plaquetas humanas se ha observado que existe relación entre la trombina y la inducción de la S-palmitoilación de proteínas plaquetarias (Huang, 1989).

En nuestro trabajo analizamos la ubicación en los DRMs de dos proteínas palmitoiladas, GAP-43 y fyn, luego del tratamiento con trombina. A estas proteínas ya las habíamos analizado para el tratamiento con NGF y no habíamos obtenido diferencias significativas en la translocación a estos dominios. La estimulación de los sinaptosomas se realizó con trombina (0,2 unidades/ml) durante 30 minutos previos a la purificación de los DRMs y análisis de las proteínas por Western blot.

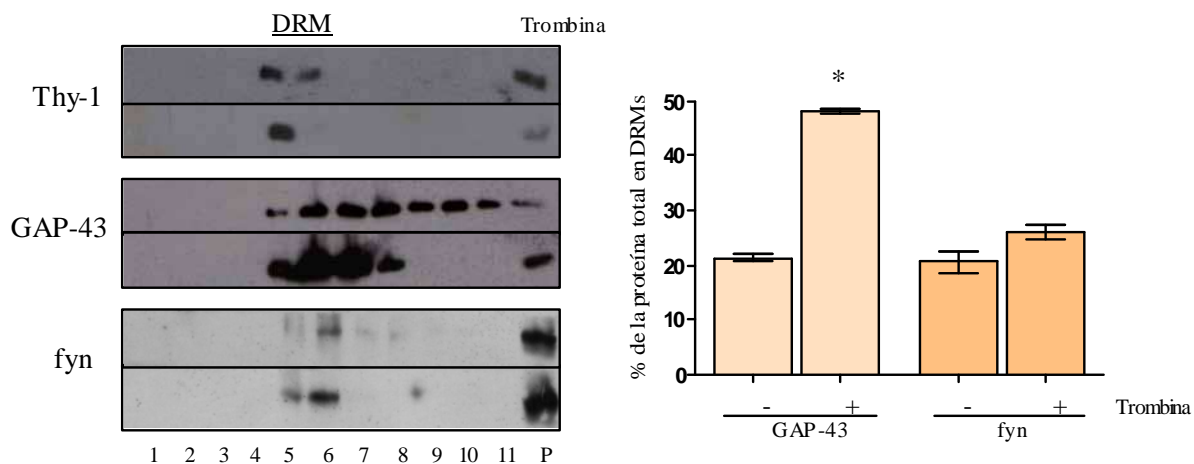


Figura 3.2 -Análisis de la ubicación de las proteínas en los DRMs aislados de sinaptosomas tratados con trombina. El tratamiento de los sinaptosomas aislados consistió en 0,2 unidades de trombina/ml, durante 30 minutos a una temperatura de 37°C. En las imágenes de la izquierda se muestran los Western blot contra varias proteínas de señalización (Thy-1, GAP-43, fyn). Las fracciones del gradiente de sacarosa de izquierda-derecha se muestran de la superficie al fondo del gradiente (1 al pellet-P). Los sinaptosomas fueron tratados con trombina o vehículo. A la derecha se grafican los porcentajes en los DRMs de cada proteína analizada con respecto a su señal total en el Western blot. Thy-1 se utilizó como marcador de DRMs.

Pudimos observar que la proteína GAP-43 fue translocada muy eficientemente a los subdominios membranales DRMs luego del tratamiento con trombina (Figura 3.2). Aunque los resultados de este ensayo no dan certeza que el aumento de la palmitoilación de GAP-43 por el tratamiento con trombina sea la responsable de ubicar a la misma en estos dominios resistentes a detergentes, es una prueba indirecta dado que muchos trabajos responsabilizan a la palmitoilación del anclaje de proteínas a DRMs (Arni et al., 1998; Skene and Virag, 1989).

En cambio para otra proteína palmitoilada analizada por Western blot como la quinasa fyn observamos que los porcentajes de ubicación en DRMs con respecto a la proteína total no presentan diferencias significativas ante el estímulo con trombina (Figura 3.2). Estos resultados al igual que en la sección anterior con el tratamiento con NGF, coinciden con la idea de que no todas las proteínas palmitoiladas responden de manera similar ante un determinado estímulo celular. Lo que hace interesante el estudio de la palmitoilación debido a que ante un estímulo solo algunas proteínas específicas que se encuentran palmitoiladas se ven modificadas en su ubicación submembranal en DRMs.

De este ensayo podemos concluir que en nuestro sistema el tratamiento de sinaptosomas con trombina es capaz de estimular la translocación a DRMs de la proteína GAP-43 de una manera significativa, pero este tratamiento no produjo el mismo efecto

sobre la proteína quinasa fyn. La translocación de GAP-43 a DRMs es una manera indirecta de analizar su estado de palmitoilación, sin embargo es necesaria una confirmación de su estado de S-palmitoilación de lo que nos ocupamos en el próximo capítulo de esta tesis.

3.2.3. Ionóforo de Calcio, A23187

En los siguientes ensayos nos enfocamos en tratamientos a nivel intracelular, y estudiamos como varía la ubicación de ciertas proteínas palmitoiladas en los dominios resistentes a detergentes (DRMs) luego de la estimulación con un agente de activación intracelular como el ionóforo A23187. Esta sustancia media el intercambio electro-neutral de cationes divalentes por protones (Reed and Lardy, 1972). Este ionóforo ha sido usado para disipar gradientes de calcio a través de una variedad de membranas y para simular fenómenos dependientes de calcio en células, como por ejemplo la reacción acrosomal en espermatozoides o la fusión de vesículas sinápticas en neuronas (Hutt et al., 2002; Katsuragi and Su, 1980; Kuromi et al., 2004; Liang et al., 1985; Onofri et al., 2007). En sinaptosomas el ionóforo A23187 ha sido utilizado para el estudio de la liberación de neurotransmisores (Colburn et al., 1975; Cotman et al., 1976; Fairhurst et al., 1975; Levy et al., 1976) y del flujo de calcio generado a través de la membrana plasmática sinaptosomal (Schaffer and Olson, 1976; Wonnacott et al., 1978).

La elección de esta droga para tratar nuestro sistema se basó en el hecho que durante la injuria axonal, una de las primeras señales que disparan la maquinaria de regeneración en el cuerpo celular es el aumento de calcio intracelular. Con la lesión del axón se produce una despolarización de la membrana plasmática y la subsiguiente entrada de calcio extracelular, esto dispara una cascada de señalización que transmite la señal de injuria hasta el soma celular (Chen et al., 2007; Makwana and Raivich, 2005).

Inicialmente nos planteamos como objetivo estudiar los procesos de injuria y regeneración, por lo tanto la utilización de este ionóforo nos permitió simular en algunos aspectos las condiciones de una señal de lesión axonal. El ensayo consistió nuevamente en la purificación de los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta según el protocolo descrito anteriormente en materiales y métodos (sección 2.3). Los sinaptosomas fueron estimulados con 10 μ M de A23187 durante 30 minutos, luego purificamos los subdominios DRMs con Triton X-100 frío y analizamos la ubicación de algunas proteínas palmitoiladas (GAP-43, fyn, lyn, VAMP, SNAP-25) por Western blot

dentro del gradiente de sacarosa fraccionado (Figura 3.3). Utilizamos nuevamente a la proteína Thy-1 como marcador de las fracciones resistentes al detergente o DRMs y además como un control del mismo proceso de purificación.

En la figura 3.3 se puede observar las imágenes de un Western blot representativo del gradiente de sacarosa donde por centrifugación se separaron las fracciones livianas resistentes al detergente o DRMs. Podemos ver en la figura 3.3 que aunque existen diferencias en la ubicación ninguna de las proteínas analizadas presenta una clara translocación a los dominios DRMs luego del tratamiento con el ionóforo. La proteína Thy-1 se localizó perfectamente en las fracciones livianas, lo que no ocurrió con las demás proteínas. La utilización de esta proteína nos confirma que no fue un error en el procedimiento de la técnica la no separación acotada en los DRMs de las proteínas sino que la causa es otra. Como anteriormente hemos mencionado creemos que esta distribución amplia dentro del gradiente se debe a la existencia de estados intermedios de asociación de las proteínas a distintos dominios o distintos dominios que no podemos extraer eficientemente con este detergente a baja temperatura (Gil et al., 2006).

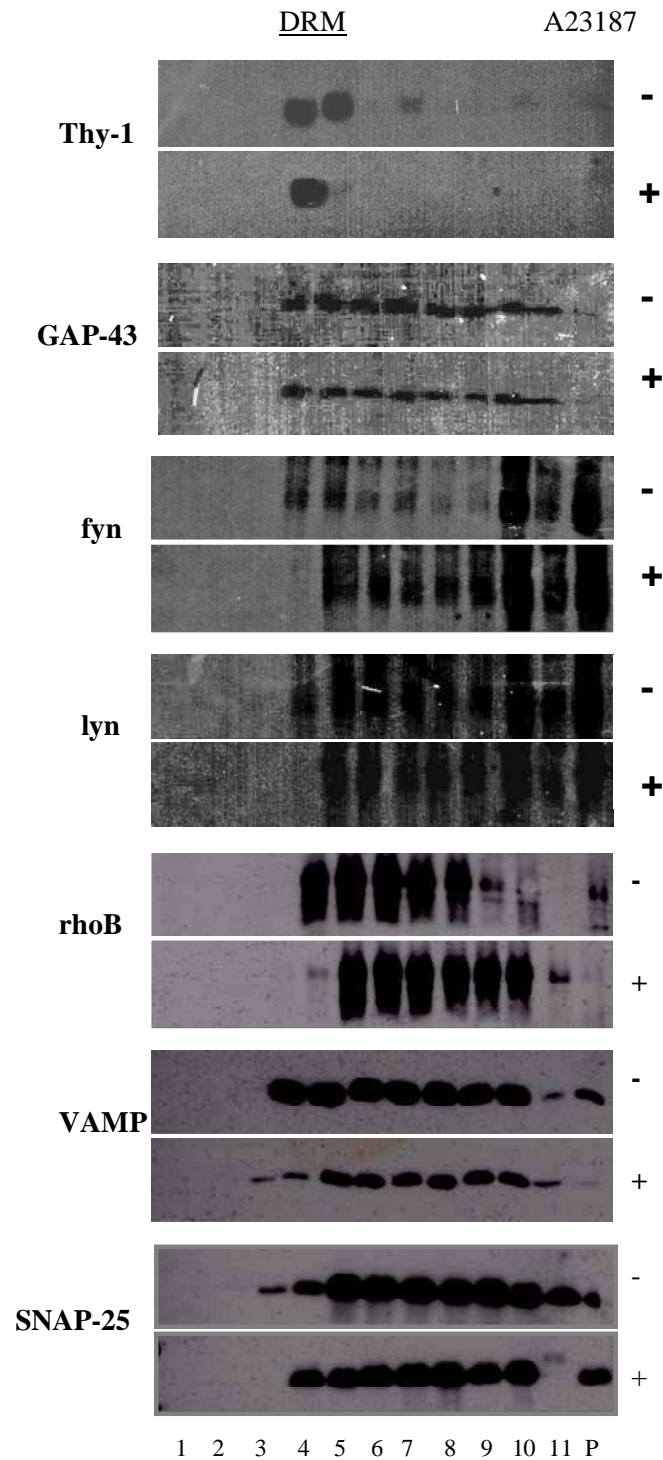


Figura 3.3-Análisis de la ubicación de las proteínas en los DRMs aislados de sinaptosomas tratados con ionóforo de calcio, A23187. En la imagen se muestran los Western blot representativos de varias proteínas de señalización (Thy-1, GAP-43, fyn, lyn, rhoB, VAMP, SNAP-25). Las fracciones del gradiente de sacarosa (5-45%) de izquierda-derecha se muestran de la superficie al fondo del gradiente (1 a pellet- P). Los sinaptosomas fueron tratados con A23187 (10µM) (+) o vehículo (-). Thy-1 se utilizó como marcador conocido de DRMs en el gradiente.

Podemos concluir con este experimento que el tratamiento con el ionóforo A23187 en las condiciones utilizadas no logra desencadenar cambios importantes como para ser detectados por la técnica de Western blot en la translocación de las proteínas analizadas a DRMs en sinaptosomas. Esto podría deberse a que la estimulación con un ionóforo de calcio como A23187 es un tratamiento muy drástico que activa varios caminos de señalización y podría estar enmascarando la translocación efectiva de una proteína en particular a DRMs. Por esta razón a continuación decidimos trabajar con otro camino de señalización como el AMPc (adenosina monofosfato cíclica), aunque esta vía de señalización posee conexiones con otras vías (cross talk).

3.2.4 Análogo de AMPc, Dibutiril AMPc

La adenosina monofosfato cíclica o AMPc fue el primer mensajero intracelular descrito y el más estudiado en todos los sistemas celulares. A nivel neuronal interviene en la regeneración axonal inhibiendo la proteína rho involucrada en la depolimerización de actina como ya hemos descrito en la introducción. Se ha visto que los niveles de AMPc están incrementados durante la denominada lesión pre-condicionada, que consiste en una lesión previa en el sistema nervioso periférico (SNP), que hace al sistema nervioso central (SNC) capaz de una mayor regeneración. Además experimentos de inyección del análogo permeable de AMPc, dibutiril AMPc (dbAMPc), logra un aumento en la regeneración de neuronas del SNC similar a la observada luego de una lesión en el SNP (Neumann et al., 2002; Neumann and Woolf, 1999).

Nuestro ensayo fue similar a los anteriores, pero estimulando los sinaptosomas con dibutiril AMPc 1mM durante 30 minutos previos a la purificación de los DRMs. Analizamos la ubicación en DRMs de dos de las proteínas palmitoiladas involucradas en regeneración y crecimiento neuronal, GAP-43 y la quinasa fyn. En la figura 3.4 se muestran las imágenes de los Western blot de los gradientes de sacarosa de estas proteínas y Thy-1 como marcador de los DRMs. Nuevamente vemos que la proteína GAP-43 mostró un aumento significativo de su ubicación en los DRMs, ante el estímulo de los sinaptosomas con el análogo de AMPc. La proteína quinasa fyn, también mostró una eficiente translocación a los dominios DRMs, ante este tratamiento. Ambas proteínas están palmitoiladas y en varios trabajos se ha responsabilizado a esta modificación lipídica del anclaje de las mismas a DRMs (Arni et al., 1998; Liang et al., 2001; Wolven et al., 1997).

Podemos concluir que el tratamiento con dbAMPc de los sinaptosomas logra translocar eficientemente estas proteínas palmitoiladas (GAP-43 y fyn) a dominios membranales resistentes a detergentes. Sin embargo el análisis por Western blot no nos permite diferenciar el estado de palmitoilación de la proteína, por lo que no podemos afirmar que una activación de la palmitoilación de la proteína lleve a su diferencial ubicación ante un estímulo como dbAMPc.

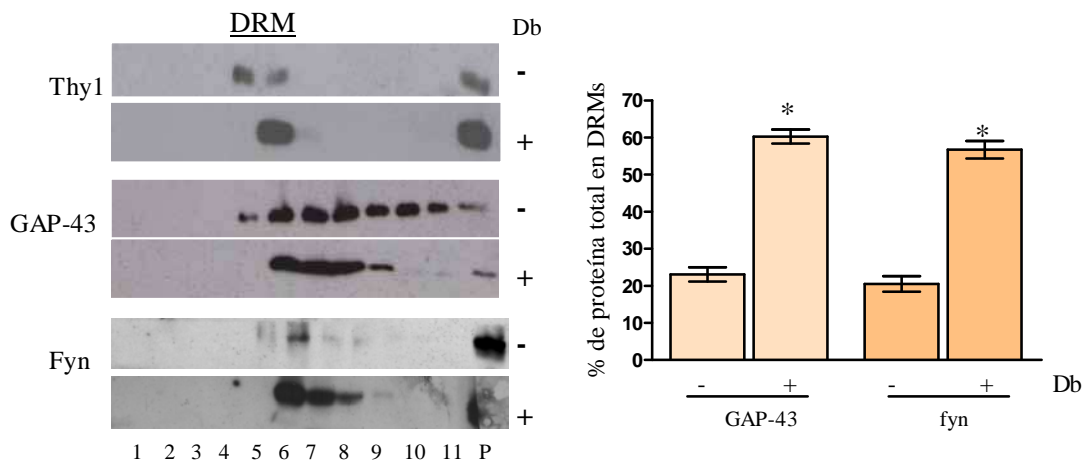


Figura 3.4- Análisis de la ubicación de las proteínas en los DRMs aislados de sinaptosomas tratados con Dibutiril AMPc. En las imágenes de la izquierda se muestran los Western blot de las proteínas de señalización (GAP-43, fyn). Las fracciones del gradiente de sacarosa de izquierda-derecha se muestran de la superficie al fondo del gradiente (1 a pellet- P). Los sinaptosomas fueron tratados con dibutiril AMPc (1mM) o vehículo. A la derecha se graficaron los porcentajes en los DRMs de cada proteína analizada con respecto a su señal total en el Western blot. Thy-1 se utilizó como marcador de DRMs. Db- dibutiril AMPc.

3.2.5. Esteres de forbol, PMA (Forbol 12-miristato, 13-Acetato)

Para analizar otra de las vías involucradas en la regeneración, utilizamos un ester de forbol como el PMA (Forbol 12-miristato, 13-Acetato) para la estimulación de los sinaptosomas. El PMA puede atravesar la membrana celular, fue descrito como un fuerte activador de la proteína quinasa C (PKC) y desencadena su correspondiente cascada de señalización intracelular. La proteína GAP-43 es uno de los mayores sustratos de PKC a nivel neuronal.

Este ensayo fue similar a los anteriores y consistió en la purificación de los sinaptosomas que luego fueron estimulados con PMA 100nM durante 30 minutos y

finalmente purificamos los DRMs. Analizamos la ubicación de varias proteínas palmitoiladas (GAP-43, fyn, SNAP-25) y la isoforma alfa de la proteína quinasa C (PKC- α) por Western blot (Figura 3.5). Utilizamos nuevamente a la proteína Thy-1 como marcador de los DRMs.

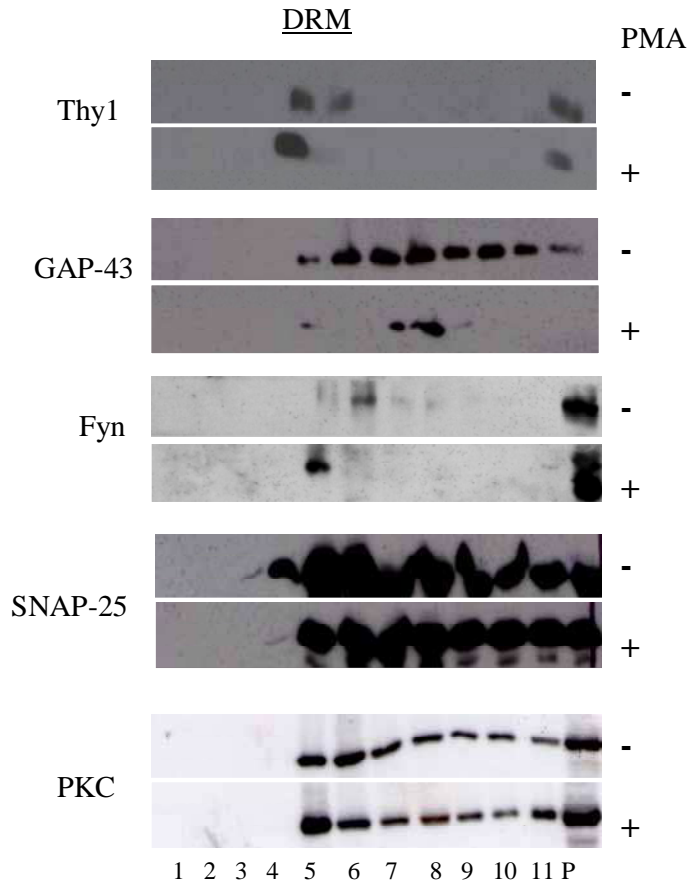


Figura 3.5- Análisis de la ubicación de las proteínas en los DRMs aislados de sinaptosomas tratados con PMA (acetato de forbol miristato). En las imágenes se muestran los Western blot de varias proteínas de señalización (Thy-1, GAP-43, fyn, SNAP-25, PKC α). Las fracciones del gradiente de sacarosa de izquierda-derecha se muestran de la superficie al fondo del gradiente (1 a pellet- P). Los sinaptosomas fueron tratados con PMA (+) o vehículo (-). Thy-1 se utiliza como marcador conocido de DRMs.

No pudimos observar diferencias significativas debidas a la estimulación de los sinaptosomas con PMA en la translocación de las proteínas analizadas hacia dominios membranales resistentes a detergentes (DRMs). La falta de diferencias observadas tanto en las proteínas analizadas, en especial en la proteína quinasa C, nos desalentó para seguir con el análisis del tratamiento de los sinaptosomas con PMA. Esperábamos ver cambios en la PKC que es una proteína candidata a cambiar su ubicación submembranal

a DRMs (Dr. A.F.G. Quest, comunicación personal). Esta falta de cambios puede deberse a varias causas pero la más importante es que solo analizamos una de sus isoformas (PKC α), pero existen varias isoformas de esta enzima a nivel neuronal. No descartamos en un futuro analizar por Western blot la ubicación submembranal de las demás isoformas de esta enzima ante un estímulo activador de la misma como el ester de forbol, PMA. Por otro lado cabe resaltar que existe una amplia bibliografía que encuentra que el tratamiento con PMA produce una regulación negativa a DRMs de varias proteínas transportadoras de neurotransmisores como la norepinefrina, dopamina y glicina (Fornes et al., 2008; Foster et al., 2008; Jayanthi et al., 2004)

3.3. Conclusiones generales del capítulo 3

El objetivo específico de esta primera parte era estudiar la localización en dominios de la membrana plasmática de proteínas ante estímulos fisiológicos y farmacológicos. Pusimos un interés especial en las proteínas palmitoiladas y que según la bibliografía hayan sido propuestas de estar directa o indirectamente involucradas en la regeneración neuronal. Realizamos las distintas estimuciones de los sinaptosomas con sustancias relacionadas con cascadas de señales involucradas en el desarrollo y extensión de neuritas en situaciones de plasticidad y en respuesta a la injuria.

Dentro de los estímulos utilizados podemos diferenciar dos tipos: 1) los externos como los estímulos con la neurotrofina NGF y la proteasa extracelular trombina, y 2) los intracelulares como dbAMPc, PMA y A23187. Dado que los resultados obtenidos con la estimulación con NGF no fueron significativos para las proteínas analizadas deberíamos a futuro estudiar otras condiciones de estimulación. A su vez también sería muy interesante analizar otras familias de proteínas como ras o rho.

En cambio con el tratamiento con trombina logramos ver una efectiva translocación de GAP-43 a los dominios DRMs de Triton X-100. Este resultado nos indicaría GAP-43 está involucrada de alguna manera en la respuesta de los sinaptosomas a la trombina. Hay que tener en cuenta que GAP-43 es una palmitoil-proteína y dicha modificación ha sido descripta como muy importante en la asociación de esta proteína a dominios lipídicos tipo rafts. Por otra parte a la trombina se le ha adjudicado la función de estimulador de la palmitoilación en plaquetas humanas. Entre ambos datos aún queda por demostrar en nuestro sistema si el hecho que la proteína GAP-43 transloque a los DRMs luego del tratamiento con trombina sea debido a un aumento en su estado de palmitoilación.

Y por otro lado usamos otros tres estímulos intracelulares que desencadenan mecanismos de traducción de señales dentro de la célula similares a los activados por los receptores externos. Entre estos estimulantes usamos el ionóforo de calcio A23187 que aumenta los niveles de calcio intracelular activando las cascadas sensibles a calcio, un ester de forbol (PMA) que activa la proteína quinasa C (PKC) y sus cascadas de señalización, y un análogo permeable de AMPc (dibutiril AMPc) que activa la proteína quinasa A (PKA). Cabe señalar que existe un cross talk entre los distintos caminos de señalización. En nuestro sistema pudimos ver la translocación significativa a DRMs de dos proteínas palmitoiladas, fyn y GAP-43, ante el estímulo con dbAMPc.

Cuando tratamos con los demás estímulos la mayoría de las proteínas se ubicaron en dominios intermedios por lo que no tenía sentido analizar su translocación a DRMs extraídos con Triton X-100 en frío. En este trabajo nosotros solo hemos usado para la purificación de los DRMs el detergente Triton X-100. En los últimos tiempos ha ido creciendo la evidencia de la existencia de heterogeneidad entre los rafts o microdominios lipídicos, los cuales difieren en su composición de lípidos y proteína, propiedades físicas y funciones biológicas (Drobnik et al., 2002; Madore et al., 1999). A pesar que el Triton X-100 es el detergente más usado para el aislamiento de los rafts, dos nuevos detergentes con propiedades únicas han sido introducidos recientemente: Lubrol WX (Roper et al., 2000) y Brij 98 (Drevot et al., 2002). Por lo tanto apoyando la existencia de varios tipos de rafts, diferentes tipos de microdominios basados en colesterol fueron identificados y caracterizados por su insolubilidad en Lubrol pero no así en Triton (Roper et al., 2000). Los rafts con Lubrol estaban enriquecidos en fosfatidilcolina insaturada y tiene una relación significativamente menor de colesterol/colina-fosfolípidos que los rafts insolubles al Triton (Drobnik et al., 2002; Vinson et al., 2003). Otro detergente que ha capturado el interés de los investigadores es Brij 98, debido a que la extracción de los microdominios con este detergente se lleva a cabo a 37°C (Drevot et al., 2002). De esta manera evitando trabajar a bajas temperaturas evitamos la asociación de componentes lipídicos no específicos (Brown and London, 1998). La estructura del Brij 98 con una cabeza abultada e hidrofílica y una cola alifática monoinsaturada, explicaría su comportamiento único a la temperatura fisiológica. Analizando estas diferencias en la extracción de microdominios por los distintos detergentes sería interesante repetir los ensayos realizados en este capítulo con estos detergentes. De acuerdo a los trabajos anteriormente mencionados, es posible que la utilización de estas técnicas nos permitan observar translocaciones de proteínas a estos DRMs con los estímulos utilizados y con la extracción con Triton no logramos observar diferencias.

En este capítulo vimos como dos proteínas palmitoiladas eran translocadas a DRMs ante algunos estímulos relacionados con la regeneración neuronal. En los siguientes capítulos nos planteamos la necesidad de analizar desde distintos abordajes la asociación de las proteínas a dominios lipídicos. Por eso en el siguiente capítulo nos enfocaremos en la implementación de una nueva técnica de análisis de la S-palmitoilación. Luego en el capítulo 5 trabajaremos con la proteína GAP-43 heteróloga purificada y estudiaremos su interacción con membranas artificiales (liposomas) de distinta composición utilizando técnicas físicas, como el EPR (resonancia paramagnética

electrónica). Y finalmente analizaremos la expresión a nivel central y periférico de proteínas palmitoiladas ante un modelo de injuria periférica como lo es la lesión del nervio ciático.

Con estos ensayos no podemos relacionar un aumento de la palmitoilación directamente con la ubicación en DRMs, pero los resultados obtenidos en este capítulo son el primer paso para analizar como varía la palmitoilación de proteínas antes estos estímulos. Debido a que varios trabajos describen una correlación entre el estado de palmitoilación y su ubicación en dominios DRMs en la membrana plasmática, podríamos relacionar la translocación a DRMs con un aumento de la palmitoilación. Unos trabajos muy interesantes del laboratorio de David Bredt han evidenciado una relación entre los dominios de palmitoilación y la localización intracelular en células polarizadas. Estos trabajos consistieron en fusionar las proteínas GAP-43 y PSD-95 cuyos transportes son muy selectivos axonal y dendrítico en neuronas hipocampales (Goslin et al., 1990). Ambas proteínas son palmitoiladas cerca de su región N-terminal y este motivo parece ser necesario, aunque para PSD 95 no es suficiente, para determinar sus respectivas localizaciones celulares (El-Husseini et al., 2001; Liu et al., 1991). Cuando se cambia la región palmitoilada de PSD-95 por la región de GAP-43, resulta en una proteína que se distribuye en ambos compartimentos, con alguna preferencia por los axones (Goslin and Banker, 1990). Cuando se le agrega una región de aminoácidos básicos cerca al sitio de palmitoilación la proteína PSD-95 incrementa su distribución en axones. Diferente ocurre si se remueve los aminoácidos básicos presente en GAP-43, lo que reduce su ubicación axonal. Estos trabajos confirman lo complejo de la palmitoilación y sus residuos cercanos en la organización espacial de las proteínas en células polarizadas.

CAPÍTULO 4

Implementación de dos técnicas para el análisis de la S-palmitoilación

4.1. Introducción al capítulo 4

Los primeros ensayos desarrollados para el estudio de la palmitoilación fueron de marcación metabólica de proteínas celulares con lípidos radiactivos como ^3H , ^{14}C o ^{125}I -palmitato. El ensayo consiste básicamente en la utilización de células en cultivo o fracciones celulares metabólicamente activas, que se incuban en un medio que posee el palmitato radiactivo. En nuestros trabajos hemos usado las partículas metabolitamente activas como lo son los sinaptosomas. Los lípidos son captados por las células (o fracción celular), donde son metabolizados e incorporados a las proteínas. Mediante la lisis y extracción de proteínas, podemos analizar la incorporación de marca radiactiva por SDS-PAGE y posterior fluorografía. La señal radiactiva es detectada por fluorografía y exposición a placas radiográficas

Este método de marcación tiene tres principales ventajas, la primera es que la S-palmitoilación puede monitorearse *in vivo*, ya que la marcación de la proteína se realiza de manera metabólica con toda la maquinaria celular. La segunda es que mediante esta técnica puede determinarse la palmitoilación específica de proteínas. Y la última ventaja es que las tasas de palmitoilación y depalmitoilación de una proteína puede analizarse por ensayos de marcación en pulsos (“pulse-chases”).

Sin embargo esta técnica tiene varias desventajas, la primera es que involucra el manejo de isótopos radiactivos, con el conocido riesgo en su manipulación. Otra desventaja son los muy largos períodos de exposición para obtener una señal suficientemente fuerte para ser detectada y cuantificada. El tiempo de exposición puede ir desde unas semanas hasta varios meses. Otra falencia de esta técnica es que la cantidad de palmitato radiactivo incorporado y su detección dependen de múltiples factores, por lo tanto este método no provee un dato pertinente de la estequiometría de la acilación.

Recientemente se ha descrito un novedoso método alternativo para estudiar la S-palmitoilación de proteínas denominado “Intercambio químico del grupo acilo” (Fatty Acyl Exchange Chemistry) o “Intercambio del grupo Acilo por Biotina” (Acyl Biotin Exchange, ABE). En este ensayo el ácido graso del sitio de S-palmitoilación es intercambiado por una marca fácilmente detectable (Drisdell et al., 2006; Drisdell and Green, 2004). Como primer paso todos los grupos sulfidrilos libres de las cisteínas son bloqueados con agentes como la N-etilmaleimida (NEM) o la iodoacetamida (IA). Luego con el tratamiento con hidroxilamina neutra (1M, pH7) se clivan la unión tioester

que unen al ácido graso a la cisteína en el sitio de palmitoilación, removiendo el grupo acilo. El clivaje deja en donde previamente estaba la cisteína acilada un grupo sulfidrilo libre. En un tercer paso se marca con reactivos tiol-específicos el sitio libre creado por el tratamiento con hidroxilamina, como $^3\text{H-NEM}$, o biotina-maleimida (btn-BMCC). Entonces la señal en las proteínas puede analizarse por SDS-PAGE y revelada por fluorografía o quimioluminiscencia según corresponda (Figura 4.2).

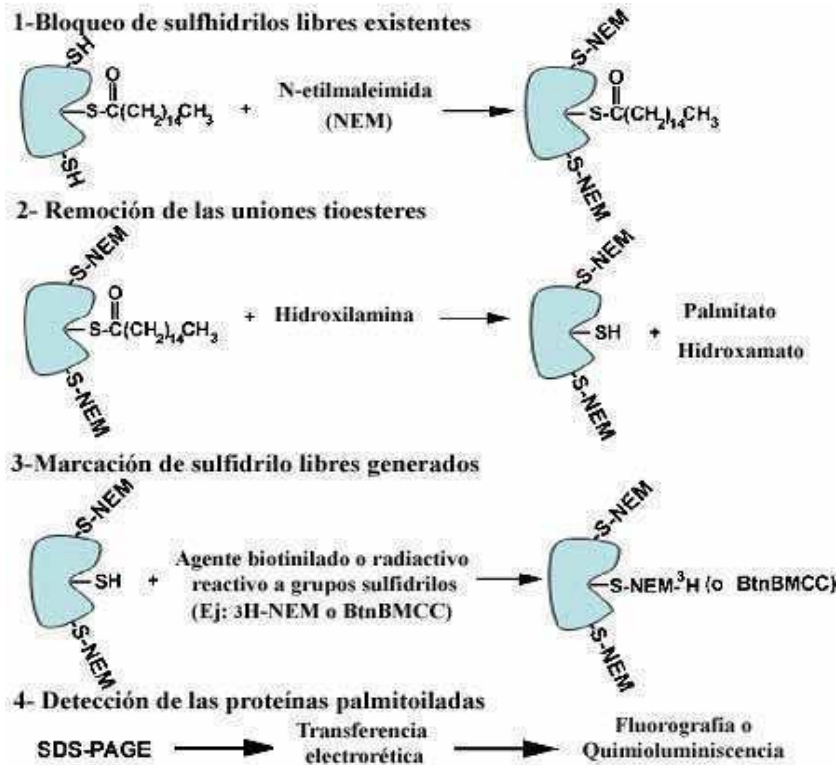


Figura 4.2- Ensayo de intercambio de grupos acil en la palmitoilación de proteínas. Este método está basado en la habilidad específica de remover palmitatos con el tratamiento con hidroxilamina dejando los grupos sulfhidrilos libres en los sitios de palmitoilación. Previo al tratamiento con hidroxilamina se bloquean los grupos sulfhidrilos con NEM. La unión covalente de NEM a los grupos sulfhidrilos de las cisteínas no es sensible a hidroxilamina. Los grupos sulfhidrilos generados por el tratamiento con hidroxilamina son reaccionados con agentes alquilantes como $^3\text{H-NEM}$ o btn-BMCC (reactivo modificado comercialmente similar a la biotina-maleimida) para marcar los sitios. Una vez marcados los sitios de palmitoilación pueden ser analizados con una variedad de ensayos dependiendo que la marca sea radiactiva o biotina. Figura tomada y modificada de Drisdell et al 2006.

Este nuevo método tiene varias ventajas sobre los anteriores, una de ellas es el incremento en la sensibilidad, que permite la detección y análisis de proteínas de baja expresión muchas indetectables por los otros métodos. La segunda ventaja para mencionar es la posibilidad de usar reactivos conjugados con biotina evitando el uso de material radiactivo. Otra ventaja que podemos mencionar que esta técnica ofrece la posibilidad de un marcado no metabólico, donde pueden analizarse fracciones celulares (aunque no sean metabólicamente activas) o proteínas purificadas. De esta manera se puede analizar el estado de S-palmitoilación de una proteína en un determinado momento. Este método también tiene algunas limitaciones como por ejemplos el aumento de falsos positivos debidos la unión de inespecífica del reactivo para la marcación.

Varios estudios han identificado un rol funcional de la S-palmitoilación en los procesos fisiológicos normales de la célula. Entre ellos nuestro grupo en trabajos previos ha estudiado el crecimiento de axones usando a la tunicamicina como inhibidor de la S-palmitoilación y consecuentemente la extensión de neuritas en células PC12 y cultivos primarios de neuronas (Patterson and Skene, 1994). Junto con esta evidencia y trabajos posteriores donde se vio que la palmitoilación de las proteínas del axón es regulada durante el desarrollo (Patterson and Skene, 1999), representan una importante evidencia del rol de la S-palmitoilación en los procesos celulares. Mientras se conoce que muchas de las proteínas involucradas en el crecimiento axonal como GAP-43, SNAP-25, fyn, G_o, rac1 H-ras y NCAM son palmitoiladas el estado de palmitoilación se desconoce. Se ignora si la pérdida de la palmitoilación de algunas proteínas explicaría la inhibición del funcionamiento de los conos de crecimiento. Es de gran importancia el desarrollo de técnicas sensibles de análisis del estado de la S-palmitoilación de proteínas, ya que varios trabajos han adjudicado a esta modificación un importante rol en procesos celulares.

4.2. Resultados y discusión

La técnica para la preparación de terminales axónicos aislados de corteza cerebral de rata, y su marcación con lípidos radiactivos como ³H-palmitato ha sido descrita en varias publicaciones previas del grupo de trabajo (Patterson, 2002; Patterson and Skene, 1994). Como primer intento de marcar las proteínas modificadas con este lípido se realizó una marcación *in situ* con ³H-palmitato (1mCi/ml) seguido por

el análisis de proteínas por SDS-PAGE y posterior tratamiento por fluorografía para detectar la marca radiactiva. La finalidad del tratamiento de fluorografía es convertir la señal radiactiva emitida por el tritio a una señal lumínica capaz de impresionar una placa radiográfica fotosensible.

En nuestros primeros ensayos tuvimos muchos problemas para lograr la incorporación del palmitato radiactivo en las proteínas neuronales de los sinaptosomas. Trabajamos mucho tratando de lograr la incorporación de la marca radiactiva cambiando las condiciones de ensayo. La primera fuente de variación que pensamos que podía incidir en la falta de marcación era el medio en el cual la realizábamos, debido a que podría estar sucediendo que los sinaptosomas no estén metabólicamente activos. Por ello decidimos cambiar el medio utilizado para la marcación de los sinaptosomas pasamos de usar “Hanks glucosa” un medio fisiológico mínimo preparado en el laboratorio a un medio comercial para cultivo celular como “F12” (comercializado por GIBCO), pero tampoco obtuvimos marcación metabólica de las proteínas.

También nos pareció muy adecuado aumentar el tiempo de incubación con el ^3H -palmitato de los sinaptosomas, para aumentar así el tiempo de incorporación del mismo (“uptake”) por estas partículas. Pasamos de 20 a 60 minutos la incubación a 37°C , pero aún así no obtuvimos una marca radiactiva eficiente en las proteínas. Las exposiciones de las fluorografías también fueron más largas entre 4 y 12 semanas para asegurarnos la detección de la señal cuando esta era muy baja.

Debido a las fallas en este ensayo decidimos analizar el estado o calidad del palmitato que utilizábamos. Realizamos dos ensayos para verificar el estado del lípido radiactivo utilizado, ya que por su alto costo el stock utilizado tenía varios años en el laboratorio. Para ello realizamos una conversión del ^3H -palmitato a palmitoil-CoA *in vitro* utilizando la enzima acil-CoA sintetasa, luego se realizó una extracción con solventes orgánicos como cloroformo: metanol (ver sección 2.17). Se separaron las fases por centrifugación y se analizaron cada una en cromatografía en capa delgada (TLC). En la fase acuosa se ubicará la gran mayoría del producto palmitoil-CoA y en la fase orgánica el palmitato (Patterson and Skene, 1997).

En la figura 4.2 se puede observar como a partir de palmitato a tiempo cero se logró la conversión a palmitoil-CoA a los distintos tiempos. También puede observarse que la separación de fases no fue total ya que se observa palmitoil-CoA en ambas fases. Sin embargo no se observa presencia de no palmitato luego de la hora de reacción lo que confirma una muy buena eficiencia de conversión a palmitoil-CoA.

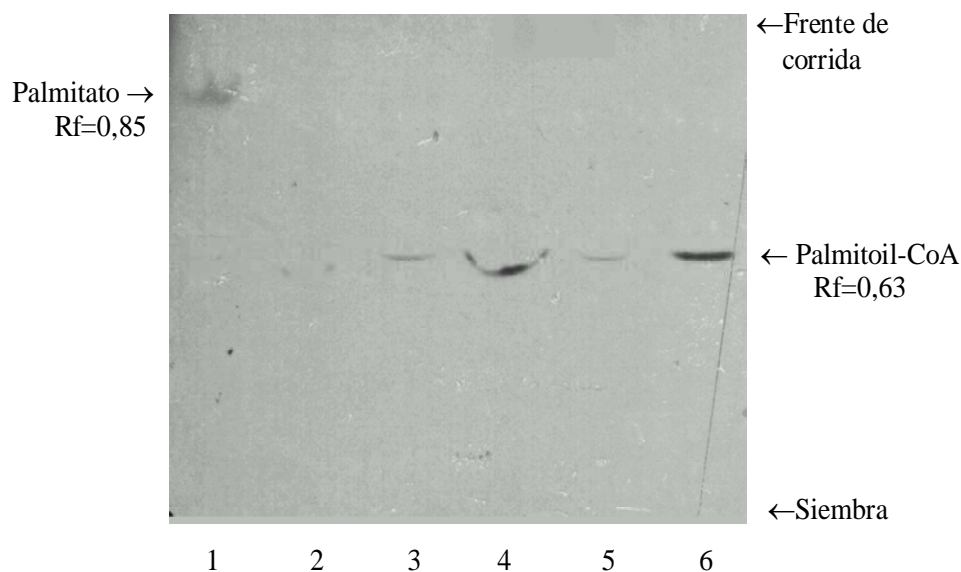


Figura 4.2- Conversión *in vitro* de ^3H -palmitato en ^3H -palmitoil-CoA- Cromatografía en fase delgada (TLC) con fase móvil de butanol: ácido acético: agua (5:2:3) se analizaron las distintas fases de la reacción a distinto tiempos (0, 1 hora y 2 horas). Calle 1- alícuota de la fase orgánica a tiempo cero; calle 2- alícuota de la fase acuosa a tiempo cero; calle 3- alícuota de la fase orgánica a una hora de reacción; calle 4- alícuota de la fase acuosa a una hora de reacción; calle 5- alícuota de la fase orgánica a 2 horas de reacción; calle 6- alícuota de la fase acuosa a las 2 horas de reacción. El Rf (ratio of front) se calcula como el cociente entre la distancia de recorrida por una sustancia sobre el la distancia total del frente de corrida.

El segundo ensayo para la verificación del estado activo del palmitato, consistió en la marcación metabólica con ^3H -palmitato (1mCi/ml de medio de cultivo, incubando 1 hora a 37°C) de células de una línea celular como CHO (de ovario de hámster chino). Luego lisamos las células y analizamos sus lípidos celulares extrayéndolos con solventes orgánicos y separándolos por TLC. A su vez también analizamos las proteínas por SDS-PAGE, con tratamiento con fluorografía. Además como otro control también analizamos por TLC el medio de cultivo y los lípidos extraídos con solventes orgánicos (Figura 4.3). La fluorografía de las proteínas analizadas por SDS-PAGE fue totalmente en blanco luego de 6 semanas de exposición, (datos no mostrados).

En las calles 4 y 5 del TLC de la figura 4.4 se puede ver claramente como el palmitato marcado radiactivamente es incorporado parcialmente a los lípidos celulares. En la calle 4 donde se corrió la fase acuosa de la extracción de los lípidos celulares se ven dos bandas predominantes con marca radiactiva ($R_f = 0,58$ y $0,5$). Teniendo en cuenta que el Rf de una de estas bandas es muy cercano a la palmitoil-CoA, podríamos pensar que esa sea su identidad. Habría que hacer otras pruebas para definir la identidad lipídica de esas bandas, de todas maneras esa información no es relevante para nuestro

objetivo. En la calle 5 donde se analiza la fracción orgánica se pueden ver varias bandas definidas siendo la más abundante la más cercana al frente de corrida ($R_f=1$; 0,67; 0,61, 0,55 y 0,49). Podemos hipotetizar que dicha banda mayoritaria ($R_f=1$) pertenece al ^3H -palmitato que fue incorporado por las células pero no metabolizado completamente en otros lípidos.

En este último ensayo pudimos ver que la incorporación de la marca radiactiva en los lípidos celulares fue buena pero nuevamente no pudimos observar marca radiactiva incorporada en las proteínas celulares. Quedó corroborado que el ^3H -palmitato utilizado tenía algún grado de degradación u oxidación lipídica que no pudimos identificar pero que lo hace incapaz de incorporarse metabólicamente a las proteínas, no así a los lípidos celulares. A partir la detección del problema con este reactivo fundamental, decidimos cambiar por completo el stock de ^3H -palmitato por uno nuevo, recientemente adquirido para que no tengamos dudas de su calidad y capacidad de incorporación metabólica.

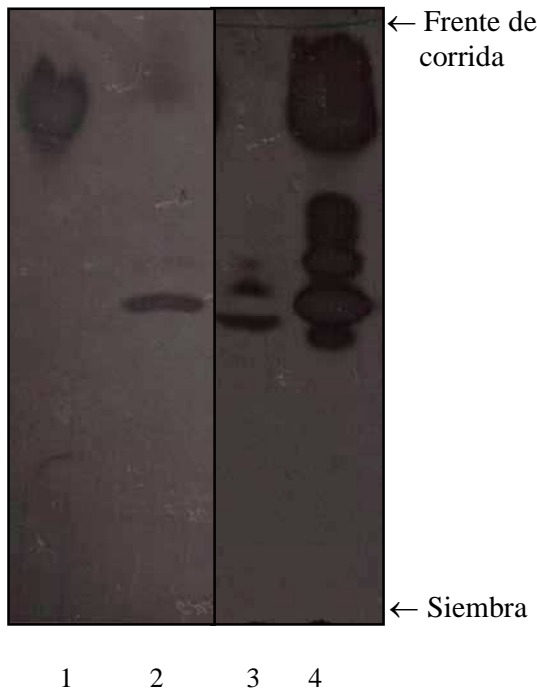


Figura 4.3- Marcación de células CHO con ^3H -palmitato- La marcación se realizó con 1mCi/ml de medio de cultivo (sin suero), incubando 1 hora a 37°C, luego se lisan las células y se extraen los lípidos con cloroformo: metanol (2:1). Se realiza una cromatografía en capa delgada (TLC) con fase móvil butanol : ácido acético : agua (5:2:3). Calle 1- 20 μl del medio de marcación de las células; calle 2- 20 μl del extracto orgánico con cloroformo:metanol del medio cultivo celular luego de la marcación; calle 3- 20 μl de la fase acuosa de la extracción de los lípidos celulares; calle 4- 20 μl fase orgánica de la extracción de los lípidos celulares. El R_f (ratio of front) se calcula como el cociente entre la distancia de recorrida por una sustancia sobre el la distancia total del frente de corrida.

Con nuevo stock de ^3H -palmitato comenzamos nuevamente con los ensayos de marcación de las proteínas de los sinaptosomas y luego de dos meses de exposición pudimos obtener señal de las proteínas marcadas con palmitato radiactivo (Figura 4.4). De esta manera trabajando con ^3H -palmitato nuevo logramos incorporarlo metabólicamente a las proteínas sinaptosomales (ver sección 2.21). Pero para su detección luego del tratamiento por fluorografía fue necesario un largo tiempo de exposición (8 semanas) a una placa radiográfica fotosensible

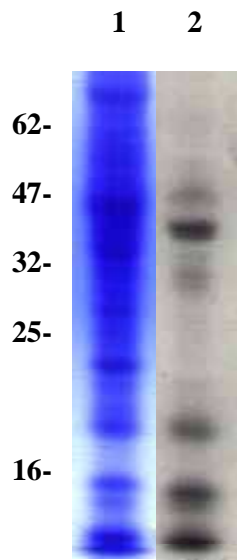


Figura 4.4- Marcación metabólica con ^3H -palmitato de las proteínas de sinaptosomas de cerebro de rata adulta. La marcación de las proteínas sinaptosomales se realizó durante 30 minutos a 37°C con una concentración final de marca radiactiva de 1mCi/ml . Se corrieron sendos geles por SDS-PAGE al 10% y se analizaron de dos maneras distintas. Calle 1- SDS-PAGE tinción con Coomassie blue. Calle 2- procesamiento del gel por fluorografía, 8 semanas de exposición a -70°C .

Sin embargo no pudimos observar diferencias cuando tratamos el gel con hidroxilamina (1M , $\text{pH}7$) para remover los palmitatos unidos a las proteínas por unión tioéster (S-palmitoilación). Adjudicamos la falla en el clivaje de los palmitatos por hidroxilamina, al estado de conservación de este reactivo ya que también tuvimos problemas en otros ensayos del laboratorio.

Debido a los problemas descriptos anteriormente con la incorporación de palmitato radiactivo y luego con el clivaje con la hidroxilamina, estuvimos varios meses trabajando sin resultados. Nada nos garantizaba no tener otros los problemas en el protocolo y debido a los largos períodos de exposición nos harían trabajar varios meses hasta obtener un resultado que no necesariamente sería satisfactorio. Por esta razón decidimos cambiar la técnica y poner a punto una nueva donde los tiempos de los ensayos son significativamente menores a los anteriores.

Por lo tanto, nos enfocamos en la utilización de la técnica de intercambio químico del grupo ácido graso (descrito en la introducción del capítulo), poniendo a punto cada paso. Esta técnica tiene grandes ventajas con respecto a la marcación radiactiva como su alta eficiencia y rapidez de resolución de los resultados y además de la posibilidad de no usar material radiactivo.

Lo primero que analizamos fue el buffer utilizado para el bloqueo de los grupos sulfhidrilos libres de la proteína con N-etilmaleimida (NEM), se pueden utilizar otros agentes como la iodoacetamida (IA). Nosotros probamos el bloqueo utilizando ambos agentes pero evaluamos resultados preliminares (no mostrados) y observamos que NEM bloqueaba más eficientemente las cisteínas libres de una mezcla de proteínas. Por esta razón decidimos seguir utilizando NEM para el resto de los ensayos.

Una de las condiciones críticas de esta reacción es el pH en el que realiza el bloqueo de las cisteínas libres de las proteínas con NEM. Es fundamental mantener el pH óptimo de reacción ya que la estabilidad del reactivo NEM es muy dependiente del pH. La tasa de hidrólisis del NEM en solución acuosa es significativamente dependiente del pH siendo su vida media expresada en horas a pH6.5 de 160, de 9 a pH7,5 y de 1,7 a pH8 (Nishiyama and Kuninori, 1992). Utilizamos tres buffers que tienen una buena amortiguación del pH7 para estar cercano al fisiológico pero a su vez tener una vida media aceptable para el ensayo. Elegimos específicamente trabajar con Tris 100mM pH7, PBS pH7 y Hepes 100mM pH7. Las condiciones de la reacción fueron a temperatura de 4°C, para evitar la actividad de proteasas y durante toda la noche, para lograr un bloqueo total de las cisteínas libres.

Utilizamos la proteína BSA (albúmina de suero bovina) como patrón para el análisis de las óptimas condiciones para este ensayo. Esta proteína posee 35 cisteínas y aunque no podemos estar seguros de cuantas de ellas están libres al ser un número impar no todas pueden estar formando puentes disulfuro entre ellas. Al trabajar con una proteína pura y comercial tenemos la ventaja de la disponibilidad comercial de las cantidades necesarias y además al ser una proteína pura nos permite observar y cuantificar mejor la banda única.

Cuando analizamos las curvas del logaritmo de concentración de NEM (mM) y la incorporación de biotina, vemos que el buffer Hepes logra un mejor bloqueo comparado con los buffers Tris y PBS (Figura 4.5). Desde la concentración más baja de NEM utilizada se logra un bloqueo cercano al 50%, el cual va aumentando con el aumento de la concentración de NEM. Cuando utilizamos el buffer Hepes llegamos al

80% del total de las cisteínas de la BSA bloqueadas por NEM 100 mM sin observarse diferencias cuando utilizamos NEM 200 o 250 mM.

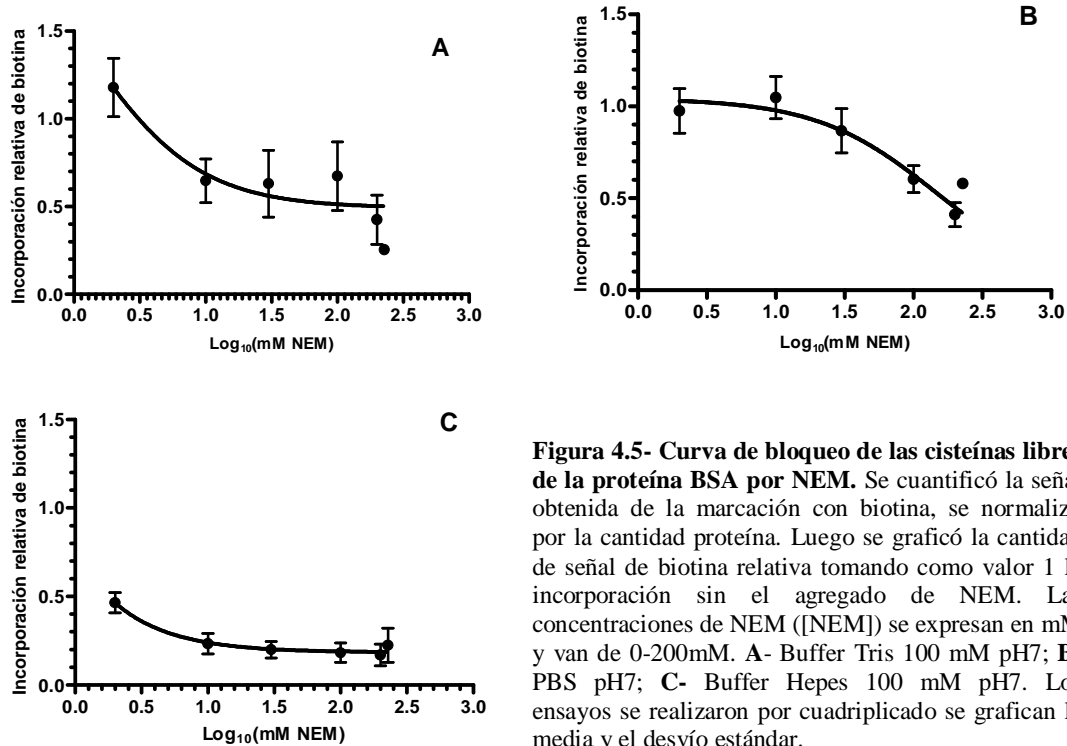


Figura 4.5- Curva de bloqueo de las cisteínas libres de la proteína BSA por NEM. Se cuantificó la señal obtenida de la marcación con biotina, se normalizó por la cantidad proteínica. Luego se graficó la cantidad de señal de biotina relativa tomando como valor 1 la incorporación sin el agregado de NEM. Las concentraciones de NEM ([NEM]) se expresan en mM y van de 0-200mM. **A-** Buffer Tris 100 mM pH7; **B-** PBS pH7; **C-** Buffer Hepes 100 mM pH7. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado se grafican la media y el desvío estándar.

Para los primeros ensayos utilizamos BSA por las razones de disponibilidad y costos anteriormente mencionadas. Pero una vez establecidas las concentraciones de NEM para una proteína única decidimos analizar las concentraciones de NEM para una compleja mezcla de proteínas como es la fracción de corteza cerebral posnuclear 2 (P₂) (según sección 2.3). Este nuevo ensayo consistió en bloquear las cisteínas libres del extracto proteico P₂, con cantidades crecientes de NEM para lograr la saturación (0, 10 y 100mM) durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Luego se realizó selectivamente el tratamiento con hidroxilamina (1M, pH7) durante 1 hora a temperatura ambiente (25-30°C) para la hidrólisis de los palmitatos con uniones tioésteres a la proteína. Posteriormente se marcaron con biotina-maleimida las cisteínas liberadas por la hidroxilamina o no bloqueadas por el tratamiento anterior con NEM. Finalmente mediante SDS-PAGE se separaron las proteínas de la mezcla, se transfirieron a una

membrana de nitrocelulosa y se revelaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa y quimioluminiscencia.

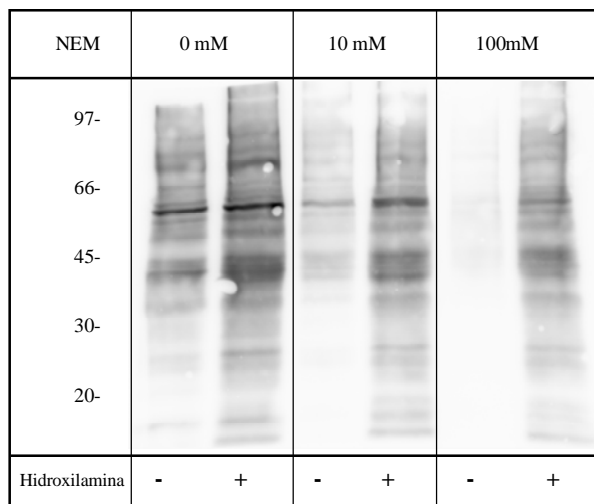


Figura 4.6- Bloqueo de las cisteínas libres con NEM. Se realizó el bloqueo de las cisteínas libres de una muestra de fracción P₂ con distintas concentraciones de NEM toda la noche a 4°C (0, 10 y 100 mM), se trataron o no con hidroxilamina (1M, pH7) durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se marcaron las cisteínas libres (no bloqueadas con biotina-maleimida (1 hora a temperatura ambiente) para ser reveladas por Western blot con estreptavidina conjugada con peroxidasa y quimioluminiscencia.

El resultado de este ensayo se muestra en la figura 4.6 donde se puede ver claramente como la marca de biotina disminuye hasta desaparecer con el agregado de concentraciones crecientes de NEM (0,10 y 100mM). Cuando se llega 100mM NEM se ve un bloqueo casi total de las cisteínas libres, las cuales son liberadas de sus palmitatos con el tratamiento con hidroxilamina y marcadas con biotina-maleimida. También se puede observar en las calles con 0 mM de NEM la presencia de cisteínas libres en la fracción proteica, las cuales aumentan cuando las muestras son tratadas con hidroxilamina la cual libera las cisteínas palmitoiladas.

Cuando se usan cantidades intermedias de NEM (10mM) observamos un bloqueo incompleto de las cisteínas libres inicialmente en la fracción P₂. A partir de este ensayo podemos calcular el porcentaje de cisteínas libres y palmitoiladas presentes en la muestra inicial. Mediante densitometría de las calles de la figura 4.7 calculamos los porcentajes sobre el total de cisteínas. Pudimos ver que un 61,6% del total de las cisteínas están libres en la muestra de P₂ antes del tratamiento con hidroxilamina. Dicho porcentaje fue calculado en la condición donde hubo bloqueo con NEM (cisteínas libres) sobre el total de cisteínas libres y palmitoiladas calculadas del tratamiento con hidroxilamina sin bloqueo con NEM (Figura 4.6, primera y segunda calle).

También vimos que el 42,9% están palmitoiladas y son clivados estos palmitatos con hidroxilamina. Dicho porcentaje lo calculamos considerando en el caso donde el bloqueo de cisteínas libres fue total (NEM 100mM) la señal es solo de las cisteínas palmitoiladas. Vale la pena aclarar que el total de cisteínas no suma un perfecto 100% ya que los porcentajes fueron calculados de manera independiente.

Otro factor a controlar en esta nueva técnica era la marcación con biotina, estando seguros que no se estaba subestimando la marcación por un problema de baja concentración de la biotina-maleimida utilizada para la marcación final. Ya que si utilizamos cantidades inferiores a las requeridas para marcar todas las cisteínas libres estaremos detectando menores cantidades de cisteínas palmitoilables presentes en la muestra. Para ello realizamos una curva con cantidades crecientes de biotina-maleimida desde una concentración final de 0,1 a 0,6 mM en el ensayo (Figura 4.7).

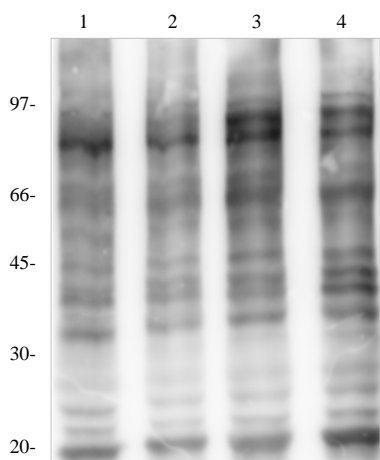


Figura 4.7- Marcación con biotina- maleimida.

Se marcaron las cisteínas libres de fracción P₂ con biotina-maleimida durante una hora a temperatura ambiente utilizando distintas concentraciones finales de biotina maleimida. Luego se realizó una electroforesis SDS-PAGE revelándolo con estreptavidina-peroxidasa y quimioluminiscencia. Las concentraciones crecientes de biotina-maleimida fueron: calle 1- 0,1 mM; calle 2- 0,2 mM; calle 3- 0,4 mM; calle 4- 0,6 mM.

Con este ensayo confirmamos que las cantidades de biotina-maleimida utilizadas anteriormente para la marcación de las cisteínas libres fueron adecuadas. Esto se puede analizar a través de una densitometría de la señal total de las proteínas marcadas, a las concentraciones utilizadas (0,4mM) posee la mayor señal, siendo algo menor a una concentración mayor de 0,6mM (Figura 4.7) Los ensayos de este capítulo fueron en su totalidad analizados con el equipo de detección digital de quimioluminiscencia, esto nos permitió analizar un rango mucho más amplio de tiempo que con el uso de placas fotosensibles. De esta manera pudimos sacar resultados donde la señal de quimioluminiscencia era lineal y no había saturación.

4.3. Conclusiones generales del capítulo 4

En el desarrollo de este capítulo se nos presentaron algunos problemas técnicos, que tuvimos que identificar y pudimos resolver. Primero comenzamos trabajando con palmitato radiactivo que no era capaz de incorporarse metabólicamente a las proteínas neuronales. Luego de varios ensayos de prueba y contra prueba detectamos el problema y cambiamos la fuente de palmitato radiactivo. Con nuevo material comenzamos de nuevo con la marcación metabólica pero nuestra eficiencia de marcado era muy baja. Con estos resultados concluimos que no era factible seguir con la marcación con ^3H -palmitato, debido a los largos tiempos de exposición y el tiempo disponible para terminar esta Tesis doctoral.

Optamos por poner en marcha otra forma de detección de palmitoilación de proteínas de mayor rapidez en su resolución esta fue la técnica de intercambio de ácido graso. Determinamos las condiciones óptimas de esta nueva técnica de detección cuantitativa de S-palmitoilación para proteínas sinaptosomales, como pH, tipo de buffer y concertación de los reactivos. De esta manera logramos marcar proteínas palmitoiladas mediante esta nueva técnica. Sin embargo no pudimos identificar nuevas proteínas palmitoilables por falta de tiempo debido a que la implementación de esta técnica nos llevo mucho tiempo y recursos. La mayor sensibilidad de este método con respecto a la marcación metabólica con palmitato radiactivo permite la utilización de esta técnica en la purificación, detección e identificación de nuevas proteínas sinaptosomales palmitoiladas en un futuro cercano.

Por falta de tiempo y debido a la complejidad de la detección del estado de palmitoilación de las proteínas sinaptosomales, decidimos trabajar con un sistema mas reducido. Para ello en el siguiente capítulo purificamos y palmitoilamos la proteínas neuronal GAP-43, estudiando su asociación a membranas artificiales. Esta nueva técnica de detección de cisternas palmitoiladas nos fue de gran utilidad a la hora de analizar el estado de palmitoilación de la proteína GAP-43.

CAPÍTULO 5
Análisis de la
palmitoilación y la
asociación a membranas
artificiales de la proteína
GAP-43

5.1. Introducción al capítulo 5

5.1.1. Características de la proteína GAP-43

En la rata el gen GAP-43 codifica una proteína de 226 aminoácidos (Basi et al., 1987). El verdadero peso molecular es cercano a 25kDa, pero su peso aparente observado en electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) es entre 43-50 kDa. Esto se debe a dos razones la proteína tiene una alta carga natural que causa se una menos cantidad de SDS por aminoácido y además posee una estructura elongada (Benowitz and Routtenberg, 1997).

La secuencia de esta proteína contiene varios aminoácidos cargados y poco hidrofóbicos. Solo contiene una fenilalanina, dos leucinas, tres isoleucinas, siete valinas y ningún triptófano ni tirosina. Contrariamente contiene 30 lisinas, 5 argininas, 3 histidinas, 35 glutámicos y 22 aspártico, así como también un inusualmente gran número de prolinas (17) y alaninas (45). Además, tiene una pequeña estructura secundaria lo cual es atribuible a su gran número de prolinas (Hayashi et al., 1997).

La proteína GAP-43 es palmitoilada en dos cisteínas (Cys-3 y Cys-4), y mutaciones en estos residuos eliminan su unión a membranas lo que llevó a postular que GAP-43 puede unirse a membranas como resultado de su palmitoilación (Skene and Virag, 1989; Zuber et al., 1989). El principal ácido graso adicionado es el palmitato, a pesar que también ocurre la acilación de estearato y otros ácidos grasos en menor medida (Liang et al., 2002). En una célula en estado estático gran proporción de GAP-43 se encuentra depalmitoilada, pero unida a membrana de todas maneras (Liang et al., 2002). Esto indica que las cadenas de palmitato no sirven como un ancla permanente a membrana, sino que son transientes, una vez la proteína palmitoilada se asoció a membrana puede ser depalmitoilada sin modificar su ubicación intracelular (Duncan and Gilman, 1998; Linder and Deschenes, 2003; Resh, 1999).

Cuando la región polibásica Arg6, Arg7, Lys9 y Lys13 está presente la proteína se encuentra palmitoilada y unida a la membrana. La proteína es luego depalmitoilada pero de todas formas retenida en la membrana, aparentemente por interacción con otros componentes de la membrana (Liang et al., 2002). Si uno de los residuos fuera reemplazado por residuos no cargados la proteína es palmitoilada y asociada a membranas; depalmitoilada pero no retenida en la membrana. La remoción de los palmitatos con hidroxilamina no libera a la GAP-43 nativa de la membrana.

Se ha observado que la región N-terminal de 10 aminoácidos de GAP-43 es suficiente para unir a una proteína reportera a la membrana, lo que sugiere que los tres residuos básicos, son suficientes para completar la interacción GAP-43 a la membrana que es iniciada por la palmitoilación (Zuber et al., 1989). Debido a que ensayos de mutagénesis en las cisteínas (Cys-3 y 4) producen un bloqueo de la unión a la membrana (Liu et al., 1994; Zuber et al., 1989), se puede sugerir que la palmitoilación de GAP-43 es el evento inicial y es seguida por la interacción de los residuos básicos con la membrana. La palmitoilación llevaría a la Arg-6, 7 y Lys-9 en alineación con la membrana teniendo así lugar la asociación. Una vez acompañado, las cadenas de palmitato parecen no ser necesarias para la unión a membrana y pueden ser removidas por enzimas específicas. No está claro aún como adicionales uniones a membrana, río abajo de estos tres residuos básicos, pueden darse excepto por la propuesta para la región del dominio efector de unión a calmodulina y PKC (dominio IQ.).

Además GAP-43 se asocia electrostáticamente con PI(4,5)P₂ (Laux et al., 2000) mediante la región cargada netamente positiva que se extiende desde la Ile-38 hasta Lys-56, la cual coincide con el dominio IQ (Chapman et al., 1992). Esta secuencia está conformada por la secuencia aminoácidica IQASFRGHITRKLLKDEKK (en la rata) y coincide en la región sustrato a PKC, ser41. Debido a que GAP-43 contiene múltiples cargas positivas y PI(4,5)P₂ múltiples cargas negativas, la interacción electrostática entre estas dos moléculas podría ser iniciada por varios puentes y la formación de clusters o grupos (Tong et al., 2008). Algunos trabajos proponen a la proteína GAP-43 y otras de su familia como MARCKS o CAP-43 de tener funciones fisiológicas de secuestro de PI(4,5)P₂ de los rafts de la membrana plasmática (Caroni, 2001; Laux et al., 2000; Tong et al., 2008)

Este dominio efector (IQ) también ha sido propuesto de interaccionar con la membrana plasmática interna tanto electrostáticamente como hidrofóbicamente. Varios trabajos han estudiado cambios en la estructura de péptidos correspondientes a este dominio, observándose una estabilización de la conformación a una estructura alfa hélice en presencia de ambientes hidrofóbicos. Sin embargo estos péptidos de secuencia básica pertenecientes a la secuencia del dominio efector fallaban en la unión a membranas de carga neta neutra, uniéndose únicamente a la membrana que contienen algunos lípidos ácidos. Estos resultados llevan a la especulación de que las interacciones hidrofóbicas solamente no son suficientes para ubicar estos péptidos en la membrana (Hayashi et al., 1997; Wertz et al., 1996).

5.1.1. Membranas artificiales: liposomas

El uso de membranas artificiales o liposomas en el estudio de interacciones de las proteínas con la membrana plasmática es una técnica de mucha utilidad. Este sistema nos permite trabajar con membranas cuyo estado físico y composición es conocida y modificable. Los lípidos de las membranas pueden encontrarse en tres estados de ordenamiento: (1) gel o sólido, (2) líquido cristalino o desordenado y (3) líquido ordenado. La fase de ordenamiento adoptada por los lípidos en la membrana depende de la estructura: longitud y saturación de las cadenas de carbono. Por ejemplo la esfingomiélin (SM) tiene cadenas de carbono largas y saturadas por lo que mezclas ricas en SM tienden a adoptar fases sólidas, las cadenas insaturadas que se encuentran en los glicerofosfolípidos tienden a enriquecer las fases líquidas de la membrana. Los esteroides solos no pueden formar bicapas pero en una bicapa formada por lípidos pueden formar una fase líquido ordenada. Cabe destacar que esta fase es altamente ordenada como una fase sólida pero con alta movilidad translacional como una fase líquida. Es interesante que la fosfatidilcolina con colesterol puede adoptar dos fases fluidas coexistiendo un líquido ordenado (Lo) y otro líquido desordenado (Ld). Un comportamiento mucho más complejo se observa en mezclas de colesterol, la cual suele usarse para simular la membrana plasmática externa (van Meer et al., 2008).

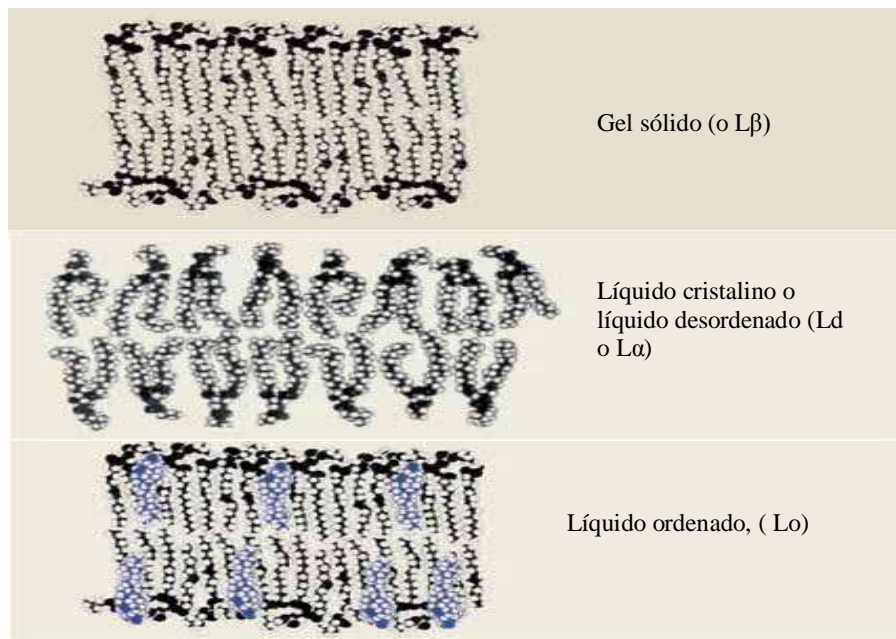


Figura 5.1- Fases lipídicas. Los lípidos de las membranas biológicas o bicapas pueden existir en múltiples estados o fases incluyendo: gel sólido (Lβ), líquido cristalino o desordenado (Ld o Lα) y líquido ordenado (Lo). Figura tomada y modificada de van Meer et al, 2008.

5.1.2. Palmitoilación Química

Otra posibilidad de marcado de proteínas con cisteínas palmitoilables es la denominada palmitoilación química o no enzimática. Que consiste en la utilización del intermediario metabolitamente activo palmitoil-CoA, el cual reacciona con su grupo con energía de la coenzima A (CoA) con el sulfidrilo libre de la cisteína. Cabe señalar que este intermediario metabólico puede sintetizarse *in vitro* enzimáticamente con la acil-coenzima-A sintetasa con la posibilidad de utilizar como sustrato un ácido graso marcado radiativamente y obtener acil-CoA marcada (Figura 5.2).

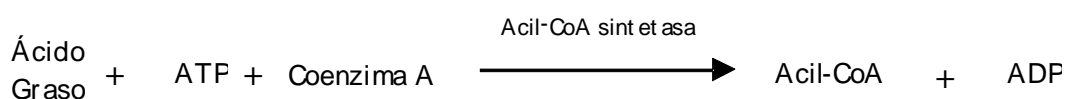


Figura 5.2 - Ecuación de la reacción de síntesis de acil-coenzimaA. Esta reacción de síntesis es llevada a cabo por la enzima acil-CoA sintetasa con el empleo ATP. A partir del ácido graso palmitato se sintetiza de producir palmitoil-CoA y ADP. El magnesio es un cofactor esencial para esta reacción enzimática.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Producción y S-palmitoilación de GAP-43

De manera complementaria a los ensayos bioquímicos hemos planteado otro enfoque experimental *in vitro* con sistemas de membranas artificiales o liposomas para el estudio de la asociación de la proteína GAP-43 a membrana. Este sistema de membranas artificiales nos permite un control de la composición lipídica de las membranas, donde esperamos poder analizar la función de la palmitoilación de la proteína GAP-43 y su asociación a dominios lipídicos de membranas artificiales. La comparación de la distribución subcelular de esta proteína con los resultados previos de su palmitoilación y nivel de expresión muestran una fuerte relación entre su palmitoilación y la localización en microdominios lipídicos tipo rafts o DRMs (Arni et al., 1998; McCabe and Berthiaume, 2001; Patterson and Skene, 1999).

La proteína GAP-43 fue expresada en bacterias *E.Coli* BL21 (DE3) mediante el plásmido de expresión pkr172/GAP-43. Este elemento tiene la secuencia codificante de la proteína GAP-43 de rata bajo la dirección de un promotor regulado por IPTG. El

plásmido fue cedido por el grupo del Dr. Diez-Guerra (Tejero-Diez et al., 1999). El plásmido expresa la proteína sin el agregado de otros dominios conocidos como GST o polihistidinas, que facilitan la purificación de la proteína sobreexpresada en un extracto de bacterias. Por ello para su purificación utilizamos un protocolo basado en el propuesto por el mismo grupo del Dr. Diez-Guerra en un trabajo previo (Tejero-Diez et al., 1999).

Este protocolo aprovecha las particulares características de la proteína GAP-43 como su resistencia al calor y su solubilidad en ácido perclórico (2,5%). Este procedimiento nos permitió tener una buena recuperación de la proteína como componente principal, pero para lograr una mayor pureza decidimos utilizar una columna de intercambio iónico fuerte, la QXL con un equipo de FPLC-AKTA. Realizamos la elución con un gradiente lineal continuo de NaCl de 0 a 1M en buffer Tris 100mM pH7, 4, obteniendo la proteína en el rango de 0,6-0,8M de NaCl.

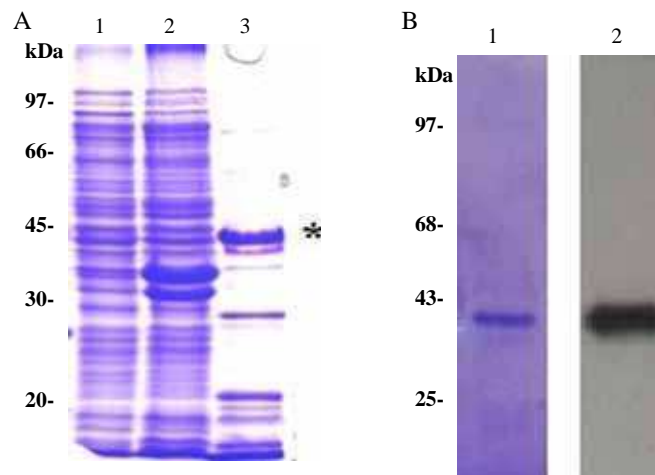


Figura 5.3- Purificación de la proteína recombinante GAP-43. Bacterias E.Coli BL21 (DE3) fueron transfectadas con el plásmido pkr172/GAP-43. La inducción se realizó con 0,4mM de IPTG durante toda la noche a 22°C. Luego las células fueron cosechadas y procesadas según materiales y métodos (sección 2.14). Alícuotas de los extractos celulares obtenidos antes y después de la marcha de purificación fueron analizadas por SDS-PAGE a 12%. **A-** Calle 1- Extracto crudo de las células lisadas. Calle 2- Pellet de las células lisada. Calle 3- Proteína final obtenida luego de la marcha de purificación de calor y ácido perclórico. **B-** Proteína obtenida luego de la purificación por columna de intercambio QXL. Calle 1- SDS-PAGE tinción con Coomassie blue. Calle 2- Western blot para GAP-43 (anticuerpo monoclonal 91E12). (*) Proteína GAP-43 recombinante.

Los pasos secuenciales de precipitación selectiva y cromatografía de intercambio iónico nos permitieron producir una proteína GAP-43 de alta pureza. Además de los pasos de purificación chequeamos su identidad por Western blot, revelando con un anticuerpo monoclonal contra GAP-43 (Figura 5.3). En la figura 5.3 se puede observar la marcha de purificación por calor y solubilidad en perclórico y como luego de estos dos pasos logramos obtener una proteína GAP-43 identificable por su abundancia y de un cierto grado de pureza. Luego mediante la purificación en columna de intercambio iónico QXL logramos obtener una banda única por tinción con el colorante Coomassie blue, calidad que consideramos muy aceptable para la realización de los demás ensayos proyectados.

Otro ensayo importante antes de utilizar la proteína purificada para ensayos de asociación y palmitoilación fue confirmar la integridad de la proteína. Debido a que la proteína GAP-43 no posee actividad enzimática no disponemos de ningún ensayo que nos confirme la correcta y funcional estructura de la proteína. Solo podemos analizar la integridad de la proteína como su capacidad de ser sustrato de la enzima quinasa PKC, función muy importante y ampliamente descrita en variados sistemas fisiológicos (Azcurra et al., 2003; Cammarota et al., 1997; Chan et al., 1986; Coggins and Zwiers, 1989; Kim et al., 2010; Nguyen et al., 2009; Nielander et al., 1990; Sheu et al., 1990b; Sheu et al., 1990a).

Este ensayo consistió en la fosforilación *in vitro* con la PKC, utilizando como sustrato ^{32}P -ATP, en las condiciones descritas en materiales y métodos (ver sección 2.15). Luego de evaluó la fosforilación efectiva de la proteína purificada dependiente de PKC. De esta manera pudimos confirmar que nuestra proteína GAP-43 purificada es un sustrato muy efectivo de la PKC, como lo es fisiológicamente en neuronas (Figura 5.4).

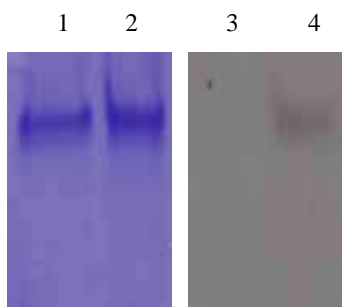


Figura 5.4- Fosforilación de GAP-43 por PKC. Se incubaron 2 μg de proteína GAP-43 durante 40 minutos a 37°C en presencia de 10 μM ^{32}P -ATP (100 $\mu\text{Ci/ml}$, NEM PerkinElmer), 5mM Cl_2Mg , 100 μM Cl_2Ca , 140 μM fosfatidilserina, 325nM PMA, 20mM HEPES pH7,4 en presencia o ausencia de 0,6 Unidades/ml de PKC β II (Calbiochem). Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE. Calle 1- Tinción con Coomassie de GAP-43 sin el agregado de PKC. Calle 2- Tinción con Coomassie de GAP-43 incubada con PKC. Calle 3- Exposición de la calle 1 con una placa radiográfica durante 48hs a -70°C. Calle 4- Exposición de la calle 2 a una placa radiográfica durante 48hs a -70°C.

Otros ensayos para confirmar su correcta estructura y plegamiento involucran técnicas complejas como IR (espectroscopía infrarroja) o RMN (resonancia magnética nuclear), las cuales no tenemos a disposición para esta tesis aunque no descartamos su realización futura. Sin embargo creemos que debido que se ha descrito que esta proteína tiene una débil estructura secundaria (Hayashi et al., 1997) no sería un problema su plegamiento luego del tratamiento con ácido tricloro acético (TCA). Aunque no podemos afirmar que su plegamiento es totalmente nativo, pero con este ensayo pudimos ver que se mantienen ciertas actividades fisiológicas conocidas como lo es ser sustrato de la PKC (Azcurra et al., 2003; Cammarota et al., 1997; Chan et al., 1986; Coggins and Zwiers, 1989; Kim et al., 2010; Nguyen et al., 2009; Nielander et al., 1990; Sheu et al., 1990b; Sheu et al., 1990a).

La S-palmitoilación es una modificación postraduccional exclusiva de organismos eucariotas por lo que las bacterias en las cuales expresamos la proteína GAP-43 carecen de la maquinaria de S-palmitoilación. Por esta razón debimos proceder a la modificación de la proteína purificada de manera *in vitro* a través del intermediario metabólico palmitoil-CoA. Esta reacción también es llamada palmitoilación química, debido a que no intervienen enzimas para dicha modificación sino que el intermediario palmitoil-CoA reacciona químicamente con los grupos sulfidrilos de las cisteínas libres de la proteína. De esta manera se modifican las cisteínas libres de la proteína, quedando unido un grupo palmitoil mediante una unión tioester (Quesnel and Silvius, 1994).

Para ello sintetizamos el intermediario ^3H -palmitoil-CoA, enzimáticamente con la enzima Acil-CoA sintetasa a partir de ^3H -palmitato, palmitato, ATP y coenzima-A (ver sección 2.17), luego separamos el producto por el método de separación de fases hidrofóbicas con cloroformo : metanol : agua (fase acuosa y fase orgánica) y analizamos por TLC alícuotas de ambas fases (Figura 5.5). La marca radiactiva fue aportada por el ^3H -palmitato y la masa por el palmitato frío, de esta manera el producto palmitoil-CoA obtenido tiene marca radiactiva aunque no en la totalidad de sus moléculas sino solo la suficiente para permitirnos detectar la señal. Según la figura 5.5 pudimos lograr una conversión del 100% de palmitato a palmitoil-CoA ya que como se aprecia en la calle 3 la señal del palmitato es indetectable (Patterson and Skene, 1997).

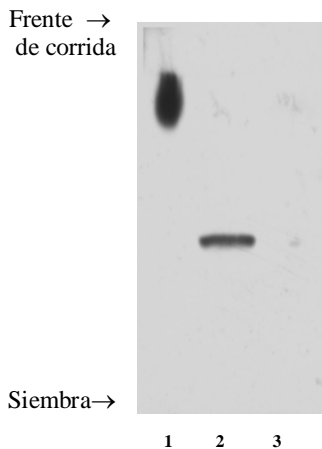


Figura 5.5- Síntesis de palmitoil-CoA. Se incubó ^3H -palmitato, coenzima-A 1mM, ATP 10mM, MgCl_2 10mM, AcilCoA sintetasa 1unidad/ml, en buffer Hepes 10mM pH7.5 dos hora a 37 °C. Luego se separaron las fases con cloroformo:metanol:agua. alícuotas de ambas fases se analizan por cromatografía en capa delgada (TLC). La fase móvil fue: butanol/ácido acético/ agua (5:2:3). Se realizó la fluorografía con PPO en éter etílico al 10% (p/v) y se expone a una placa sensible. Calle1- ^3H -palmitato (Rf.0,81), Calle2- Fase acuosa: ^3H -palmitoil-CoA (Rf.0,63), Calle3- Fase orgánica. Rf se calcula como el cociente entre la distancia de corrida sobre el la distancia total.

Luego utilizamos el palmitoil-CoA sintetizado con marca radiactiva para palmitoilar químicamente a la proteína GAP-43 purificada (sección 2.13), sin embargo no pudimos detectar marca radiactiva por fluorografía. Consideramos que el problema de este ensayo era la baja marca radiactiva incorporada a la proteína, lo que nos impedía detectar una señal con los tiempos de exposición estándares (2-4 semanas). Esta falla en el sistema de marcación con radiactivo no nos permitió seguir el estado de palmitoilación de la proteína. Para evitar utilizar una mayor cantidad de radiactivo decidimos aplicar otro método para la detección efectiva de la palmitoilación. El método elegido fue el previamente descrito y optimizado denominado de intercambio de ácido graso. La posterior marcación con biotina-maleimida, nos permite una gran sensibilidad en la detección de cisteínas palmitoiladas (Drisdell et al., 2006).

Este nuevo método permite la detección de cisteínas libres no palmitoiladas lo que nos permitirá analizar el estado de S-palmitoilación de la proteína GAP-43. Como primer paso en la optimización decidimos ajustar el pH de la reacción ya que este es crítico en la eficiencia de la palmitoilación química (Patterson and Skene, 1997). Utilizamos nuevamente una proteína control como la BSA ya que es una proteína comercialmente disponible. Además, como ya hemos mencionado, esta proteína posee varias cisteínas (35), que dependiendo del su grado de oxidación serán las que estén disponibles para ser palmitoiladas y que de cualquier modo son muy numerosas en comparación a GAP-43 que posee solo dos cisteínas. Por esta razón la señal será de mayor intensidad con la BSA, facilitando la detección y la cuantificación.

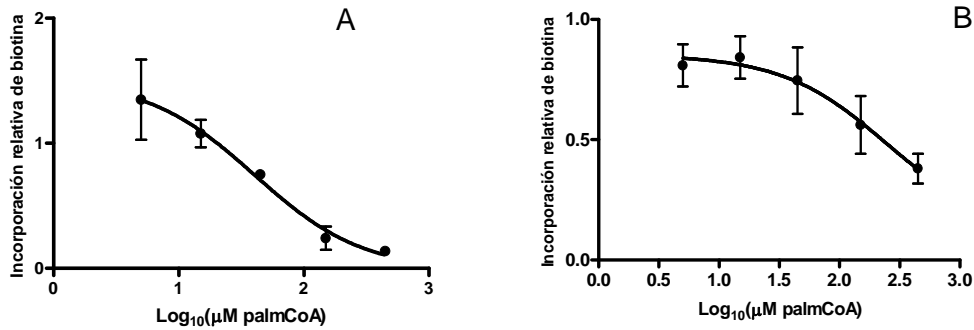


Figura 5.6- Palmitoilación química de BSA. Se comparó la eficiencia de palmitoilación química mediante el intermediario metabólico palmitoil-CoA a dos pHs. Se utilizó la proteína BSA (10μg) la cual fue incubada con cantidades crecientes de palmotil-CoA (5-450μM) durante 2 horas a 30°C. Luego se marcaron las cisteínas libres que no fueron palmitoiladas con 0,4μM de biotina-maleimida, se reveló con estreptavidina-peroxidasa y quimioluminiscencia. **A.** Palmitoilación de BSA a pH8. **B.** Palmitoilación de BSA a pH7.

Elegimos para trabajar en dos pH cercanos al fisiológico ya que trabajos previos de palmitoilación química describen como óptimo el pH7 (Quesnel and Silvius, 1994), por lo que analizaremos los pH7 y pH8. En la figura 5.6 se grafica la biotina incorporada a la proteína en relación al logaritmo de la concentración de palmitoil-CoA (μM) utilizada en el ensayo. Debe tenerse en cuenta que cuanto mayor es la incorporación de palmitato mediante uniones tioesteres menor será la incorporación de biotina a las cisteínas libres. Por lo tanto podemos observar en los gráficos como a un pH8 la palmitoilación es más eficiente y se logra una mayor incorporación de palmitatos a los grupos sulfhidrilos de las cisteínas libres. Podemos inferir de este ensayo que la palmitoilación química de BSA es más eficiente a un pH8 que a pH7, lográndose a este pH un casi 100% de incorporación de palmitato con 450μM de palmitoil-CoA.

Nuestra proteína a palmitoililar es GAP-43 por lo tanto con las condiciones anteriores establecidas procedimos a realizar la palmitoilación química y la detección de la misma por el ensayo de marcación de cisteínas no palmitoiladas con marcación de biotina-maleimida. Teniendo en cuenta que la proteína tiene solo dos cisteínas en su secuencia decidimos utilizar una relación molar de palmitoil-CoA a proteína de 1 en 50. En estas condiciones logramos una palmitoilación del 100% de las cisteínas palmitoilables y detectándolas por el método de biotina-maleimida (Figura 5.7). Con este resultado podemos decir que la GAP-43 está palmitoilada eficientemente en una gran mayoría en sus dos únicas cisteínas palmitoilables.

Como resultado de esta primera parte del trabajo podemos resaltar que expresamos y purificamos la proteína GAP-43 en bacterias, para luego modificarla *in vitro* mediante la palmitoilación química. De esta manera obtuvimos la proteína GAP-43 recombinante pura palmitoiladas y sin palmitoilar en cantidades suficientes para los próximos experimentos del capítulo.

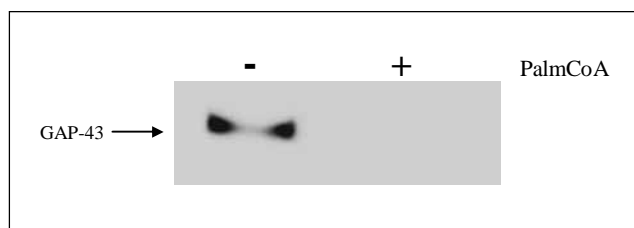


Figura 5.7- Palmitoilación de GAP-43. La reacción se realizó en buffer Hepes 100mM pH8 durante 2 horas a 30°C incubando una relación molar 1:50 de proteína : palmitoil-CoA (+). Luego se marcaron las cisteínas no palmitoiladas con biotina-maleimida (0,4mM) durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizó una separación por SDS-PAGE y transferencia para un posterior revelado con estreptavidina conjugada a peroxidasa y quimioluminiscencia. Se utilizó como control la proteína GAP-43 sin el agregado de palmitoil-CoA (-)

5.2.2. Preparación de los liposomas (LUVs).

Para los ensayos de asociación se prepararon liposomas unilamelares (LUVs) de diferentes composiciones lipídicas con el objetivo de simular la membrana biológica en diferentes estados físicos. Elegimos tres sistemas lipídicos de distinto estado físico a la temperatura fisiológica, uno fue gel-sólido, otro líquido ordenado (Lo) y un último sistema líquido desordenado (Ld). Adicionalmente a cada sistema le agregamos al un 20% de fosfatidilserina (DPPS), lo que le otorga una carga neta negativa a los liposomas (Tabla 5.1). El objetivo era proporcionarle a los LUVs una carga neta negativa fue reproducir de esta manera las características electrostáticas de la monocapa interna de la membrana plasmática (Lodish et al., 2008). Finalmente tendremos para trabajar seis sistemas lipídicos en tres estados físicos diferentes (Lo, Ld y gel), tres con carga neta negativa aportada por la DPPS y otros tres sistemas lipídicos sin carga neta o neutros.

<i>Sistema Lipídico</i>	<i>Fase a 37°C</i>	<i>% DPPC</i>	<i>% DMPC</i>	<i>% Colesterol</i>	<i>% DPPS</i>
A	Gel	80	-	-	20
B	Ld	-	80	-	20
C	Lo	-	40	40	20
α	Gel	100	-	-	-
β	Ld	20	80	-	-
γ	Lo	20	40	40	-

Tabla 5.1- Sistemas lipídicos. En la tabla se describen los porcentajes de composición de los 6 sistemas lipídicos utilizados. Los tres primeros sistemas (A,B,C) contienen un 20% de DPPS que otorga una carga neta negativa a los liposomas. En los sistemas α , β y γ la DPPS fue reemplazada por DPPC. Ld: Líquido desordenado. Lo: Líquido ordenado.

La fluidez de una membrana es una característica que depende tanto de la composición lipídica de esta como de la temperatura del medio. Por lo tanto una misma bicapa lipídica puede pasar de estar en forma viscosa a una forma más cristalina, perdiendo pues sus propiedades de movimiento de las cadenas lipídicas al disminuir la temperatura del medio. Este cambio se conoce por transición de fase y dicha temperatura es constante para los lípidos puros. Sin embargo cuando se realizan mezclas lipídicas como en los liposomas las temperaturas de transición teóricas no pueden ser calculadas certeramente.

Para conocer empíricamente el estado de fase a la temperatura fisiológica hicimos mediciones con la técnica de EPR o resonancia paramagnética electrónica. Esta técnica consiste en la detección de la señal paramagnética producida por los electrones desapareados de las moléculas. Los lípidos naturalmente no poseen electrones desapareados, por lo tanto agregaremos a nuestros sistemas moléculas marcadoras o marcadores de espín. Estas sustancias poseen artificialmente electrones desapareados cuya señal será detectada por el equipo de EPR. De esta manera podemos por esta técnica estudiar el grado de rigidez de las cadenas acílicas de los lípidos en los liposomas y detectar los cambios de estado ocurridos por la variación de la temperatura. Para analizar diferentes profundidades en la bicapa lipídica se usan tres marcadores espín 5, 12 y 16-doxil ácido esteárico (5, 12 o 16-SASL). Estos marcadores incorporan pasivamente a la bicapa durante la formación de los liposomas (ver apéndice EPR).

De esta manera pudimos determinar la temperatura de transición de los liposomas con la composición lipídica utilizada en los ensayos. Se obtuvieron espectros de EPR a diferentes temperaturas a 9,8 GHz (banda X) con un espectrómetro Bruker ER-200. Para analizar el grado de ordenamiento se evalúan los parámetros los

parámetros hiperfinos A_{MIN} y A_{MAX} , de los espectros su variación con la temperatura. Un incremento de A_{MIN} indica una disminución del grado de ordenamiento de las cadenas acílicas. El parámetro A_{MAX} se comporta en forma opuesta (ver apéndice EPR).

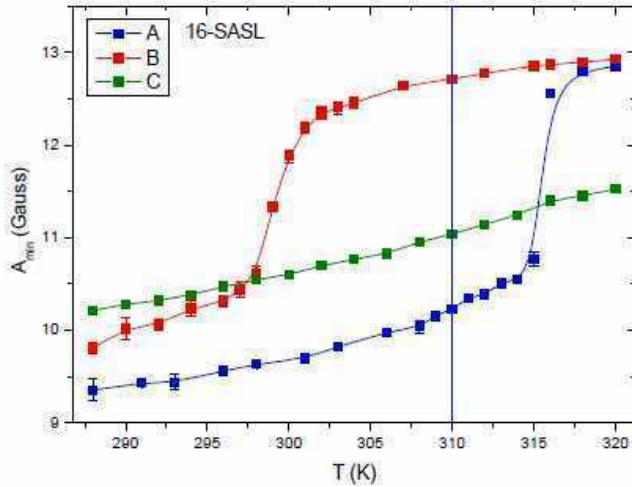


Figura 5.8-Gráficos del parámetro hiperfino A_{MIN} - Se grafica A_{MIN} en función de la temperatura para los 3 sistemas con carga negativa. Un aumento de este parámetro implica un aumento del desorden de las cadenas acílicas. Se evidencian las transiciones de fase gel a líquido cristalino para los sistemas lipídicos A y B. La línea vertical azul a 310K (37°C) indica la temperatura de incubación de los ensayos de asociación con liposomas

En la figura 5.7 se graficó el parámetro A_{MIN} frente a la temperatura para los 3 sistemas lipídicos que contienen DPPS (20%), utilizando el marcador de espín 16-SASL. En ensayo se puede observar que los sistemas A y B presentan transiciones de fase bien definidas por arriba (A) y por debajo (B) de la temperatura fisiológica (310K). En cambio que el sistema lipídico C mostró una variación monótona del parámetro A_{MIN} con la variación de temperatura. Viendo este comportamiento del sistema C frente a la temperatura pudimos concluir que presenta un sistema en fase líquido ordenado (Lo).

La temperatura de transición de fase de los sistemas A y B se calculó a partir de los datos graficados de la figura 5.7. Los cuales ajustando la ecuación 5.1 que describe una hipérbola nos permite calcular el parámetro P_5 que corresponde a la temperatura de transición de fase.

Ecuación 5.1

$$A_{min} = \frac{1}{2} \left[\frac{P_1}{1 + \exp(-(T - P_5) \cdot P_2)} + (T - P_5) \cdot P_3 + P_4 \right]$$

La temperatura de transición calculada para el sistema lipídico A fue de 42,5°C (315,5K) por lo tanto a la temperatura del ensayo (37°C) estará en fase gel. Para el sistema lipídico B la temperatura de transición fue de 26°C (299,0K) presentando a 37°C una fase de líquido cristalina o desordenada (Ld).

De esta manera podemos asegurar que a la temperatura del ensayo (37°C o 310K) el sistema A estará en fase gel, el sistema B presentará una fase líquido cristalina y el sistema C está en fase líquido ordenada. Los tres sistemas lipídicos que preparamos presentan grados de ordenamiento marcadamente diferentes.

Los otros tres sistemas lipídicos que no contienen DPPS (α , β , γ) fueron también estudiados por EPR y presentaron a 37°C similares espectros a los sistemas con DPPS. Esto es un grado de ordenamiento lipídico y temperatura de fase similar al de los correspondientes LUVs cargados. Por lo tanto podemos afirmar que los dos grupos de sistemas lipídicos con o sin DPPS presentan a la temperatura fisiológica las tres fases: gel (A y α), líquido desordenada (B y β) y líquido ordenada (C y γ).

5.2.3. Ensayos de asociación de GAP-43 a liposomas (LUVs)

El ensayo de asociación se realizó a una temperatura de 37°C, durante una hora manteniendo una relación molar de lípidos a proteína de 1500 a 1. Por otro lado trabajamos con NaCl 150mM para reproducir la fuerza iónica del medio intracelular. La suspensión de proteínas y liposomas se centrifugó luego de la incubación para separar los liposomas (con la fracción de la proteína asociada) de la proteína no asociada libre en solución. Finalmente se cuantificó la proteína no asociada a los liposomas analizando el sobrenadante mediante SDS-PAGE tinción por Coomassie blue y posterior densitometría con el programa ImageJ.

Para asegurarnos que el método de separación por centrifugación era eficaz, realizamos controles del método obteniéndose cantidades menores al 5% del total de los lípidos agregados originalmente en el sobrenadante. El método de separación por centrifugación lo consideramos adecuado para la separación de los lípidos de la proteína libre en el sobrenadante.

Cuando analizamos la asociación de la proteína a los liposomas (LUVs) observamos una mayor afinidad por los sistemas lipídicos ordenados. Tanto el sistema A en estado gel como el sistema C en estado líquido ordenado muestran el porcentaje mayor de asociación a los LUVs (A: 43% y C: 34%). El sistema B que presenta un estado líquido cristalino o desordenado solo tiene un porcentaje de asociación de 24% (Figura 5.9). Teniendo en cuenta que los tres sistemas lipídicos poseen la misma carga electrostática (todos poseen un 20 % mol de DPPS), podemos suponer como responsable de estas diferencias al estado físico de los liposomas y no solamente a una interacción electrostática de la proteína con las cabezas de los lípidos de los LUVs.

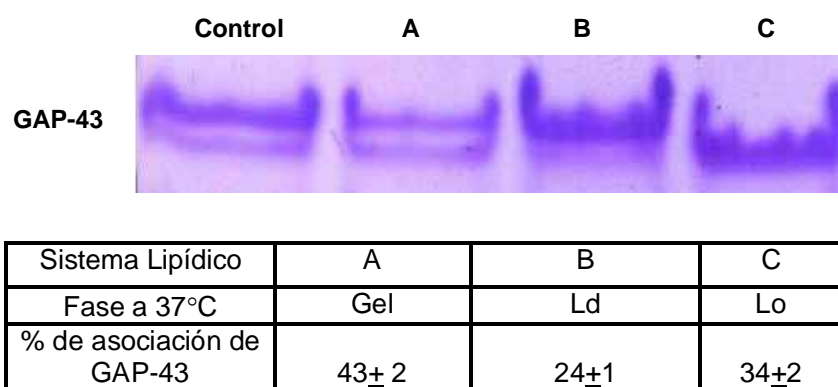


Figura 5.9- Ensayo de asociación de GAP-43 no palmitoilada a LUVs. En la parte superior de la figura se muestran geles SDS-PAGE representativos de los sobrenadantes de la incubación de GAP-43 con los diferentes sistemas lipídicos. El control se realizó sin el agregado de LUVs en la incubación, solo buffer. NOTA: el volumen de sobrenadante sembrado en el SDS-PAGE fue menor para el caso del control que para las demás muestras incubadas con LUVs con el objetivo de mejorar la cuantificación por densitometría. En la tabla a la derecha se muestran los porcentajes de asociación de la proteína a cada tipo de LUVs. El 0% de asociación corresponde al contenido total de proteína en la solución original y por diferencia con el contenido en el sobrenadante se determina el porcentaje de asociación. En la tabla se menciona a la fase lipídica en la cual se encuentra cada sistema a la temperatura fisiológica. La proteína GAP-43 no presenta asociación significativa con los liposomas no cargados (datos no mostrados). N=3. se representa la media \pm SD.

Vale la pena señalar que regularmente observamos que la proteína purificada GAP-43 migrar en SDS-PAGE como dos bandas muy próximas. Se puede observar la aparición de ese doblete en el sobrenadante de incubación con liposomas y notar que en la solución de proteína original aparece como una única banda (Figura 5.9). Tratando de buscar una explicación a esta anomalía encontramos varios trabajos que describen que GAP-43 es clivada por la proteasa calpaína (Zakharov et al., 2005; Zakharov and Mosevitsky, 2007). Este clivaje se daría en la región N-terminal produciendo una banda de peso molecular similar al observado en nuestros experimentos. Por esta razón

postulamos la hipótesis que estas bandas se originaban por una actividad proteolítica específica, sin embargo no podemos descartar que esto se deba a un plegamiento diferencial de la proteína. Como no podemos explicar completamente estos patrones asociación particular por lo que no hicimos distinciones entre ambas bandas para la cuantificación y discusión de los resultados.

5.2.4. Ensayos de asociación de GAP-43 palmitoilada a liposomas

El ensayo de asociación a liposomas (LUVs) se realizó en las mismas condiciones que para la proteína GAP-43 sin palmitoilar. La temperatura de trabajo fue a 37°C, y durante una hora manteniendo una relación molar de lípidos a proteína de 1500 a 1. Por otro lado trabajamos nuevamente con NaCl 150 mM para reproducir la fuerza iónica presente en el medio intracelular fisiológico. La suspensión de la proteína con los liposomas se centrifuga luego de la incubación para separar los liposomas (con la fracción de la proteína asociada) de la proteína libre en solución. Luego cuantificamos la proteína en el sobrenadante visualizándola por SDS-PAGE y analizando por densitometría.

Cuando analizamos los patrones de asociación de la proteína palmitoilada a los LUVs observamos una mayor afinidad por los sistemas ordenados indistintamente de la carga neta que posean (Figura 5.10). Con los liposomas cargados por la presencia de fosfatidilserina (DPPS) observamos una mayor asociación de la proteína palmitoilada con los sistemas ordenados tanto en fase gel (A) y líquido ordenado (C). Esta tendencia fue similar a la observada con proteína sin palmitoilar siendo algo mayor la asociación de la proteína palmitoilada. Esto indicaría una fuerte influencia de la interacción electrostática en la asociación lípido-proteína aunque las dos cadenas de palmitato presentes en la proteína estarían potenciando la asociación de la misma a los LUVs.

Por otro lado cuando observamos la asociación de la proteína palmitoilada a los LUVs neutros (que no poseen DPPS) en este caso solo actúa la influencia de la palmitoilación en la asociación de la proteína ya que no existe la interacción electrostática fuerte. Es llamativo el alto porcentaje de asociación de la proteína palmitoilada al sistema alfa formado únicamente por DPPC. Este hecho podemos explicarlo por la preferencia de las cadenas de palmitato proteína para acomodarse en los sistemas ordenados, más aún esta interacción esta muy favorecida cuando los LUVs

están formados únicamente por DPPC que posee cadenas de palmitatos en el sistema alfa (100% DPPC).

Cuando anulamos la interacción electrostática lípido-proteína al no agregar DPPS en la composición de los LUVs vemos la baja asociación de la proteína con los sistemas en fase tanto líquido desordenada como ordenada (β : 20% DPPC, 80% DMPC; γ : 20% DPPC, 40% DMPC y 40% colesterol). De esta manera vemos que las interacciones electrostáticas entre la proteína y la bicapa lipídica en estos sistemas aun con la presencia de las cadenas de palmitato son importantes.

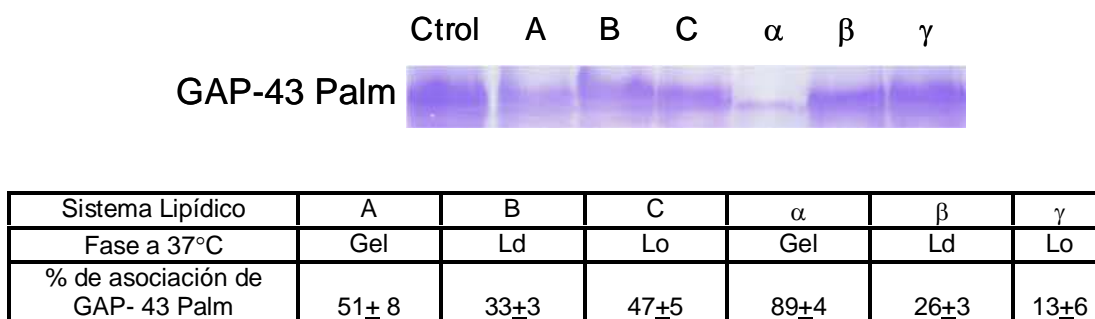


Figura 5.10- Ensayo de asociación de GAP-43 palmitoilada a LUVs. En la figura de arriba se muestran geles SDS-PAGE representativos de los sobrenadantes de la incubación de GAP-43 palmitoilada con los diferentes sistemas lipídicos. El control (Ctrol) se realizó sin el agregado de LUVs en la incubación, solo buffer. NOTA: el volumen de sobrenadante sembrado en el SDS-PAGE fue menor para el caso del control que para las demás muestras incubadas con LUVs con el objetivo de mejorar la cuantificación por densitometría. En la tabla de abajo se muestran los porcentajes de asociación de la proteína palmitoiladas a cada tipo de liposoma. El 0% de asociación corresponde al contenido total de proteína en la solución original y por diferencia con el contenido en el sobrenadante se determina el porcentaje de asociación. En la tabla se menciona a la fase lipídica en la que se encuentra cada sistema a la temperatura fisiológica. Composición lipídica: **A**: 80% DPPC, 20% DPPS; **B**: 80% DMPC, 20% DPPS; **C**: 40% DMPC, 20% DPPS, 40% Colesterol; **α** : 100% DPPC; **β** : 20% DPPC, 80% DMPC; **γ** : 20% DPPC, 40% CMPC, 40% Colesterol. N=3. Se representa la media + SD.

5.2.5. Estudio de los cambios conformacionales de la proteína por EPR

En el extremo N-terminal la proteína GAP-43 posee dos cisteínas que pueden ser palmitoiladas (Cys 3 y Cys 4), pero también tiene una serie de aminoácidos básicos que presentan una carga neta positiva (aminoácidos 1-14). En una parte más alejada del extremo amino se encuentra una región muy importante de la proteína denominado el dominio efector (aminoácidos 39-55). Esta región es la responsable de la unión a

proteína calmodulina, sitio de fosforilación por PKC (ser41) y además posee otra región de aminoácidos cargados positivamente. Algunos trabajos lo describen sólo como un dominio efector que interacciona electrostáticamente con el fosfatidilinositolfosfato (PIP) aunque no le adjudican un papel en el evento inicial de unión a membrana (Laux et al., 2000). Otros autores describen un cambio conformacional (medido por dicroísmo circular) cuando la proteína GAP-43 (o su dominio aislado) se une a membranas lo que determina interacciones no sólo electrostáticas sino también hidrofóbicas (Hayashi et al., 1997; Kosloff et al., 2002; Wertz et al., 1996).

Nuestro interés fue aportar resultados para develar el orden y la importancia de esta serie de pasos para la asociación a membrana de la proteína y su palmitoilación. Siguiendo este objetivo analizamos la unión a membrana de la proteína desde su extremo N-terminal mediante la técnica de EPR (Resonancia Paramagnética Electrónica). Debido a que GAP-43 no tiene señal intrínseca para el EPR, procedimos a modificar la proteína agregando un marcador de espín, Maleimida-Tempo (MT). Esta sustancia reacciona con los grupos sulfhidrilos de las cisteínas libres incorporándose de manera covalente a la proteína. Luego por EPR se obtuvieron los espectros de la proteína marcada en presencia y en ausencia de liposomas (LUVs). Analizando el comportamiento del marcador en los espectros cuando la proteína esta asociada a los liposomas en comparación a la proteína libre, nos permite sacar conclusiones acerca de esta interacción lípidos-proteína.

Incubamos la proteína marcada previamente con MT con LUVs de una composición de 80% DPPC y 20% DPPS. La elección de esta composición similar al sistema A utilizado anteriormente fue con el que obtuvimos una buena asociación de proteína, lo que nos permitirá ver algún cambio si lo hubiera. Las condiciones fueron las similares a las utilizadas en los ensayos de asociación (pH, temperatura, fuerza iónica). Sin embargo aumentamos la cantidad de proteína en relación a los lípidos con el objetivo de poder ver cambios en la proteína marcada con mayor facilidad. Por ello elegimos como primera aproximación para trabajar la relación proteína: lípidos en este fue de 1:2000. Luego de separar las muestras por centrifugación, se tomaron los espectros de EPR a diferentes temperaturas, tanto para la proteína incorporada a los LUVs (pellet) como a la proteína en solución (sobrenadante). En la figura 5.11 se muestran los espectros de EPR obtenidos.

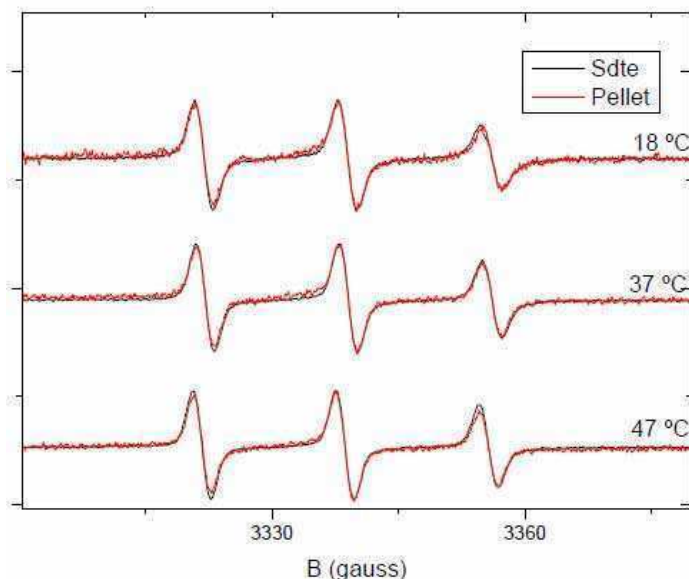


Figura 5.11- Espectros de EPR. Se observan los espectros de EPR de la proteína GAP-43 marcada con el grupoTempo que se encuentra libre en el sobrenadante (negro) o asociada a los LUVs en el pellet (rojo). Los espectros fueron tomados luego de la incubación con LUVs en presencia de 150 mM de NaCl. Composición de los LUVs : 80% DPPC, 20% DPPS. Se muestran espectros tomados a tres temperaturas diferentes: 18, 37 y 47°C.

Como conclusión al analizar los espectros podemos decir que la proteína GAP-43 marcada con MT asociada o no con LUVs no muestra diferencias significativas a las temperaturas de trabajo. Sin embargo cuando se calculan los tiempos de correlación rotacional para cada caso (ver Apéndice EPR) se puede analizar la movilidad de la MT dentro de la proteína. Como vemos en la tabla 5.2 hay una ligera disminución de la movilidad del MT unido a GAP-43 cuando la proteína interacciona con los LUVs medido en el pellet en comparación con el sobrenadante. Esto demostraría que el radical tempo unido al extremo N-terminal de la proteína no palmitoilada limita muy débilmente sus movimientos cuando la proteína se une a la bicapa lipídica.

GAP/MT con LUVs A	τ_c ($\times 10^{-10}$ s)
sdte 18°C	5,0
Pellet 18°C	5,3
sdte 37°C	2,6
Pellet 37°C	2,9
sdte 47°C	2,2
Pellet 47°C	3,0

Tabla 5.2 Tiempos de correlación rotacional, τ_c . Estos parámetros fueron calculados según la ec. A.5 (apéndice EPR) correspondientes a GAP-43 marcada con MT en solución (sdte) y unida a LUVs de composición A (pellet), para las tres temperaturas a las que se obtuvieron los espectros de EPR.

Por otra parte, el ligero aumento del τ_c del radical nitróxido luego de producida la unión a liposomas podría deberse a la rigidización del extremo N-terminal. Debido a una asociación superficial de carácter electrostático con la bicapa lipídica cargada negativamente. No puede descartarse que esta ligera disminución de movilidad pueda deberse a cualquier otro cambio conformacional de la proteína resultante de la unión a membrana que limita débilmente los movimientos del marcador de espín. Sin embargo estos resultados nos podrían estar indicando que el extremo N-terminal de la proteína donde se encuentran las cisteínas 3 y 4 que incorporan el MT, no interacciona fuertemente con la bicapa lipídica. Teniendo esto presente es posible concluir que si el extremo N-terminal de GAP-43 se une a los LUVs, el marcador de espín unido a la proteína (a través de su grupo maleimida) queda expuesto al exterior de la membrana.

5.3. Conclusiones generales del capítulo 5

En el desarrollo de este capítulo hemos logramos producir en un sistema heterólogo como el bacteriano la proteína neuronal GAP-43 de rata, purificarla y luego palmitoilarla químicamente. Nuestro objetivo principal era analizar la asociación de esta proteína a dominios membranales y evaluando la importancia de la palmitoilación en esta asociación a membranas. Para ello preparamos liposomas unilamelares (LUVs) de distinta composición y estado físico (gel, Lo, Ld). Realizamos ensayos de asociación a LUVs a cada uno de los sistemas agregamos o no una carga neta dada por la fosfatidilserina (DPPS), estudiamos así seis sistemas diferentes.

En este trabajo pudimos evidenciar una asociación diferencial a los liposomas con distinto ordenamiento lipídico de la proteína GAP-43 (sin palmitoilar). Pudimos observar una preferencia de la proteína sin palmitoilar hacia los sistemas lipídicos ordenados tanto en fase gel como líquido ordenado. El hecho que los tres sistemas posean la misma carga electrostática pero distinto poder de asociación conduce a especular acerca de algún tipo de interacción diferencial entre la proteína y la bicapa lipídica. La interacción responsable de este efecto es diferente a la electrostática y sea posiblemente hidrofóbica. En cambio cuando analizamos la proteína palmitoilada su afinidad de asociación es similar a la observada en los sistemas con carga neta en estado gel o líquido ordenado. Observándose esta misma tendencia en la asociación de la proteína sin palmitoilar.

En el caso de los LUVs no cargados, donde la DPPS es reemplazada por DPPC, vemos que la interacción con la proteína GAP-43 no palmitoilada es muy débil. No pudiéndose ver diferencias entre los tres estados analizados (gel, Ld, Lo). En contraste cuando la proteína está palmitoilada se produce una fuerte interacción de las cadenas de los palmitatos de la DPPC por la bicapa lipídica y la preferencia por los sistemas ordenados hace que obtengamos un 89% de asociación (α).

Por otro lado también quisimos analizar influencia del extremo amino terminal en la asociación de la proteína GAP-43 sin palmitoilar a la bicapa lipídica. Para ello incorporamos en las cisteínas palmitoilables libres un marcador de espín, el grupo Tempo y analizamos dicha interacción mediante EPR. No se observaron diferencias estructurales en la proteína cuando estaba asociada a los LUVs en comparación con la proteína libre mediante esta técnica. Esto sugeriría en un principio que el extremo amino terminal cercano al sitio de palmitoilación de GAP-43 no interacciona de una manera

fuerte o permanente con la membrana. Sin embargo esta técnica solo nos permitiría ver interacciones fuertes de los aminoácidos cercanos a las cisteínas marcadas con la bicapa. No estamos descartando que ocurran otras interacciones en la región amino terminal más alejado de la región de palmitoilación como podría ser la región de fosforilación de PKC o sitio efector. Por ejemplo cuando se trabaja con la proteína GAP-43 en dos formas truncada (solo los primeros 13 aminoácidos) y la completa (con toda la secuencia) se pueden observar diferencias en el transporte vesicular y la compartimentalización celular de estas dos formas. Este resultado estaría apoyando la teoría que sugiere que las secuencias por afuera de la región de acilación modulan el estado de acilación y el (Trenchi et al., 2009).

Nuestros resultados nos llevan a proponer que en la interacción de la proteína GAP-43 con membranas está influenciada por efectos electrostáticos dados tanto por el extremo amino terminal (1-10 aminoácidos) como por el dominio efector (39-55 aminoácidos). Sin embargo también existen los efectos hidrofóbicos de los palmitatos ubicados en el extremo amino terminal cuando GAP-43 está palmitoilada, aunque creemos que esta influencia tiene poca importancia en la asociación a membranas podría ser muy importante en la ubicación de la proteína en dominios membranales tipo rafts.

En el siguiente capítulo estudiaremos la importancia de ciertas palmitoil-proteínas en un contexto funcional como es dado por un modelo de regeneración periférico. De esta manera nuestro trabajo terminará con un enfoque más aplicado a la función fisiológica de la palmitoilación de proteínas neuronales en la injuria y regeneración .

Capítulo 6

Determinación de los efectos de la axotomía sobre la expresión de proteínas palmitoiladas relacionadas con la regeneración axonal

6.1. Introducción al capítulo 6

Como ya hemos discutido en la introducción general el sistema nervioso central (SNC) del adulto no posee la capacidad de regenerar exitosamente hasta la recuperación total de la función luego de una injuria. Sin embargo a nivel del sistema nervioso periférico (SNP) en el adulto se puede llegar a una regeneración neuronal exitosa. Las causas de esta marcada diferencia han sido muy estudiadas con fines terapéuticos ya que son muchos los accidentes donde la medula espinal es lesionada provocando pérdida de sensación y/o parálisis. De esta manera si se pudiera identificar certeramente que factores o procesos involucrados en la inducción de la regeneración en el SNP o la impiden en el SNC se podría llegar a promover una regeneración exitosa luego de una lesión traumática a nivel central.

La axotomía del nervio ciático en la rata es un modelo bien establecido para evaluar las respuestas que produce el corte o lesión del nervio periférico (Hess et al., 1993; Patterson and Skene, 1994; Schreyer and Skene, 1991). En las neuronas sensitivas pertenecientes a los ganglios de la raíz dorsal se puede observar que las ramas periféricas de estas neuronas son capaces de regenerar exitosamente hasta formar conexiones funcionales con sus tejidos blancos. Pero cuando la lesión es a nivel central las ramas centrales de las mismas neuronas crecen solamente hasta enfrentarse con el ámbito del sistema nervioso central, en la denominada zona de transición o zona de entrada de la médula espinal (ZERD). Aunque se sabe que los astrocitos de la zona de entrada forman un parte importante de la barrera que impide la regeneración (Grimpe and Silver, 2002) y la interacción molecular que produce la inhibición de crecimiento de axones lesionados todavía no se ha entendido completamente. Recientemente se han descrito varias proteínas de adhesión implicadas en este proceso inhibitorio (Busch and Silver, 2007).

Una de ellas es la proteína Thy-1, la cual es una glicoproteína neuronal muy abundante en mamíferos (Tiveron et al., 1992; Xue et al., 1991). En las neuronas la expresión de Thy-1 está regulada en el desarrollo, aparece en el comienzo y al termino del mismo, observándose siempre la exclusión de Thy-1 de zonas con alto crecimiento axonal (Tiveron et al., 1992). La expresión de Thy-1 se inicia hacia el final de la extensión del axón (Xue et al., 1991) y es consistente con la idea de su participación en la estabilización de las conexiones neuronales (Mahanthappa and Patterson, 1992b; Morris et al., 1992).

Con respecto a los receptores celulares de Thy-1 primero se describió un sitio de unión en astrocitos capaz de modular el crecimiento de neuritas (Tiveron et al., 1992; Tiveron et al., 1994) para luego identificar a un ligando de Thy-1 como la integrina compuesta por la subunidad β_3 (Leyton et al., 2001). La interacción Thy-1 con integrina desencadena una rápida fosforilación en tirosinas de proteínas de adhesión focal en el astrocito, lo que provoca la formación de la adhesión focal, fijación y extensión celular, siendo la integrina involucrada en este proceso del tipo $\alpha_v \beta_3$ (Hermosilla et al., 2008).

En este capítulo analizaremos la expresión de ciertas proteínas involucradas en la regeneración o consideradas candidatas a intervenir en este proceso. Utilizaremos el modelo de lesión del nervio ciático en ratas adultas debido a la factibilidad y la amplia experiencia del laboratorio en este procedimiento quirúrgico. Nos proponemos analizar la expresión de varias proteínas en diferentes sectores anatómicos como son el nervio ciático en si mismo, la raíz dorsal y el ganglio de la raíz dorsal (Figura 6.1).

Los somas de las neuronas donde ocurre la síntesis proteica o de RNA mensajeros están en los ganglios de la raíz dorsal, por lo que el análisis de las proteínas a nivel del ciático y las raíces nos darán un indicio del transporte de la proteína hacia la región del SNC o hacia la zona de lesión del SNP.

En una segunda parte de este capítulo analizamos la zona de entrada en la médula de las raíces dorsales, los ganglios y el nervio ciático mediante la técnica inmunofluorescencia indirecta. Nuestro objetivo era poder evidenciar una co-localización entre la proteína Thy-1 y su receptor en astrocitos la integrina $\alpha_v \beta_3$, en nuestro sistema de lesión del nervio ciático.

6.2. Resultados y discusión

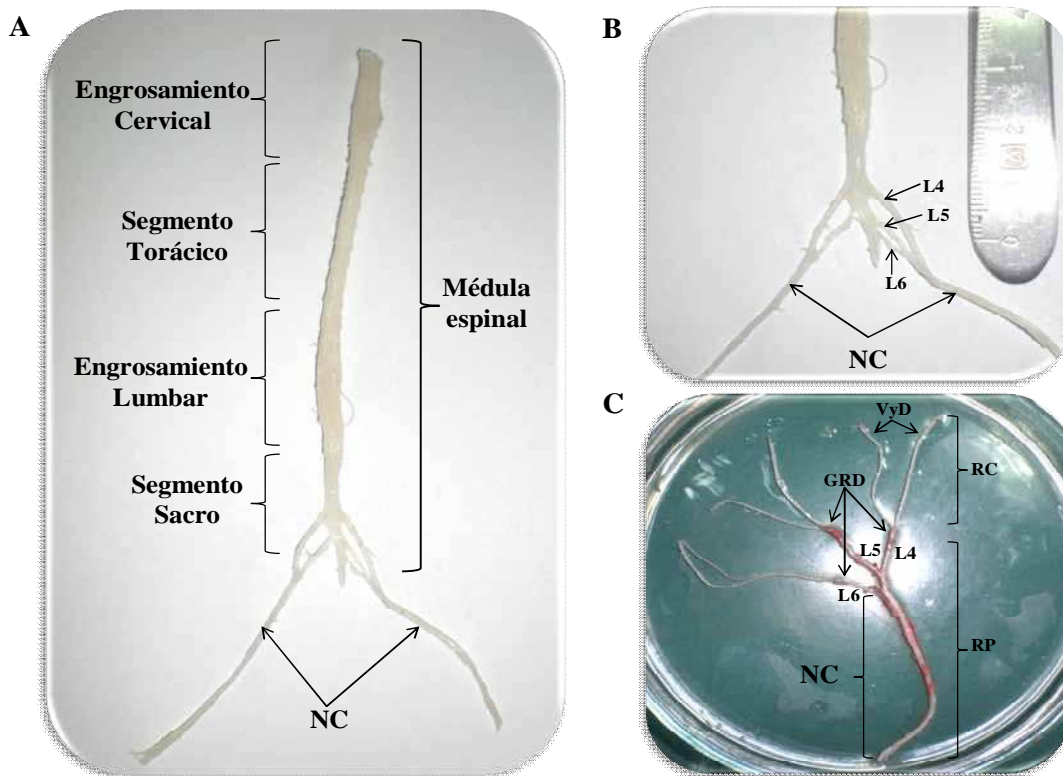


Figura 6.1. A) Médula espinal y nervios ciáticos (NC); B) Formación del NC por los nervios espinales lumbares (L) 4, 5 y 6to; C) NC, L, GRD, raíces nerviosas periférica (RP) y centrales (RC) ventrales y dorsales (VyD). Figura cedida por el médico Luis Savastano y autorizada su publicación en ésta tesis doctoral.

Realizamos axotomías unilaterales por aplastamiento (“crush”) del nervio ciático en ratas adultas las cuales fueron sacrificadas a los 2, 7 y 14 días después de la realización de la lesión. El objetivo de analizar la axotomía a estos tres tiempos es poder ver las diferentes etapas de regeneración nerviosa. Comenzamos con los 2 días post-lesión donde ocurre infiltración de macrófagos y limpieza de los restos de mielina, pasando a los 7 días donde la regeneración está empezando a ocurrir para terminar en los 14 días post-lesión donde la regeneración esta ocurriendo y es máxima la expresión de proteínas relacionadas con ella (Chen et al., 2007).

Extrajimos a los distintos tiempos post-lesión muestras de tejido del nervio ciático a nivel de la lesión, los ganglios de la raíz dorsal (DRG) lumbares correspondientes (L4 y L5) y las raíces dorsales de los ganglios que corresponden a este nervio. Todas las muestras se tomaron a ambos lados del animal utilizando el lado no

lesionado como control y fueron tratadas para extraer las proteínas totales (ver sección 2.24). Analizamos mediante la técnica de Western blot la expresión de varias proteínas comparando su expresión con respecto al lado no lesionado del mismo animal. Para normalizar la proteína total tomamos como unidad de expresión a la cantidad de proteína expresada del lado no lesionado, considerándola control sin inducción por la lesión del otro lado. Expresaremos de este modo los valores relativos de proteína con respecto a la proteína del lado control.

Analizamos la expresión de ciertas proteínas palmitoiladas candidatas a intervenir en la regeneración nerviosa para analizar su expresión en las zonas lesionadas o controles. Este ensayo solo nos permitirá ver si alguna proteína presenta inducida o inhibida su expresión en una zona anatómica determinada pero debido a que estamos analizando tejidos, no podemos identificar que tipo celular está expresándola diferencialmente.

6.2.1. Expresión de GAP-43

Los controles positivos de una injuria quirúrgica exitosa se pueden dividir en dos controles metodológicos de la correcta realización de la técnica por un lado la observación al realizar los pinzamientos durante la cirugía de una contracción refleja del miembro inferior ipsilateral. Esta reacción nos indica que estamos comprimiendo efectivamente el nervio ciático. Otra manera de confirmar la lesión es a nivel molecular analizando el patrón de expresión de la proteína relacionada al crecimiento y regeneración neuronal GAP-43. La inducción de esta proteína es bien conocida y ha sido descrita por varios grupos. Estos trabajos describen que luego de una lesión y durante la regeneración se produce su acumulación de GAP-43 en los ganglios dorsales o DRGs y sus proyecciones tanto centrales como periféricas (Coggeshall et al., 1991; Schreyer and Skene, 1991).

Cuando analizamos en nuestro modelo la expresión de la proteína GAP-43 pudimos observar un aumento de la misma luego de la lesión. Este aumento de la expresión GAP-43 fue evidente tanto en las raíces dorsales, los ganglios (DRGs) como también en el nervio ciático proximal al sitio de lesión (Figura 6.2). Más en detalle el patrón de expresión de GAP-43 muestra un aumento en el DRG, significativo a los 7 días post-lesión y volviendo a los niveles controles a los 14 días.

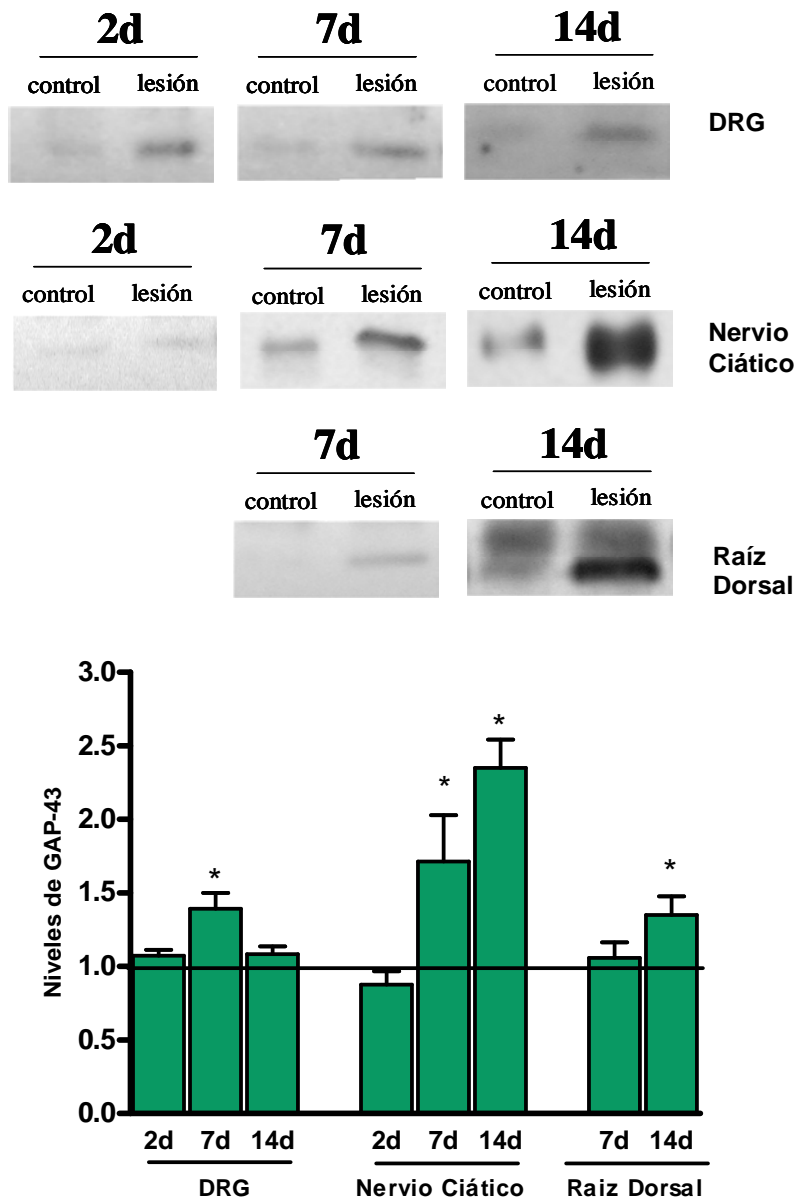


Figura 6.2- Niveles de GAP-43 detectados por Western blot. Representativa imágenes de los Western blots se muestran arriba. La cuantificación de 3 experimentos independientes se grafica abajo, relativizada a los niveles de la proteína en el lado control (indicados por la línea horizontal). Se representa la media \pm S.E.M. Se realizó un ANOVA de una vía para ver las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$ (*). Para la cuantificación se utilizó el programa ImageJ (NIH) y se graficó utilizando el GraphPad prism.

En cambio en el nervio ciático observamos un aumento progresivo de la proteína a lo largo de los días, llegando a un máximo a los 14 días post-lesión. Este aumento de la proteína al día 14 alcanza más de 2 veces de inducción con respecto al lado control sin operar. En las raíces dorsales el aumento observado por Western blot de la expresión de GAP-43 se ve significativamente aumentada únicamente a los 14 días post-lesión, siendo a los 7 días los niveles cercanos al control (no significativos). El poder observar una inducción de la expresión de la proteína relacionada con el crecimiento GAP-43 nos confirma el éxito de la lesión y regeneración periférica realizada en el nervio ciático en nuestro modelo (Figura 6.2).

6.2.2. Expresión de las proteínas SNARE

Un grupo de proteínas interesante para analizar su expresión eran las proteínas que componen el complejo de fusión SNARE (SNAP-25, syntaxina y VAMP). Este complejo de proteínas lleva a cabo los procesos de fusión de membranas fundamentales en el sistema nervioso como por ejemplo para la liberación de neurotransmisores en la sinapsis química o el transporte y fusión de vesículas a los conos de crecimiento. Nosotros esperábamos poder ver en este modelo cambios significativos de estas proteínas en las zonas de crecimiento de axones como en el nervio ciático lesionado o en el DRG. Sin embargo en el análisis de las proteínas SNARE por Western blot utilizando los anticuerpos específicos para cada una no se pudieron observar diferencias significativas en los niveles de expresión luego de la injuria. En la figura 6.3 se muestran los resultados de la proteína SNAP-25 del complejo de fusión SNARE. Se observaron leves diferencias en la expresión de la proteína con respecto al control pero estos cambios no fueron significativos. Se puede ver también en la figura 6.3 que en el DRG los niveles están muy cercanos al control, no pudiéndose detectar diferencias significativas. A su vez en la raíz dorsal vemos una leve disminución de la proteína a los 7 días post operación, pero sin relevancia estadística. En el nervio ciático los niveles de SNAP-25 permanecen similares al control en el rango de días analizados (Figura 6.3). También se analizaron las otras proteínas SNARE (VAMP y syntaxina) no pudiéndose observar diferencias significativas en los niveles de su expresión a lo largo de los 2 a 14 días post-lesión, ya sea en la raíz dorsal, en DRG o en el nervio ciático (datos no mostrados).

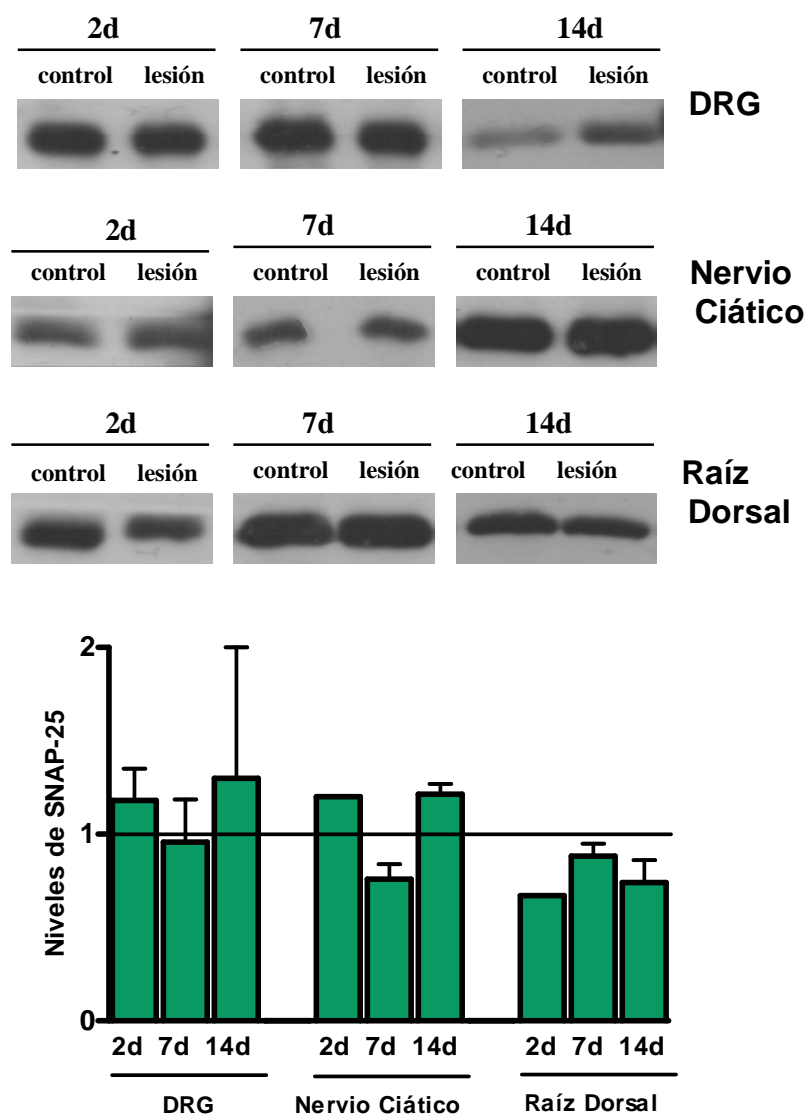


Figura 6.3- Niveles de SNAP-25 detectados por Western blot. Representativas imágenes de los Western blot se muestran arriba. La cuantificación se muestra en el gráfico de abajo, relativizada a los niveles de la proteína en el lado control (indicados por la línea horizontal). Se representa la media \pm S.E.M de tres cuantificaciones independientes. Se realizó un ANOVA de una vía para ver las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$ (*). Para la cuantificación se utilizó el programa ImageJ (NIH) y se graficó utilizando el GraphPad Prism.

6.2.3. Expresión de proteínas de andamiaje

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática, cuya base estructural son las proteínas caveolinas (cav-1, cav-2 y cav-3). La isoforma caveolina-2 muestra la misma distribución en tejidos que caveolina-1, co localizan y forman complejos hetero-oligómeros in vivo (Scherer et al., 1997).

La proteína caveolina tiene una inusual topología, posee un dominio hidrofóbico central que forma una horquilla dentro de la membrana. Como consecuencia del

posicionamiento de este dominio tanto los extremos N-terminal como C-terminal están orientados hacia la cara citoplasmática de la membrana celular. Caveolina-1 posee tres sitios de posible S-palmitoilación, los cuales no presentan importancia para su asociación a membranas (Dietzen et al., 1995). Esto sugiere que estos grupos palmitoilos pueden servir tal vez para otras funciones como la interacción con otras proteínas caveolares (Lee et al., 2001a; Uittenbogaard and Smart, 2000).

Se ha propuesto que estas proteínas funcionan como un andamiaje en el cual muchas clases de moléculas de señalización pueden ensamblarse para generar complejos de señalización, existen varios estudios soportan esta hipótesis (Chen et al., 2006b; Li et al., 1996a; Maggi et al., 2002; Salani et al., 2009). Las proteínas de interacción con caveolina incluyen la proteína G subunidad alfa, H-ras, la familia de tirosinas quinasa src, NOS endotelial, EGF-R y la proteína quinasa C (Engelman et al., 1998). En varios trabajos se ha evidenciado que la unión efectiva de caveolina puede inhibir la actividad enzimática de estas moléculas de señalización *in vitro* (Li et al., 1996a; Okamoto et al., 1998). Por otro lado se vio que la expresión de caveolina-2 es regulada positivamente en respuesta a un daño mecánico en tanto en células PC12 como en neuronas del ganglio de la raíz dorsal en cultivo (Galbiati et al., 1998). Dado que muchas de las proteínas de señalización que interaccionan con las caveolinas están involucradas en la regeneración neuronal, y que hay trabajos donde se observó un aumento de la expresión de caveolina-2 ante una injuria, creímos importante analizar la expresión de caveolina en nuestro modelo de lesión de nervio ciático.

La proteína caveolina-1 ha sido descrita como fundamental en el reclutamiento de proteínas a dominios lipídicos tipo rafts ante un determinado estímulo. Por ejemplo ante el tratamiento con IGF-I caveolina-1 cumple un rol muy importante en la translocación de la integrina $\beta 1$ a rafts (Salani et al., 2009). Esto sugiere que la activación del receptor de IGF-I esta acoplado a la reorganización de la membrana por la integrina $\beta 1$ y que caveolina-1 sería un mediador del receptor de IGF-I en el reclutamiento de la integrina a los dominios lipídicos o rafts (Salani et al., 2009).

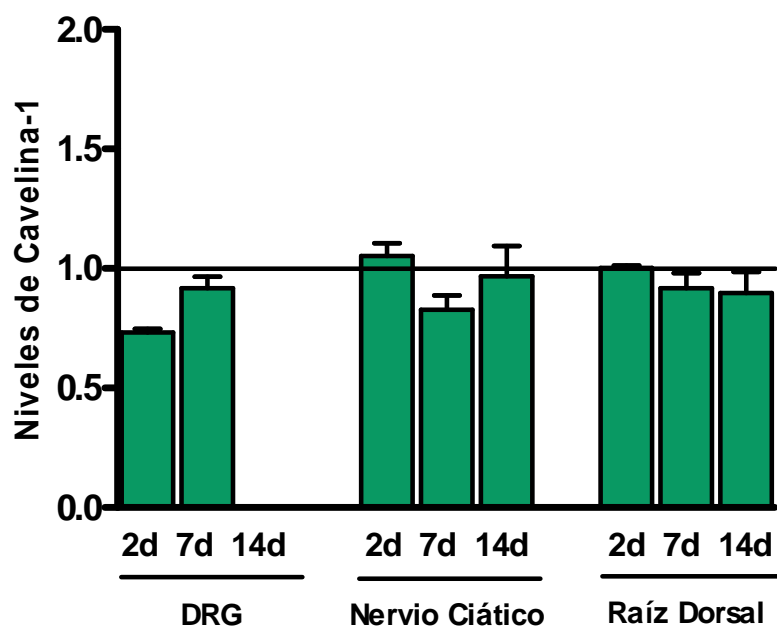
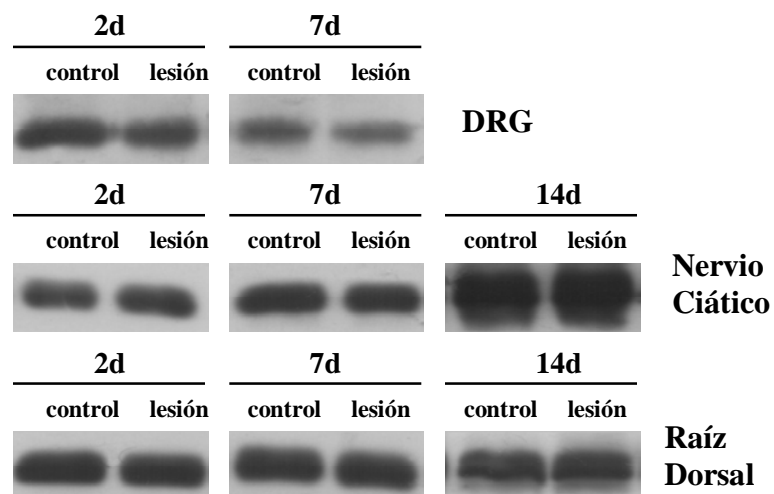


Figura 6.4- Niveles de Caveolina-1 detectados por Western blot. Representativas imágenes de Western blot se muestran arriba. La cuantificación el gráfico abajo, relativizada a los niveles del control (indicados por la línea horizontal). Se representa la media \pm S.E.M de tres cuantificaciones independientes. Se realizó un ANOVA de una vía para ver las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$ (*). Para la cuantificación se utilizó el programa ImageJ (NIH) y se graficó utilizando el GraphPad Prism.

Analizamos la expresión de esta palmitoil-proteína en nuestro sistema de regeneración y observamos que los niveles de expresión de la proteína no se ven modificados por la lesión del nervio ciático (Figura 6.4). Las pequeñas variaciones no resultan de significancia estadística cuando las analizamos. No obtuvimos diferencias significativas en ninguna de las regiones analizadas como los ganglios de las raíces

dorsales (DRG), las raíces dorsales y en el nervio ciático. Sin embargo solo analizamos la isoforma caveolina-1 por ser una palmitoil-proteína y era el que disponíamos en ese momento. Si hubiésemos analizado todas las isoformas de caveolina, podríamos haber visto diferencias en esta isoforma como había observado el grupo de Galbiati en otro sistema como células PC12 o neuronas ganglionares embrionarias (Galbiati et al., 1998). Podemos concluir con este ensayo que mediante la técnica de Western blot no se detectaron diferencias importantes en la expresión de la proteína caveolina-1 luego de la lesión del nervio ciático (Figura 6.4).

6.2.4. Expresión de las tirosinas quinasas *fyn* y *lyn*

Otro grupo de proteínas de señalización que están altamente expresadas dentro del sistema nervioso es la familia de proteínas src (SFKs). Previamente se había observado que la expresión de la proteína src (pp60-c-src) en el pollo se incrementaba ante la injuria del nervio ciático. Esta proteína era inducida tanto en neuronas motoras como sensoriales cuyos cuerpos celulares se localizaban en la medula espinal y en los ganglios de la raíz dorsal (Ignelzi, Jr. et al., 1992).

Más adelante también el grupo de Zhao y colaboradores observó que la axotomía ciática inducía la sobreexpresión de la forma activa de la quinasa src, que incluía las formas c-src y c-fyn. Este incremento fue relacionado con el recrecimiento axonal, la respuesta de las células Schwann y el contacto del axón de las células de Schwann para la regeneración del nervio periférico (Zhao et al., 2003). Por otra parte estudios in vitro relacionaron a la familia de quinasa src con el crecimiento de neuritas en respuesta a NGF en sustrato como laminina por el grupo de Tucker y colaboradores (Tucker et al., 2008).

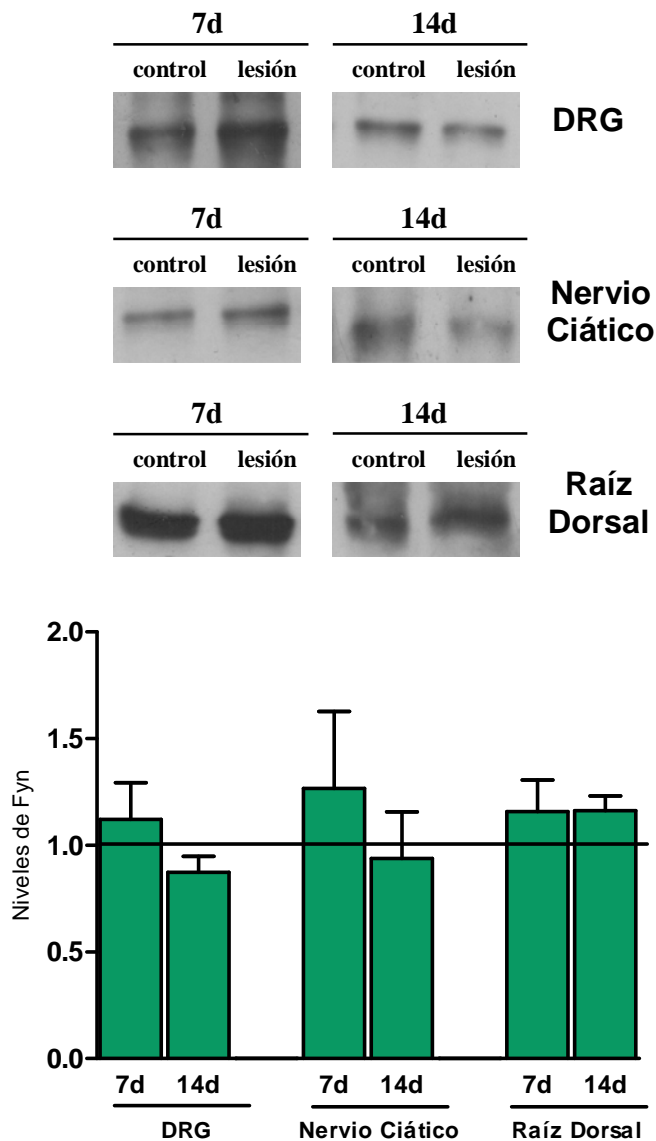


Figura 6.5- Niveles de fyn detectados por Western blot. Representativas imágenes de los Western blot se muestran arriba. La cuantificación se muestra en el gráfico de abajo, relativizada a los niveles de la proteína en el lado control (indicados por la línea horizontal). Se representa la media \pm S.E.M de tres cuantificaciones independientes. Se realizó un ANOVA de una vía para ver las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$ (*).

Centramos nuestro interés principalmente en dos miembros de esta familia fyn y lyn, aunque esta familia posee otros miembros importantes como src o yes. La elección de la quinasa fyn se basó en los resultados previos del capítulo 3 donde pudimos ver que la proteína era translocada a DRMs ante el estímulo del dbAMPC. Además esta proteína es una palmitoil-proteína cuya acilación permite una rápida asociación a la membrana

plasmática y un posicionamiento dentro de los dominios resistentes a detergentes (van't and Resh, 1997; van't and Resh, 1999). Esta característica nos permite en parte analizar el rol de la palmitoilación dentro de la regeneración del sistema nervioso y más adelante analizar su estado lipídico y ubicación submembranal. Con la proteína lyn, otra palmitoil-proteína, no habíamos obtenido resultados positivos en el capítulo 3 pero sin embargo decidimos seguir trabajando con ella debido a su cercana relación con la proteína quinasa fyn y su condición de palmitoil-proteína.

Como resultado de nuestro trabajo con estas dos proteínas en nuestro sistema de lesión del nervio ciático y detección de los niveles de proteína por Western blot, pudimos ver algunas diferencias en los niveles de expresión. Fueron analizadas distintas zonas anatómicas como nervio ciático, ganglio de la raíz dorsal (DRG) y raíz dorsal, a diferentes tiempos de 7 y 14 días post-lesión (Figura 6.5 y 6.6).

Cuando analizamos la expresión de la proteína quinasa fyn esta no muestra diferencias significativas en su expresión luego de la injuria del nervio ciático. En los ganglios de la raíz dorsal la proteína tiene un aumento muy leve en los niveles de esta proteína a los 7 días y disminuye a los 14 días, sin embargo estos cambios no son significativos estadísticamente. En las raíces dorsales la lesión no induce la expresión de la proteína manteniéndose los niveles a los 7 como a los 14 días post-operatorios. En el nervio ciático no se observan diferencias significativas ni a 7 ni 14 días post-lesión (Figura 6.5).

Luego analizamos la proteína quinasa lyn en nuestro modelo de lesión y pudimos observar un aumento en su expresión en algunas de las regiones analizadas luego de la injuria en el nervio ciático a 7 y 14 días post-lesión. Por ejemplo en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) los niveles de la proteína se mantienen constantes a lo largo de los 7 y 14 días post-lesión analizados. Sin embargo se puede observar en el gráfico (Figura 6.6) un leve aumento de los niveles pero sin significancia estadística. En las raíces dorsales la lesión no induce la expresión de la proteína a los 7 o 14 días luego de la lesión. En cambio solo en el nervio ciático se observa un aumento significativo de la proteína a los 7 y 14 días (Figura 6.5). Este aumento es gradual en el tiempo logrando una mayor expresión de la quinasa lyn a los 14 días post-lesión.

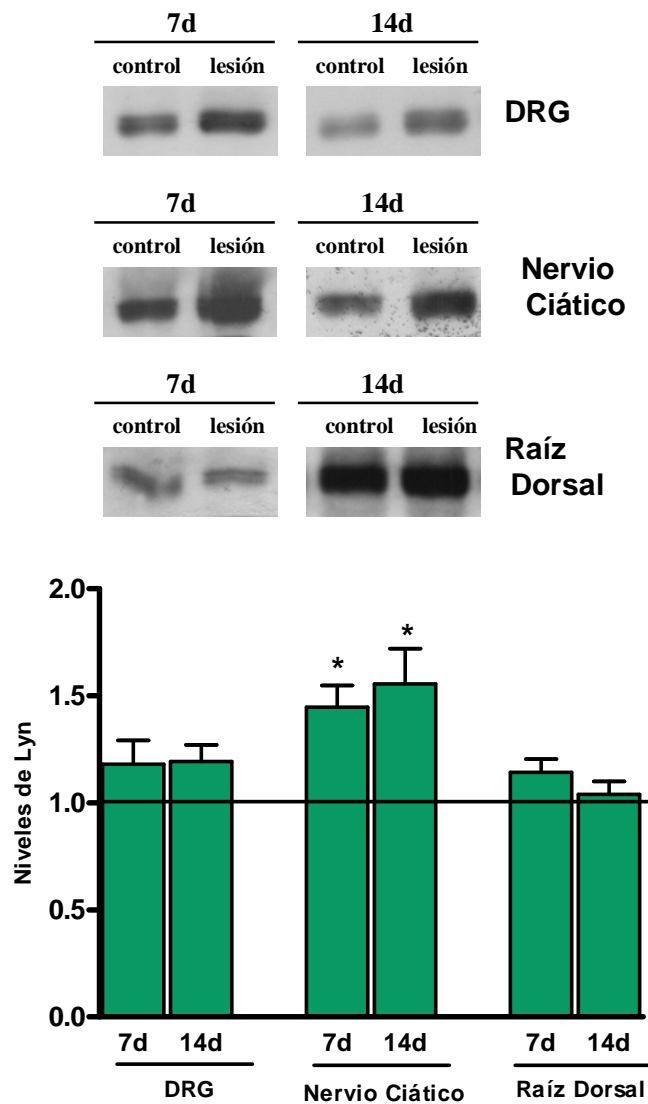


Figura 6.6- Niveles de lyn detectados por Western blot. Representativas imágenes de los Western blot se muestran arriba. La cuantificación se graficó abajo, relativizada a los niveles de la proteína en el lado control (indicados por la línea horizontal). Se representa la media \pm S.E.M de tres cuantificaciones independientes. Se realizó un ANOVA de una vía para ver las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$ (*). Para la cuantificación se utilizó el programa ImageJ (NIH) y se graficó utilizando el GraphPad Prism.

6.2.5. Expresión de la proteína Thy-1

Una proteína muy interesante para analizar era Thy-1, ya que varios trabajos le adjudican una función inhibitoria del crecimiento neuronal. Tiveron y colaboradores observaron una inhibición del crecimiento de neuritas sobre el sustrato de astrocitos maduros (Tiveron et al., 1992). Otro grupo obtuvo resultados similares (Mahanthappa and Patterson, 1992a; Mahanthappa and Patterson, 1992b) observando que tanto la remoción como el “crosslinking” de la proteína Thy-1 en la superficie de neuronas primarias o células PC12 desencadenaba la diferenciación neuronal y el crecimiento de neuritas. Esta inhibición también fue descrita en sistemas de cultivos de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) (Chen et al., 2005).

En astrocitos se ha descrito como receptor celular para Thy-1 a la integrina $\alpha_v\beta_3$, dicha interacción produce una señalización bidireccional de activación de moléculas en ambas células interactuantes (Hermosilla et al., 2008). Por ser Thy-1 una proteína anclada a membrana por glicolípidos (ancla GPI) necesita la interacción con proteínas de señalización intracelulares para llevar a cabo su función. Thy-1 se localiza principalmente en dominios lipídicos o rafts de la membrana y es allí donde interacciona con distintas proteínas adaptadoras y de señalización. Uno de los complejos muy bien caracterizados es el formado con las proteínas miembros de la familia src (SFKs) entre ellas proteínas palmitoiladas fyn y lyn que analizamos en la sección anterior (Chen et al., 2006a; Henke et al., 1997; Shenoy-Scaria et al., 1992)

Con estos antecedentes nos preguntamos si Thy-1 está presente en neuronas del DRG adulto después de la axotomía y su receptor la integrina $\alpha_v\beta_3$ esta presente en los astrocitos de la zona de entrada de la raíz dorsal ZERD. Para comprobar esta hipótesis decidimos analizar los niveles de expresión de Thy-1 en las distintas áreas anatómicas del modelo de lesión periférica (ganglios de la raíz dorsal, raíz dorsal y nervio ciático).

Pudimos observar un aumento significativo de esta proteína en el nervio ciático a partir de los 7 días post-lesión llegando hasta un máximo a los 14 días. La expresión de esta proteína es significativamente, tanto a los 7 días como a los 14 días post-lesión llegando a los 14 días a ser cinco veces mayor al lado control. No hubo diferencias con el lado control no lesionado en las otras regiones analizadas como el DRG o las raíces dorsales, ni a los 7 ni a 14 días post-lesión (Figura 6.7).

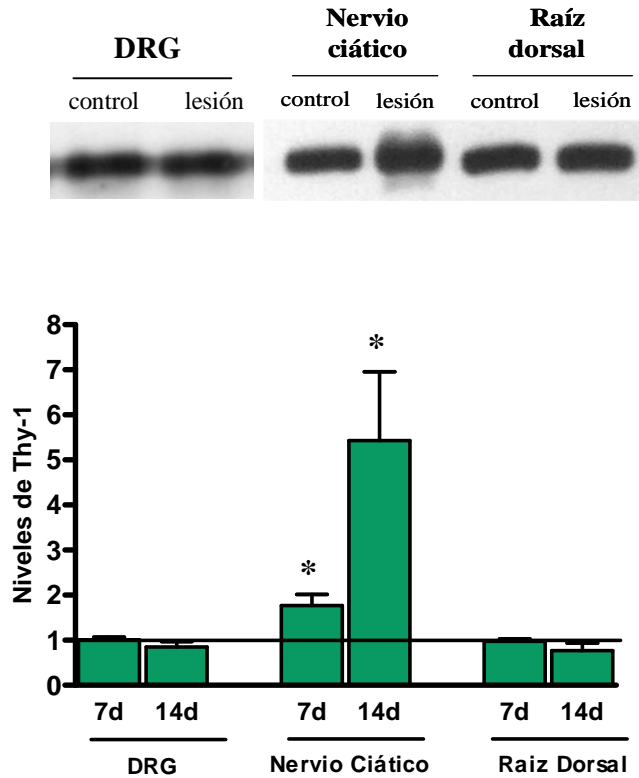


Figura 6.7- Niveles de Thy-1 detectados por Western blot. Representativas imágenes de Western blot a los 14 días se muestran arriba. La cuantificación se graficó abajo y los niveles de expresión de la proteína fue relativizada a los niveles del control (indicados por la línea horizontal). Se realizó un ANOVA de una vía para ver las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$ (*). Se representa la media \pm S.E.M de tres cuantificaciones independientes. Para la cuantificación se utilizó el programa ImageJ (NIH) y se graficó utilizando el GraphPad Prism.

En este trabajo pudimos ver como la proteína inhibitoria del crecimiento neuronal Thy-1 se acumula periféricamente en el nervio ciático lesionado, pero no así centralmente luego de la lesión del mismo. Sin embargo, debido a la técnica utilizada no pudimos identificar las células que están expresando Thy-1. Por lo tanto este aumento también podría deberse a un incremento en la infiltración de leucocitos, dado que estas células expresan Thy-1 en su superficie. Por otro lado algunos trabajos encontraron disminuciones significativas de la proteína entre los 2 y 7 días post-lesión (Chen et al., 2005), nosotros no analizamos las muestras a los dos días pero a los 7 días no obtuvimos esa disminución de la expresión.

6.2.6 Expresión de $\alpha_v\beta_3$ -integrina

Analizando el resultado anterior donde observamos la expresión de la proteína Thy-1 quisimos saber si además se encontraba su receptor en astrocitos la integrina $\alpha_v\beta_3$. Para ello analizamos por Western blot la presencia de la contraparte conocida la integrina $\alpha_v\beta_3$ en la raíz dorsal (Hermosilla et al., 2008; Leyton et al., 2001). Encontramos expresión de las subunidades de la integrina $\alpha_v\beta_3$ en los astrocitos de la raíz dorsal, indistintamente si hubo o no lesión del nervio ciático (Figura 6.8). Por esta técnica de detección no pudimos observar diferencias en la expresión de ninguna de las cadenas de esta integrina.

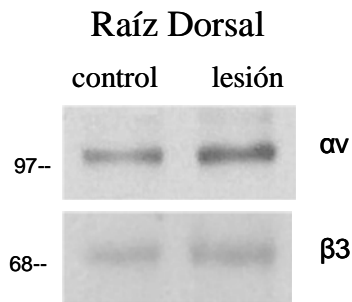


Figura 6.8- Western blot de la integrina $\alpha_v\beta_3$. Se realizó la detección por la técnica de Western blot de las subunidades de la integrina α_v y β_3 en las raíces dorsales tanto del lado del nervio ciático lesionado como del lado control.

6.2.7. Co-localización de la integrina β_3 con Thy-1 en el ZERD.

Dada la importancia de las moléculas de adhesión celular en el reconocimiento entre células, nosotros decidimos estudiar la distribución de dichas proteínas en neuronas y astrocitos de la médula espinal en ratas adultas que han sufrido una lesión unilateral del nervio ciático. Usando anticuerpos específicos contra las proteínas de adhesión Thy-1 y la subunidad β_3 de integrina con técnicas de inmunofluorescencia, pudimos visualizar a nivel celular la distribución anatómica de estas proteínas, que son capaces de interactuar en sistemas *in vitro*.

Efecto de la axotomía en la localización de Thy-1 en médula espinal, DRGs y nervios periféricos.

Como ya mencionamos en secciones anteriores la proteína Thy-1 se expresa principalmente en nervios del SNP y axones del SNC maduro, y no así durante el desarrollo embrionario (Chen et al., 2005; Rege and Hagood, 2006b). Cuando analizamos la localización de esta proteína en nuestro sistema de lesión periférica en adultos podemos ver que Thy-1 está presente en médula espinal. En una sección transversal de la medula se observa una señal fuerte de Thy-1 en la materia blanca la cual corresponde a los tractos axonales ascendentes y descendentes. La región de la materia gris donde están los cuerpos neuronales presenta una señal débil de Thy-1. Esta distribución era la esperada ya que la zona ZERD (zona de entrada a la raíz dorsal) se ubica en la materia blanca y es en ella donde la proteína Thy-1 de las neuronas interacciona con la integrina de los astrocitos presentes en el ZERD. Pudimos observar a un mayor aumento los axones con un patrón de marcación granulado, característico de Thy-1 (Figura 6.9).

Sin embargo cuando analizamos cuantitativamente ambos lados no observamos diferencias en la materia gris entre el lado lesionado (parte superior de la imagen) y el lado control (parte inferior de la imagen) a los 7 días post-lesión (Figura 6.9). Esto hace suponer que Thy-1 tiene una expresión constitutiva en la medula espinal, que no se ve influenciada por la lesión periférica del nervio ciático.

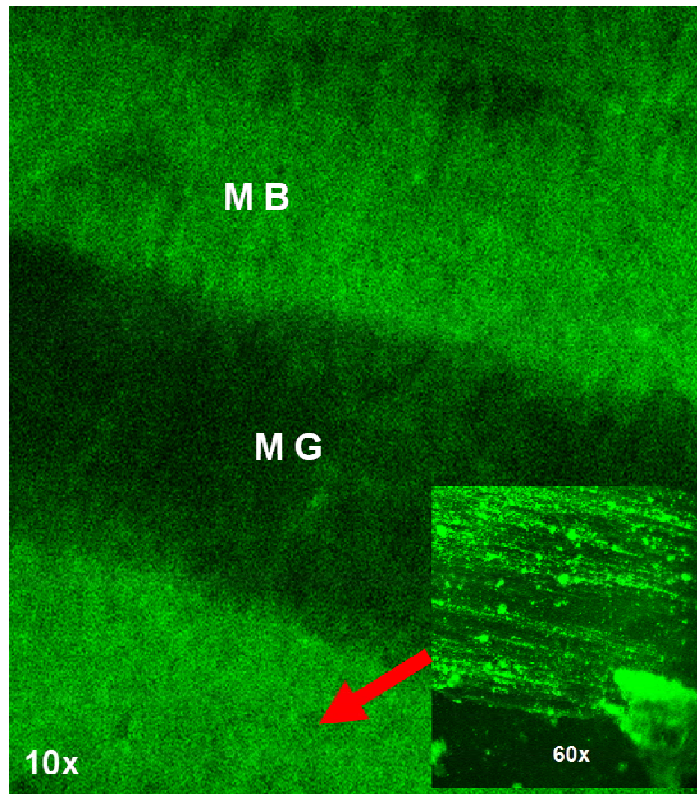


Figura 6.9- Inmunofluorescencia indirecta de Thy-1 en un corte transversal de médula espinal de rata 7 días post-lesión. Se puede ver la diferencia de expresión entre materia gris (MG), donde se encuentran los cuerpos neuronales, y materia blanca (MB) donde se encuentran los tractos axonales ascendentes y descendentes. Inserto: aumento a 60x, pueden verse axones individuales, con un patrón de marcación granulada, característico de Thy-1.

También nos interesó analizar la expresión de Thy-1 en los ganglios de la raíz dorsal (DRGs) tanto en el lado control como en el lesionado, a los 7 días post-lesión. Las imágenes de los ganglios no mostraron una diferencia significativa de la localización de Thy-1, entre los DRGs a ambos lados de la lesión (Figura 6.10 A y B). Por el contrario, cuando analizamos el nervio ciático puede verse una diferencia entre el nervio sano (Figura 6.10 C) y el lesionado (Figura 6.10 D), Thy-1 se encuentra ligeramente aumentada en su expresión ante la lesión del nervio ciático. Sin embargo como hemos mencionado antes este aumento podría deberse a una infiltración de linfocitos que también expresan la proteína Thy-1 en sus membranas.

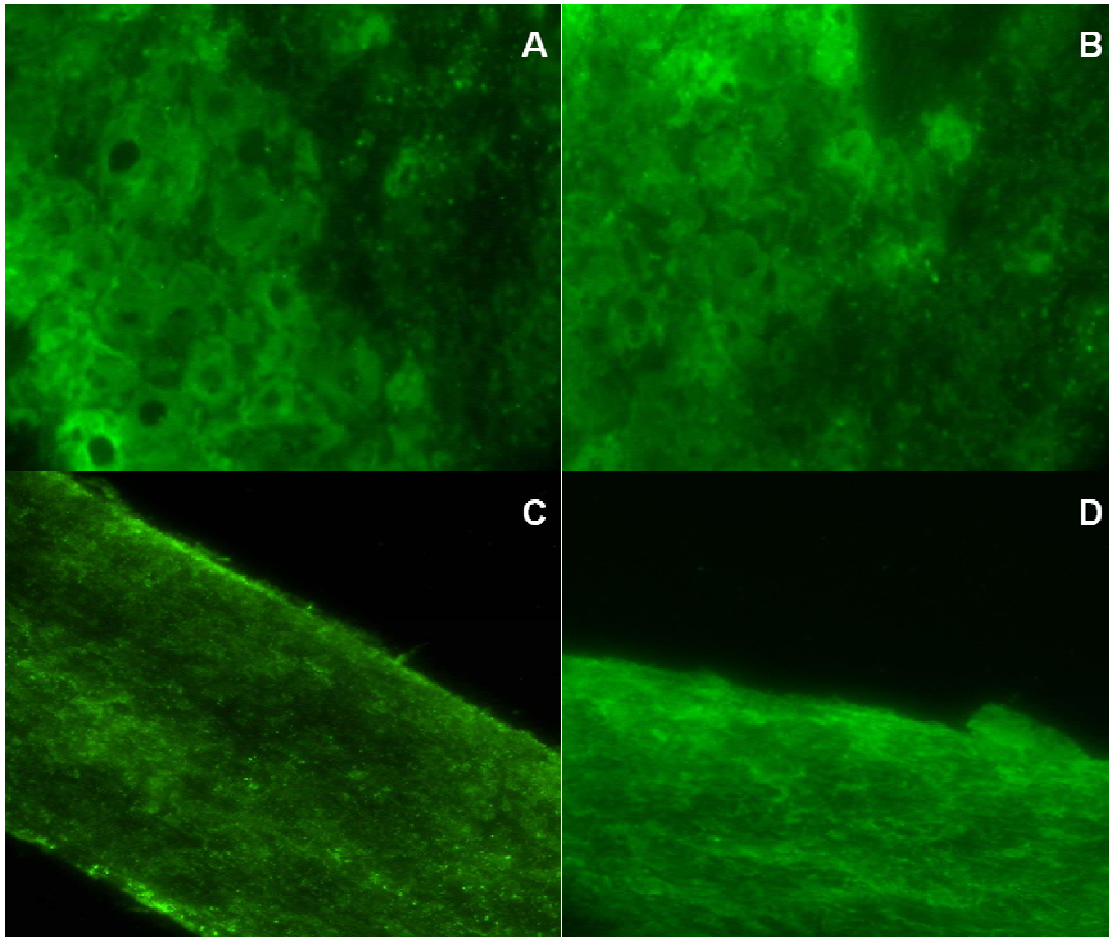


Figura 6.10- Inmunofluorescencia indirecta de Thy-1 tanto en DRG como en nervio ciático. Secciones de DRG, del lado contralateral (A) e ipsilateral (B) a una axonotmésis periférica de nervio ciático, 7 días post-lesión; y secciones de nervio ciático del lado contralateral (C) e ipsilateral (D) a una axonotmésis periférica de nervio ciático, 7 días post-lesión.

Co-localización de la subunidad α_v con GFAP.

La subunidad α_v de integrinas co-localiza parcialmente con el marcador de astrocitos reactivos GFAP en astas dorsales y en la ZERD de la medula espinal, del lado ipsilateral a la lesión, a los 7 días post-lesión. Esta co-localización es parcial, ya que α_v parece localizarse sobre otros tipos celulares, además de su marcación astrocítica. GFAP presenta una apariencia granulosa lo cual da indicios de que está compartimentalizada. En cambio la subunidad α_v de integrina parece distribuida más uniformemente sobre la superficie celular (Figura 6.11).

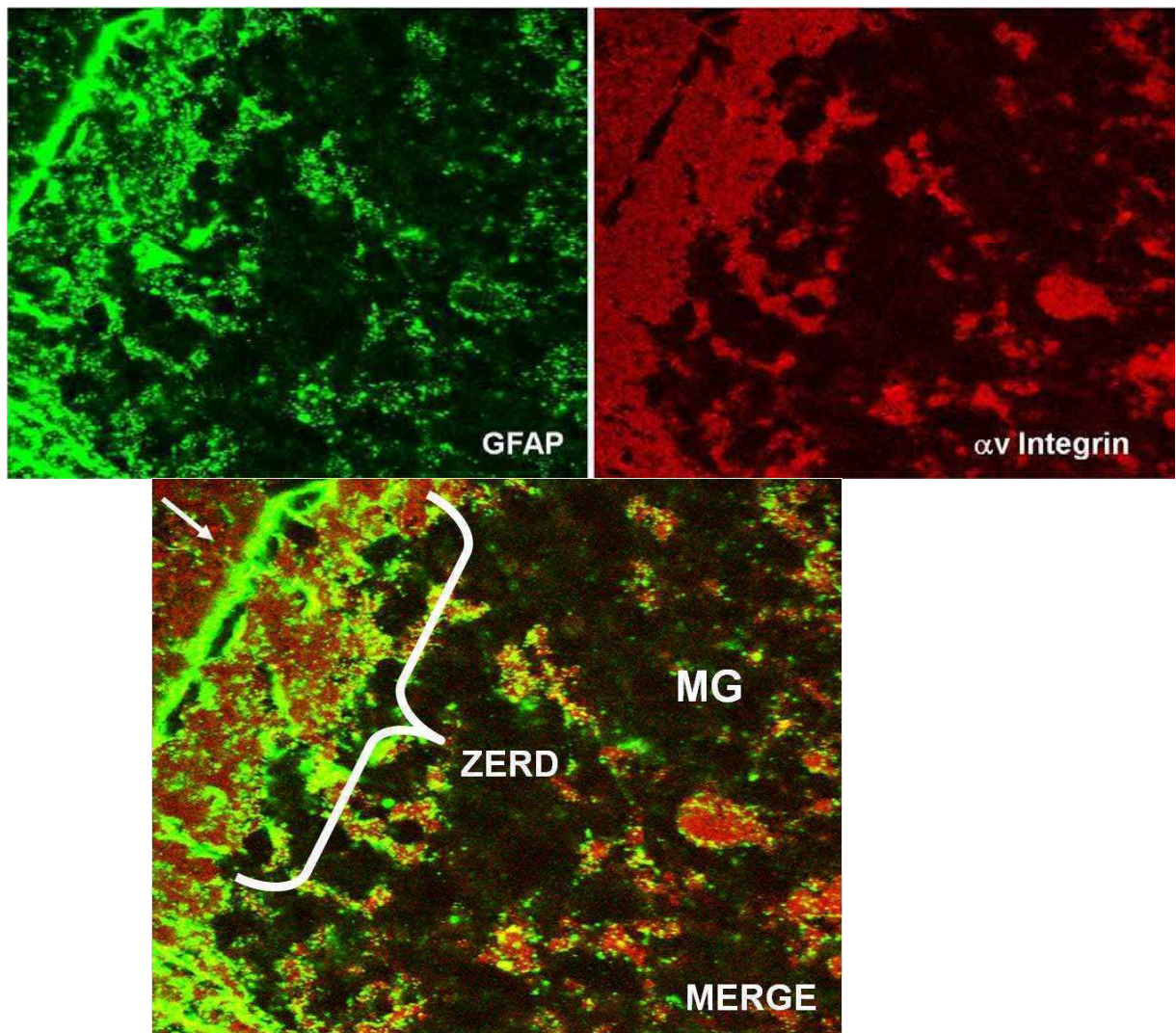


Figura 6.11.- Inmunofluorescencia indirecta de GFAP y subunidad α_v de integrina, en cortes transversales de médula espinal 7 días post-lesión. En la figura de arriba a la izquierda de muestra la localización de GFAP en (verde) y a la derecha α_v integrina (rojo) en el lado ipsilateral a la lesión. En la figura de abajo se ilustra la co-localización de ambas proteínas (amarillo). Esta co-distribución incluye la zona más superficial del asta dorsal (flecha), donde se encuentran los astrocitos inhibitorios del crecimiento axonal (MG: materia gris, ZERD: zona de entrada de la raíz dorsal). Imagen 60x.

Co-localización de la subunidad β_3 con GFAP.

Al igual que α_v , la subunidad β_3 de integrina también se distribuye parcialmente junto con GFAP en la ZERD (Figura 6.12). Esta distribución es muy parecida a la observada en la figura 6.11, entre α_v integrina y GFAP. En la figura 6.12 puede verse la zona de entrada de la raíz dorsal (ZERD) del lado ipsilateral a la lesión, 7 días post-lesión, donde se observa la co-localización de las dos proteínas. Igual que antes con la

subunidad α_v , la subunidad β_3 parece más ampliamente distribuida sobre todo el asta dorsal que GFAP, que se encuentra principalmente en el límite de la ZERD.

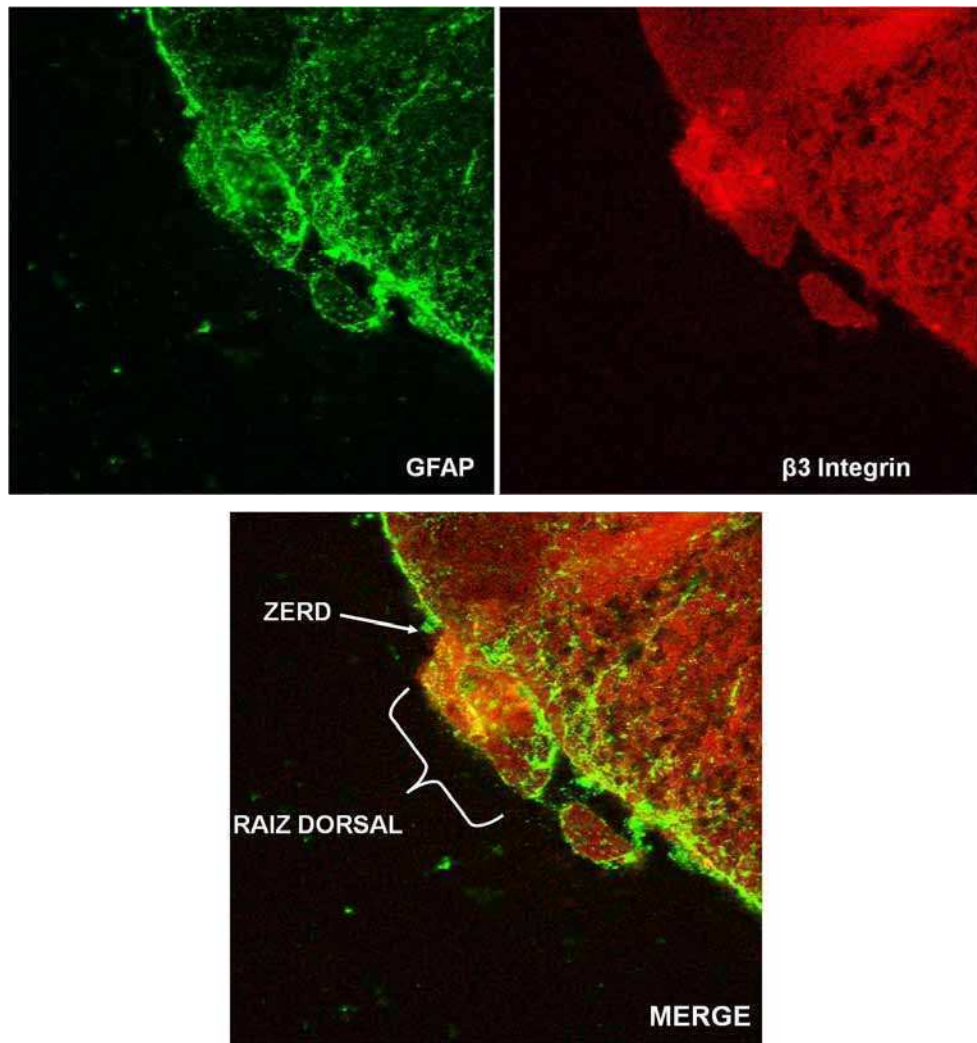


Figura 6.12- Inmunofluorescencia indirecta de GFAP y subunidad β_3 de integrina en cortes transversales de la medula espinal 7 días post-lesión. En las figuras de arriba se puede observar las inmunofluorescencias individuales de GFAP (verde) y β_3 integrina (rojo), en el asta dorsal, del lado ipsilateral a la lesión. En la figura de abajo se muestra la co-localización de ambas proteínas en color amarillo. (ZERD=zona de entrada de la raíz dorsal). Imagen 60x.

Co-localización de subunidad β_3 con Thy-1.

Como describimos en la sección anterior por la proteína Thy-1 aumenta drásticamente su expresión en el nervio ciático, pero no presenta cambios significativos en su expresión en raíz dorsal ni en el ganglio, luego de una lesión periférica como la axonotmésis del nervio ciático (Figura 6.7). Está bien descrito que Thy-1 interacciona con la integrina $\alpha_v\beta_3$ de astrocitos en cultivo (Avalos et al., 2002; Hermosilla et al., 2008). Para confirmar esta interacción en nuestro sistema realizamos una inmunofluorescencia indirecta de Thy-1 y la subunidad β_3 de la integrina en la zona de entrada de la raíz dorsal (ZERD) (Figura 6.13).

Nosotros pudimos observar que la subunidad β_3 co-localiza con Thy-1 en la zona más externa de la zona ZERD, donde Thy-1 se localiza en su mayoría sobre el límite del asta dorsal, pero es muy leve la señal en el centro del asta, a diferencia de β_3 , que está ampliamente distribuída por toda la materia gris (Figura 6.13).

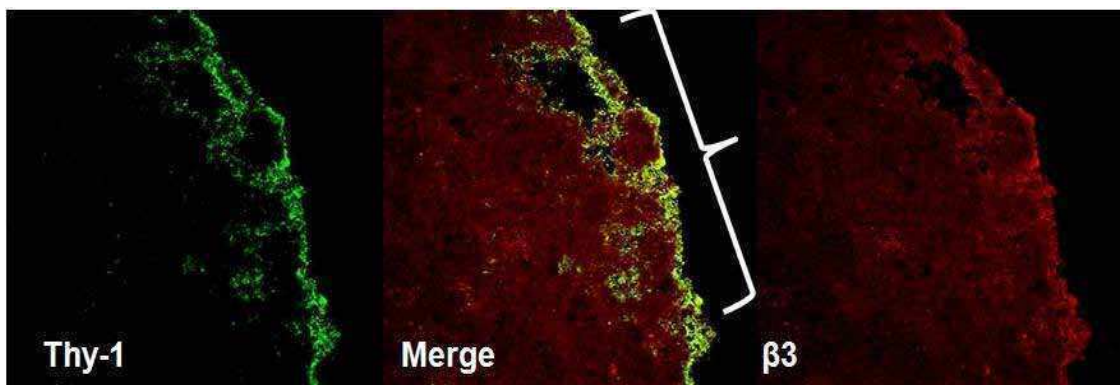


Figura 6.13- Inmunofluorescencia indirecta doble Thy-1 y la integrina β_3 de la zona de entrada (ZERD). Se marcan Thy-1 (verde) y la subunidad β_3 de integrina (rojo), en cortes medulares transversales, del lado ipsilateral al sitio de la lesión, 7 días post-lesión. En la imagen se ve la distribución de estas dos proteínas, mientras que β_3 se localiza sobre toda el asta dorsal, Thy-1 solo se localiza sobre el borde externo de la ZERD, pero no dentro del asta dorsal. Imagen 60x.

6.3. Conclusiones generales del capítulo 6

La axotomía periférica es un tratamiento conocido por aumentar la capacidad regenerativa de las proyecciones centrales del DRG, esta induce la expresión de varias proteínas relacionadas con el crecimiento que son transportadas centralmente luego de la injuria. En el capítulo analizamos la expresión de varias proteínas relacionadas con el crecimiento y la regeneración neuronal. Entre las proteínas analizadas estuvo la proteína GAP-43 de muy conocida función en el crecimiento y regeneración axonal. Pudimos ver en nuestro sistema que dicha proteína se encontraba inducida diferencialmente luego de la lesión en el DRG, raíz dorsal y en el nervio ciático.

También analizamos otras proteínas involucradas en la función sináptica como SNAP-25. A pesar que esta proteína ha sido descripta como marcadora de daño presináptico en nuestro modelo no obtuvimos diferencias en la expresión de la misma luego de la injuria (Patanow et al., 1997).

Otro grupo de proteínas importantes fueron las caveolinas de las cuales solo analizamos caveolina-1, que era la isoforma para la cual disponíamos de anticuerpo. Esperábamos poder ver diferencias en la expresión de esta isoforma de la proteína ya que con anterioridad otro grupo había descripto la inducción de caveolina-2 en respuesta a la injuria en células PC12 (Galbiati et al., 1998).

El grupo de proteínas de señalización Src quinasa (SKs) eran otras de nuestras proteínas candidatas al análisis. Estudiamos a dos de sus miembros fyn y lyn. Con la proteína fyn no pudimos observar diferencias en su expresión ante la lesión periférica. Sin embargo cuando analizamos la expresión de la proteína lyn pudimos ver diferencias significativas ante el estímulo de la lesión periférica. Dicha inducción se mantuvo durante los 7 días hasta los 14 días post-lesión en el nervio ciático.

Por otro lado observamos que la proteína inhibitoria del crecimiento Thy-1 se encuentra aumentada diferencialmente del lado lesionado en el nervio ciático luego de los 7 y 14 días post-lesión. Estos cambios no se observan a nivel central ya sea de las raíces o del DRG. Esto podría deberse a la infiltración de linfocitos T en la zona de lesión, los cuales también expresan Thy-1.

Encontramos que la integrina $\alpha_v\beta_3$ está presente en la raíz dorsal, lo cual puede contribuir a la inhibición del crecimiento en la zona ZERD luego de la axotomía. La subunidad β_3 de la integrina se encuentra expresada mayoritariamente en la materia gris medular. Los resultados de las inmunofluorescencias comprueban que la interacción

entre Thy-1 neuronal y β_3 integrina astrocítica está presente en nuestro sistema. Se ha sugerido esta interacción como importante en la regeneración. Tanto Thy-1 como la subunidad β_3 se encuentran en las raíces dorsales de ratas adultas. La expresión de Thy-1 no se pierde después de axotomía periférica, es decir la regeneración no repite lo que ocurre en el desarrollo donde la proteína Thy-1 es escasa o nula.

Por otro lado pudimos ver en nuestro trabajo que la integrina $\alpha_v\beta_3$ se mantiene ó aumenta su presencia en la medula espinal y la raíz dorsal, luego de la axotomía periférica. La presencia simultánea de estos dos receptores podría explicar en parte la falla de regeneración en la ZERD. La subunidad β_3 integrina muestra una clara colocalización en la ZERD, con la proteína GFAP (Figura 6.12). El asta dorsal, más precisamente en la ZERD, es el lugar en el cual los nervios sensoriales en proceso de regeneración hacen contacto con los astrocitos que inhiben su crecimiento, por lo tanto, sería razonable pensar que la interacción molecular entre Thy-1 y $\alpha_v\beta_3$ integrina podría contribuir a la inhibición o limitación de la regeneración (Figura 6.13). Los análisis de Thy-1 o $\alpha_v\beta_3$ integrina (luego de una axotomía periférica, en el DRG y la raíz dorsal), obtenidos por Western Blot, no mostraron ninguna pérdida o aumento significativo en la expresión de estas proteínas (Figuras 6.7 y 6.8), a diferencia de un trabajo anterior, en el cual se muestra que la expresión de Thy-1 varía en los DRG's (Chen et al., 2005). El hecho de que la integrina $\alpha_v\beta_3$ no aumente luego de una lesión puede deberse a que en realidad el nivel de expresión no sea dependiente del proceso lesivo.

CAPÍTULO 7

Conclusiones generales

Hace varias décadas la modificación covalente de S-palmitoilación ha sido asociada con la translocación de proteínas hacia la membrana plasmática. No obstante en los siguientes años de investigación el papel celular y funcional de S-palmitoilación ha sido, y sigue siendo, en gran parte un misterio. En particular, la presencia frecuente de dicha modificación en proteínas transmembranales como, por ejemplo, muchos socios de la familia de receptores serpentina, va en contra de un papel simple en unir proteínas a la membrana. Para iluminar este campo oscuro de la lipidación de proteínas, nosotros hemos usado una combinación de técnicas con el fin de analizar el proceso de palmitoilación en el contexto de compartimentalización de un pequeño grupo de proteínas importantes para la función neuronal, siempre tratando de mantener el contexto fisiológico de crecimiento axonal y plasticidad sináptica.

En el tercer capítulo pudimos identificar dos proteínas palmitoiladas, GAP-43 y fyn, cuya ubicación submembranal era modificada en respuesta a estímulos extracelulares e intracelulares relacionados con el crecimiento y regeneración de neuronas. Por sus patrones de expresión, ambas proteínas han sido implicadas previamente en los procesos de extensión axonal y neurotransmisión. Esta relación se puede ver en los resultados del capítulo 6, a donde la inducción de GAP-43 luego de una axotomía ciática está acompañado con su transporte hacia las ramas periféricas, en donde se produce la lesión. Pero también a nivel central, produciendo un aumento en la plasticidad y capacidad regenerativa de la médula espinal. Aunque los factores de crecimiento en general y la trombina han sido descritos como capaces de modificar la palmitoilación de proteínas, la regulación dinámica del proceso no ha sido descrito en la literatura para GAP-43 y fyn. En capítulo 4 están resumidos nuestros intentos a corroborar que la translocación de las proteínas está relacionada con su estado de palmitoilación. Enfrentando los problemas técnicos para mostrar esta relación, pusimos en marcha una técnica alternativa con las ventajas de rapidez de resultados y la capacidad de medir el estado cuantitativo de palmitoilación. Esta técnica nos dará la capacidad de asociar la translocación hacia rafts de las palmitoil-proteínas y oportunidades de aplicaciones nuevas descritas más adelante.

Tanto la proteína GAP-43 como la quinasa fyn son proteínas palmitoiladas, esta modificación postraduccional es dinámica y regulada por estímulos. Nosotros no podemos afirmar que el aumento de proteínas en los dominios resistentes a detergentes sea debido a un mayor estado de palmitoilación en las proteínas. Sin embargo varios

trabajos han adjudicado a esta modificación la propiedad de ubicar a las proteínas en estos dominios DRMs (Milligan et al., 1995; Uittenbogaard and Smart, 2000).

Para poder analizar el estado de palmitoilación de una proteína ante un estímulo en nuestro segundo capítulo optimizamos la detección de palmitoil-proteínas por el novedoso método de intercambio de ácido graso (ABE). Esta técnica nos permitió analizar el estado de palmitoilación de una proteína pura como la BSA. Nuestra perspectiva a futuro es poder detectar los niveles de palmitoilación de las proteínas dentro y fuera de los DRMs, cuando los sinaptosomas son tratados con distintos estímulos celulares.

De manera complementaria quisimos analizar de la asociación de las palmitoil-proteínas a membranas desde un enfoque físico controlado. Optamos por trabajar con sistemas de membranas *in vitro* (liposomas unilamelares, LUVs) y la proteína GAP-43, por disponibilidad de herramientas para su expresión, purificación y palmitoilación *in vitro* (capítulo 4). Las mismas se pueden aplicar en el futuro a las tirosina quinasas fyn y lyn, u otras proteínas, para su comparación con GAP-43. La ventaja de utilizar liposomas es que de la composición lipídica de los mismos es definida, pudiéndose analizar las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas lípido-proteína de una manera más controlada (capítulo 5). De estos ensayos logramos ver una asociación diferencial de la GAP-43 a liposomas con distintos estado de ordenamiento, correspondientes a estados diferentes que se encuentran en células vivas, observando una mayor asociación con los estados ordenados.

A su vez cuando la proteína estaba palmitoilada la asociación a sistemas líquido ordenado era muy elevada, llegando al 80% de asociación. El hecho que GAP-43 se asocie a las membranas sin palmitoilación puede ser relacionado con las observaciones de su distribución en gradientes de sacarosa, mostrado en capítulo 3. Por otra parte de su presencia en rafts, definidos por la distribución de Thy-1 en el gradiente, y en la fase citoplasmática en el fondo del gradiente, GAP-43 y varias proteínas muestran a veces una distribución intermedia en los gradientes. No esta claro a que fase física corresponde esta distribución, pero nos interesa la observación que rafts de conos de crecimiento y de sinaptosomas tienen una distribución diferente en los gradientes (Patterson, 2002). Este fenómeno se puede ver también con la distribución de Thy-1 después de tratamiento con NGF (Fig. 3.1) lo cual nos hace pensar ¿Hay remodelación de la estructura lipídica de los rafts? ¿Puede ser que las fases intermedias representen otros tipos de dominios submembranales que ocurren en los sinaptosomas? ¿Es posible que la asociación de

GAP-43 con dichos dominios fuera regulada por otra modificación como la fosforilación? Estas son preguntas de profundas implicancias fisiológicas que esperamos enfrentar con las herramientas que hemos desarrollado en el trabajo presentado.

Cuando analizamos por EPR la asociación de la proteína sin palmitoilar a liposomas pudimos ver que esta proteína se asocia muy débilmente a la membrana, por lo tanto podemos decir que el extremo amino interacciona superficialmente con ella a través de interacciones electrostáticas. No observamos que el extremo amino donde se encontraba la marca (Cys 3 y 4) se asociase con la membrana de una manera fuerte a través de la incorporación de la proteína dentro de la membrana. A partir de los resultados y conclusiones de esta parte del trabajo de tesis surgen las siguientes consideraciones para futuras investigaciones acerca de la interacción de GAP-43 con membranas, su segregación en dominios lipídicos y las implicancias de ello en las funciones de la proteína en las neuronas. Proponemos generar una serie de proteínas mutantes, mediante técnicas de ADN recombinante, para reemplazar los residuos originales por cisteínas y poder incorporar el marcador de espín MT en distintos sitios de interés en la proteína, como por ejemplo el dominio efector, y de esta manera detectar cambios conformacionales que permitan estudiar la interacción de GAP-43 con membranas.

Finalmente mediante el modelo de lesión del nervio ciático analizamos la expresión de proteínas palmitoiladas como GAP-43, fyn, lyn, SNAP-25 o caveolina-1 en el contexto de la injuria y recuperación en el sistema nervioso. Junto con eso, hicimos el análisis de la proteína glicosilada Thy-1 por dos razones: (1) la posibilidad de un rol de una interacción entre Thy-1 en neuronas y $\alpha_v\beta_3$ -integrina en astrocitos en el ZERD en inhibir la regeneración central de axones y, (2) por su ubicación en rafts, nos dará la oportunidad de relacionar los resultados del capítulo 6 con los anteriores de la modificación del estado de palmitoilación y compartimentalización de palmitoil-proteínas después de la axotomía. Pudimos comprobar en nuestro sistema que la proteína GAP-43, la cual era conocida por su inducción ante la lesión, se encontraba localizada diferencialmente luego de la lesión en el DRG, en la raíz dorsal y en el nervio mismo. A su vez encontramos que otras proteínas que mostraban diferencias en su expresión ante el estímulo de lesión periférica. Las proteínas de la familia de las tirosinas quinasas src eran de un interés particular en este contexto, por nuestros resultados anteriores y de otros investigadores (Ignelzi et al., 1992). En un futuro nos planteamos la posibilidad de confirmar las variaciones de las proteínas src y ubicar su expresión dentro de las

diferentes células del sistema nervioso. Además de identificar nuevas palmitoil-proteínas cuya expresión se vea modificada por la lesión periférica con la esperanza de identificar a las proteínas cuya función sea fundamental en la regeneración nerviosa. Cualquier avance en el campo de la regeneración nerviosa abre una esperanza en la terapéutica de la lesión del sistema nervioso central.

Por otro lado observamos que la proteína Thy-1 postulada por varios trabajos como inhibitoria del crecimiento se acumula periféricamente, pero no centralmente luego de la lesión del ciático. Cuando analizamos la expresión de la $\alpha_v\beta_3$ -integrina postulada como receptor de Thy-1 en astrocitos, vimos que está presente en la raíz dorsal. Para una evidencia directa de la interacción de Thy-1 neuronal con la integrina $\alpha_v\beta_3$, esperamos en un futuro poder realizar una triple localización en la ZERD. Esta interacción podría ser una de las responsables de la falla del crecimiento axonal cuando llega a la zona ZERD luego de una lesión a nivel del sistema nervioso central. Por eso tenemos planificado comparar los resultados de la lesión periférica del nervio ciático con una lesión equivalente de las ramas centrales, la rizotomía L4/5 que estamos desarrollando actualmente como modelo experimental en el laboratorio. Con este modelo, podríamos infundir anticuerpos bloqueantes de la interacción Thy-1/ $\alpha_v\beta_3$ -integrina para promover la regeneración.

Como conclusión general de nuestros resultados podemos decir que las proteínas palmitoiladas están presentes en procesos tan importantes como el crecimiento y regeneración neuronal. Su compartimentalización, y posiblemente su palmitoilación, es sensible a estímulos extracelulares y señales intracelulares implicadas en controlar estos procesos fisiológicos. La S-palmitoilación modifica la interacción de la proteína con las membranas artificiales en una manera que podría representar translocación a dominios submembranales en el contexto celular. Todo nuestro trabajo apoya la teoría de la importancia de esta dinámica modificación postraducciona l de proteínas en la señalización de procesos celulares.

Apéndice

Resonancia paramagnética electrónica (EPR)

La EPR es una técnica espectroscópica que detecta electrones desapareados. El principio en el que se basa la técnica es la separación de niveles de energía asociados al momento magnético del espín electrónico por la interacción con un campo magnético aplicado. La muestra es irradiada con ondas electromagnéticas y si la energía de los fotones corresponde a la separación de niveles producida por el campo magnético externo se produce absorción resonante. La señal detectada aparece como la derivada del espectro de absorción (Campbell and Dwek, 1984).

Cuando se quieren investigar moléculas que no son paramagnéticas y por lo tanto, no tienen señales intrínsecas de EPR, se utilizan marcadores de espín. Los marcadores de espín son radicales libres, estables y sintéticos, cuya utilización ha permitido que la técnica de EPR sea aplicada a un amplio rango de sistemas (Berliner and Reuben J., 1989; Griffith and Jost, 1976). En particular los marcadores liposolubles permiten utilizar la espectroscopia de EPR para censar el orden conformacional a distintas profundidades en la región hidrofóbica de la membrana o sistema modelo. También es de particular utilidad el estudio por EPR de proteína a las cuales se reincorpora un marcador de espín unido de manera covalente a su cadena polipeptídica.

Los marcadores de espín liposolubles son n-doxil-ácido esteárico (n-SASL), donde el radical doxil (4,4-dimetiloxazolidina-N-oxil) reemplaza al carbono **n** de una molécula de ácido esteárico (Figura A.1).

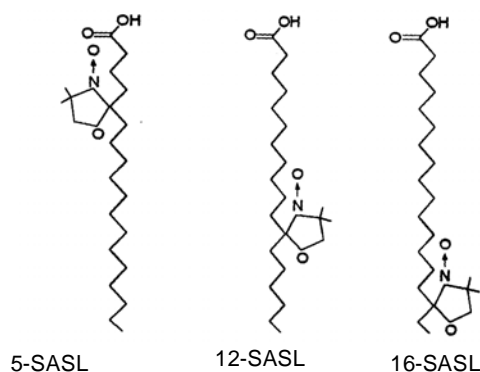


Figura A.1- Estructura de los marcadores de espín liposolubles 5-, 12- y 16-SASL

El marcador se incorpora a las estructuras lipídicas en forma paralela a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, con su extremo carboxilo próximo a las cabezas polares y su distribución lateral en la membrana es homogénea y al azar. Si el radical nitróxido

reemplaza al carbono 5 de la cadena hidrocarbonada del ácido esteárico (n=5), censa la bicapa lipídica en una región próxima a las cabezas polares. Por el contrario, si el radical nitróxido está en las posiciones 12 o 16 se encuentra más sumergido en la bicapa y por lo tanto censa la región hidrofóbica de la membrana. El espectro de EPR que generan está afectado por la interacción entre el electrón desapareado localizado en el orbital 2p del enlace N-O y el núcleo del ^{14}N (de espín nuclear I=1). En consecuencia, el espectro consta de tres líneas de significativa anisotropía debido a que el espín electrónico se encuentra en un orbital tipo p. Esta anisotropía puede ser promediada total o parcialmente debido a movimientos moleculares. Cuando los movimientos son rápidos e isotrópicos (marcador pequeño en medio de baja viscosidad), el espectro consta de tres líneas finas de alturas similares, pero en un estado de no- movimiento el espectro tiene estructuras muy anchas. Entre estos dos extremos existe un régimen intermedio, en el cual el espectro de EPR es sensible a la velocidad y anisotropía del movimiento. Estos efectos son observados en los lípidos constituyentes de membranas. Por ejemplo, el marcador de espín 16-SASL, que censa la región más interna de las estructuras lipídicas, donde los movimientos de las cadenas son menos restringidos, tiene un espectro de líneas más finas que el de 12 o 5-SASL, que están en regiones más inmovilizadas.

A partir de los espectros de estos marcadores se calcula el parámetro de orden aparente, S_{app} (Cassera et al., 2002; Griffith and Jost, 1976). El S_{app} puede variar entre 0 y 1, donde un valor de $S_{app}=1$ indicaría un estado de ordenamiento máximo de las cadenas acílicas, es decir las cadenas están perfectamente estiradas y empaquetadas, mientras que $S_{app}=0$ indicaría que las cadenas se encuentran totalmente desordenadas.

Los valores del S_{app} se calculan a partir de los espectros de EPR según la ecuación A.1, donde $A_{//}$ y A_{\perp} se determinan como se muestra en la figura A.2.

$$S_{app} = \frac{(A_{//} - A_{\perp})}{[A_{ZZ} - \frac{1}{2}(A_{XX} + A_{YY})]} \quad \text{Ecuación A.1}$$

A_{XX} , A_{YY} y A_{ZZ} son parámetros conocidos para los SASL (Griffith and Jost, 1976) y los valores correspondientes son: $A_{XX} = 5.9$ G, $A_{YY} = 5.4$ G, $A_{ZZ} = 32.9$ G. Las gráficas de S_{app} en función de la posición del radical nitróxido son llamadas “Gradientes de Flexibilidad”. Estas representan el perfil de profundidad en la membrana y muestran como el S_{app} disminuye a medida que el marcador se localiza más profundo. Este tipo de

figuras es característico de estructuras de membrana (Cassera et al., 2002; Griffith and Jost, 1976; Schorn and Marsh, 1996).

La explicación del gradiente de flexibilidad se basa en que la mayoría de los carbonos de las cadenas acíclicas presentan hibridación sp^3 y los enlaces C-C son uniones simples, lo cual les confiere libertad en cuanto a la orientación relativa al enlace anterior de la cadena (posiciones *trans*, *gauche* +, *gauche* -). El intercambio entre las distintas posibilidades de orientación da lugar a isomerizaciones *trans-gauche*. Estos movimientos proporcionan flexibilidad a la cadena y su efecto es acumulativo cadena abajo, dando una mayor amplitud de movimiento hacia el centro de la membrana y generando de esta manera una disminución en el S_{app} .

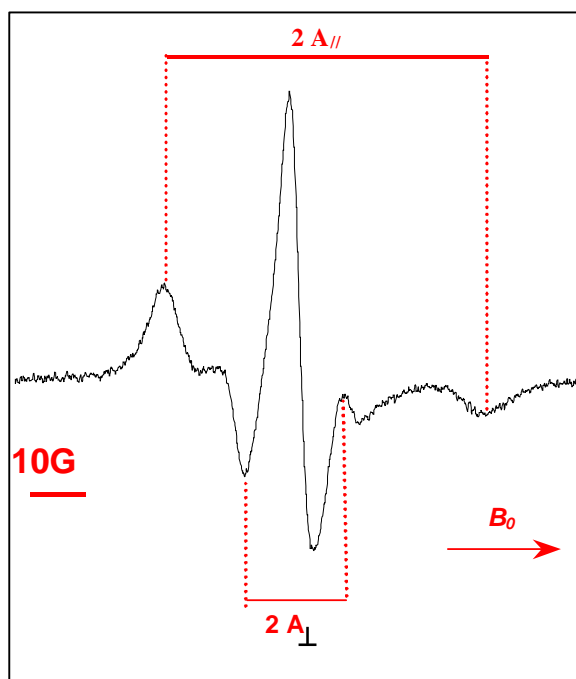


Figura A.2- Espectro típico de EPR (marcador 5-SASL en membrana de glóbulos rojos humanos). En la figura se indica como se obtiene la información del espectro que luego se utiliza para calcular el parámetro de orden.

La espectroscopía de EPR de proteínas marcadas con marcadores de espín derivados de la maleimida ha sido ampliamente utilizada para evaluar la movilidad y los cambios conformacionales en los grupos sulfidrido de las proteínas y para estudiar la difusión rotacional global de las proteínas de membrana a través de EPR de transferencia de saturación (Esmann et al., 1992; Fajer, 2000).

Los espectros de EPR de proteínas marcadas con un marcador de espín derivado de la maleimida están generalmente constituidos por dos componentes espectrales llamados fuertemente (S) y débilmente (W) inmovilizado, y se asocian con movimientos

más o menos restringidos del radical nitróxido en la escala de tiempo del experimento EPR (Alonso et al., 2003) (Figura A.4).

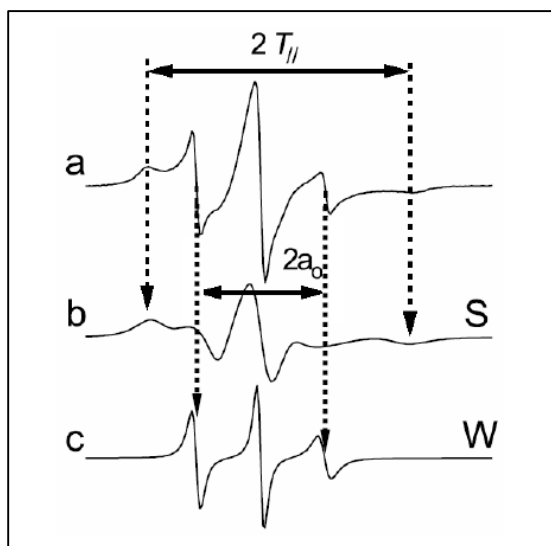


Figura A.4 EPR de proteínas:

(a) Espectro típico de EPR marcadores de espín derivados de la maleimida unido a los grupos sulfhidrilos de proteínas (b y c) espectros obtenidos por simulación que corresponden a los dos componentes espectrales fuerte (S) y débilmente (W) inmóvilizado. Los parámetros $T_{//}$ (también llamado A_{max}) y a_0 correspondientes a la máxima separación hiperfina y a la separación hiperfina isotrópica, respectivamente, están indicados en el gráfico. Figura tomada y modificada de Alonso et al, 2001.

Alonso

Alonso y colaboradores (Alonso et al., 2003) han propuesto que estos dos componentes son el resultado de un equilibrio termodinámico entre dos poblaciones de nitróxidos con estados de movilidad muy diferentes. De los parámetros de los espectros de EPR se deriva que el componente menos móvil se debe a nitróxidos cuya cadena lateral adopta una conformación “inclinada” poniéndose en contacto con otros sitios de la proteína a través de enlaces de hidrógeno en los que participa el átomo de oxígeno del radical nitróxido, mientras que el componente móvil se origina por los marcadores de espín en contacto con el solvente, y reflejan la polaridad dentro del rango típico para sistemas acuosos (Alonso et al., 2001).

El componente de mayor movilidad W (Figura A.4) presenta tres líneas de resonancia finas con una separación hiperfina isotrópica $2a_0$, la cual es muy sensible a la polaridad del solvente en donde se encuentra disuelto el radical nitróxido. Si a_0 del componente W es similar al del marcador de espín en el buffer, los radicales nitróxido del componente W están expuestos al solvente. En este caso, sus movimientos están relacionados con el tiempo de correlación efectivo debido a isomerizaciones rotacionales alrededor de los enlaces que unen el anillo nitróxido a la proteína. El componente menos móvil S (Figura A4), habitualmente representa la mayor fracción del espectro y permite medir la separación hiperfina de las líneas de resonancia exteriores, el parámetro $2T_{//}$.

El valor del parámetro $T_{//}$ (A_{MAX}) es usualmente de unos 34G a 18 °C. Este parámetro es sensible a la movilidad del nitróxido pero también puede ser afectado por la formación de puentes de hidrógeno (Griffith and Jost, 1976), que aumentan la densidad de espín del electrón no apareado en los núcleos de nitrógeno. En un entorno hidrofóbico, donde el nitróxido no es capaz de formar enlaces de hidrógeno, el valor máximo de $T_{//}$ es menor a 32 G. De este modo, el estado de escasa movilidad del marcador que genera el componente espectral S se explica por su fuerte unión con la proteína. Por un lado, está unido de manera covalente al átomo de azufre de los residuos de cisteína, y la rotación del grupo que contiene al NO se encuentra dificultada por la formación de enlaces de hidrógeno con el grupo amida o con algunas cadenas laterales de aminoácidos (Alonso et al., 2003).

Se puede verificar que un aumento de temperatura disminuye la relación de poblaciones entre los componentes fuerte y débilmente inmovilizado N_s/N_w , y como este proceso es totalmente reversible, parece claro que los dos componentes espectrales se encuentran en equilibrio termodinámico. Es así que estos componentes provienen de dos estados intercambiables del radical nitróxido (ver figura A.5). Además de los posibles enlaces de hidrógeno nitróxido-proteína también son posibles otros enlaces de hidrógeno de los átomos de oxígeno del anillo maleimida con la cadena polipeptídica. Estos enlaces podrían sujetar al anillo maleimida a la proteína. En esta circunstancia el enlace que une a la maleimida y al nitróxido sería el condicionante más importante de los movimientos rotacionales (Alonso et al., 2003).

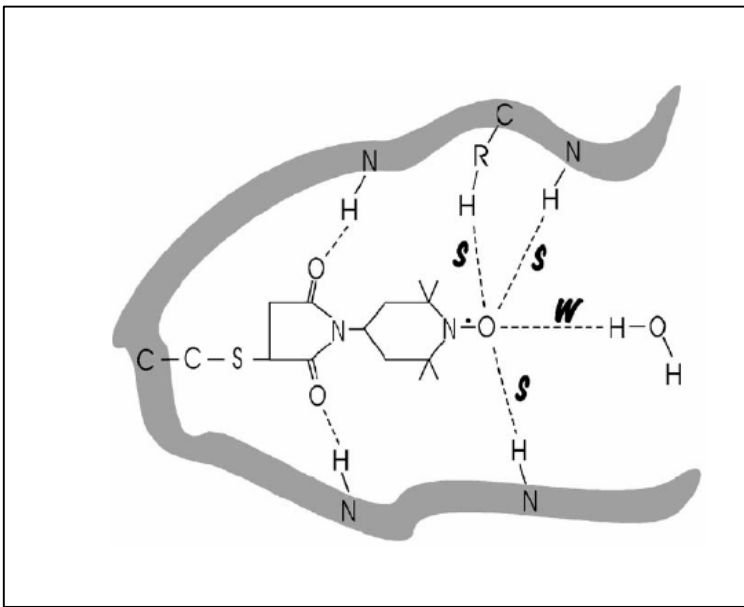


Figura A.5. EPR de proteínas. Modelo molecular esquemático que ilustra al marcador de espín maleimido tiempo (MT) unido a la cadena polipeptídica a través del grupo sulfhidrilo de una cisteína. El radical nitroxido es capaz de formar enlaces de hidrógeno tanto con los residuos aminoacídicos, generando el componente espectral fuertemente inmovilizado (S), o con el agua generando un componente espectral débilmente inmovilizado (W). Los dos átomos de oxígeno del anillo de maleimida pueden formar enlaces de hidrógeno con la cadena polipeptídica. Figura tomada y modificada de Alonso et al 2003.

Para la componente móvil, es posible calcular el tiempo de correlación rotacional (τ_c) y compararlo con el del marcador MT libre en solución. El tiempo puede ser calculado de acuerdo a la siguiente fórmula estándar para un régimen de alta movilidad medido en banda X (Gennaro et al., 1996)

$$\tau_c = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_0 [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1] \quad \text{Ecuación A.2.}$$

Donde τ_c está en segundo ΔH_0 es el ancho pico a pico de la línea central del espectro de EPR (en gauss), y h_0 y h_{-1} son las amplitudes de la línea central y de la línea de campo alto, respectivamente. El factor numérico depende tanto del campo magnético como de las anisotropías del factor g y de la interacción hiperfina. El valor de $6,5 \cdot 10^{-10}$ es el que se usa habitualmente para experimentos de banda X. Un aumento de τ_c puede interpretarse como una disminución en la movilidad de la especie marcada.

Bibliografía

1. **Abe, N. and Cavalli, V.** (2008). Nerve injury signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 276-283.
2. **Acklin, C., Stoney, K., Rosenfeld, R. A., Miller, J. A., Rohde, M. F. and Haniu, M.** (1993). Recombinant human brain-derived neurotrophic factor (rHuBDNF). Disulfide structure and characterization of BDNF expressed in CHO cells. *Int. J. Pept. Protein Res.* 41, 548-552.
3. **Aguayo, A. J., Rasminsky, M., Bray, G. M., Carbonetto, S., McKerracher, L., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M. and Carter, D. A.** (1991). Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 331, 337-343.
4. **Aigner, L. and Caroni, P.** (1995). Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43-depleted growth cones. *J. Cell Biol.* 128, 647-660.
5. **Alonso, A., dos Santos, W. P., Leonor, S. J., dos Santos, J. G. and Tabak, M.** (2001). Stratum corneum protein dynamics as evaluated by a spin-label maleimide derivative: effect of urea. *Biophys. J.* 81, 3566-3576.
6. **Alonso, A., Vasques da, S. J. and Tabak, M.** (2003). Hydration effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1646, 32-41.
7. **Arni, S., Keilbaugh, S. A., Ostermeyer, A. G. and Brown, D. A.** (1998). Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *J. Biol. Chem.* 273, 28478-28485.
8. **Avalos, A. M., Labra, C. V., Quest, A. F. and Leyton, L.** (2002). Signaling triggered by Thy-1 interaction with beta 3 integrin on astrocytes is an essential step towards unraveling neuronal Thy-1 function. *Biol. Res.* 35, 231-238.
9. **Azurra, J. M., Soiza-Reilly, M., Fossati, M. and Paratcha, G. C.** (2003). Delayed and bilateral changes of GAP-43/B-50 phosphorylation after circling training during a critical period in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 118, 166-170.
10. **Barbacid, M.** (1987). ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 779-827.
11. **Barbacid, M.** (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 25, 1386-1403.
12. **Barboni, E., Gormley, A. M., Pliego Rivero, F. B., Vidal, M. and Morris, R. J.** (1991). Activation of T lymphocytes by cross-linking of glycopospholipid-anchored Thy-1 mobilizes separate pools of intracellular second messengers to those induced by the antigen-receptor/CD3 complex. *Immunology* 72, 457-463.

13. **Barlow, J. Z., Kelley, K. A., Bozdagi, O. and Huntley, G. W.** (2002). Testing the role of the cell-surface molecule Thy-1 in regeneration and plasticity of connectivity in the CNS. *Neuroscience* 111, 837-852.
14. **Bartels, D. J., Mitchell, D. A., Dong, X. and Deschenes, R. J.** (1999). Erf2, a novel gene product that affects the localization and palmitoylation of Ras2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19, 6775-6787.
15. **Basi, G. S., Jacobson, R. D., Virag, I., Schilling, J. and Skene, J. H.** (1987). Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. *Cell* 49, 785-791.
16. **Baudier, J., Bronner, C., Kligman, D. and Cole, R. D.** (1989). Protein kinase C substrates from bovine brain. Purification and characterization of neuromodulin, a neuron-specific calmodulin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 264, 1824-1828.
17. **Beecher, K. L., Andersen, T. T., Fenton, J. W. and Festoff, B. W.** (1994). Thrombin receptor peptides induce shape change in neonatal murine astrocytes in culture. *J. Neurosci. Res.* 37, 108-115.
18. **Beissert, S., He, H. T., Hueber, A. O., Lellouch, A. C., Metze, D., Mehling, A., Luger, T. A., Schwarz, T. and Grabbe, S.** (1998). Impaired cutaneous immune responses in Thy-1-deficient mice. *J. Immunol.* 161, 5296-5302.
19. **Benowitz, L. I. and Routtenberg, A.** (1997). GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* 20, 84-91.
20. **Berliner, L. J. and Reuben J.** (1989). *"Spin Labeling - Theory and Applications"*. New York, EE.UU: Plenum Press.
21. **Bhatt, D. H., Otto, S. J., Depoister, B. and Fetcho, J. R.** (2004). Cyclic AMP-induced repair of zebrafish spinal circuits. *Science* 305, 254-258.
22. **Biedi, C., Panetta, D., Segat, D., Cordera, R. and Maggi, D.** (2003). Specificity of insulin-like growth factor I and insulin on Shc phosphorylation and Grb2 recruitment in caveolae. *Endocrinology* 144, 5497-5503.
23. **Bixby, J. L.** (2000). Receptor tyrosine phosphatases in axon growth and guidance. *Neuroreport* 11, R5-10.
24. **Bixby, J. L. and Jhabvala, P.** (1993). Tyrosine phosphorylation in early embryonic growth cones. *J. Neurosci.* 13, 3421-3432.
25. **Boggon, T. J. and Eck, M. J.** (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918-7927.
26. **Bolliger, M. F., Frei, K., Winterhalter, K. H. and Gloor, S. M.** (2001). Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. *Biochem. J.* 356, 581-588.

27. **Bomze, H. M., Bulsara, K. R., Iskandar, B. J., Caroni, P. and Skene, J. H.** (2001). Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 38-43.
28. **Bonhoeffer, T.** (1996). Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 119-126.
29. **Bothwell, M.** (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 223-253.
30. **Bouquet, C., Soares, S., von, B. Y., Ravaille-Veron, M., Propst, F. and Nothias, F.** (2004). Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J. Neurosci.* 24, 7204-7213.
31. **Bouvier, M., Chidiac, P., Hebert, T. E., Loisel, T. P., Moffett, S. and Mouillac, B.** (1995). Dynamic palmitoylation of G-protein-coupled receptors in eukaryotic cells. *Methods Enzymol.* 250, 300-314.
32. **Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
33. **Brambilla, R. and Klein, R.** (1995). Telling axons where to grow: a role for Eph receptor tyrosine kinases in guidance. *Mol. Cell Neurosci.* 6, 487-495.
34. **Brown, D. A.** (2002). Isolation and use of rafts. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 11, Unit.
35. **Brown, D. A.** (2006). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology. (Bethesda.)* 21, 430-439.
36. **Brown, D. A. and London, E.** (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 111-136.
37. **Brown, D. A. and London, E.** (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221-17224.
38. **Brown, M. D., Cornejo, B. J., Kuhn, T. B. and Bamburg, J. R.** (2000). Cdc42 stimulates neurite outgrowth and formation of growth cone filopodia and lamellipodia. *J. Neurobiol.* 43, 352-364.
39. **Bruses, J. L. and Rutishauser, U.** (2001). Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie* 83, 635-643.
40. **Buffo, A., Holtmaat, A. J., Savio, T., Verbeek, J. S., Oberdick, J., Oestreicher, A. B., Gispen, W. H., Verhaagen, J., Rossi, F. and Strata, P.** (1997). Targeted overexpression of the neurite growth-associated protein B-50/GAP-43 in cerebellar Purkinje cells induces

sprouting after axotomy but not axon regeneration into growth-permissive transplants. *J. Neurosci.* 17, 8778-8791.

41. **Busch, S. A. and Silver, J.** (2007). The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 120-127.
42. **Cammarota, M., Paratcha, G., Levi de, S. M., Bernabeu, R., Izquierdo, I. and Medina, J. H.** (1997). B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. *Neurochem. Res.* 22, 499-505.
43. **Campbell, I. D. and Dwek, R. A.** (1984). *Biological Spectroscopy*. Menlo Park, California.
44. **Campenot, R. B.** (1994). NGF and the local control of nerve terminal growth. *J. Neurobiol.* 25, 599-611.
45. **Caroni, P.** (2001). New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J.* 20, 4332-4336.
46. **Carter, B. D. and Lewin, G. R.** (1997). Neurotrophins live or let die: does p75NTR decide? *Neuron* 18, 187-190.
47. **Cassera, M. B., Silber, A. M. and Gennaro, A. M.** (2002). Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study. *Biophys. Chem.* 99, 117-127.
48. **Chan, S. Y., Murakami, K. and Routtenberg, A.** (1986). Phosphoprotein F1: purification and characterization of a brain kinase C substrate related to plasticity. *J. Neurosci.* 6, 3618-3627.
49. **Chapman, E. R., Au, D., Alexander, K. A., Nicolson, T. A. and Storm, D. R.** (1991). Characterization of the calmodulin binding domain of neuromodulin. Functional significance of serine 41 and phenylalanine 42. *J. Biol. Chem.* 266, 207-213.
50. **Chapman, E. R., Estep, R. P. and Storm, D. R.** (1992). Palmitoylation of neuromodulin (GAP-43) is not required for phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 267, 25233-25238.
51. **Chen, C. H., Wang, S. M., Yang, S. H. and Jeng, C. J.** (2005). Role of Thy-1 in in vivo and in vitro neural development and regeneration of dorsal root ganglionic neurons. *J. Cell Biochem.* 94, 684-694.
52. **Chen, W., Zhang, G. and Marvizon, J. C.** (2010). NMDA receptors in primary afferents require phosphorylation by Src family kinases to induce substance P release in the rat spinal cord. *Neuroscience* 166, 924-934.
53. **Chen, Y., Thelin, W. R., Yang, B., Milgram, S. L. and Jacobson, K.** (2006b). Transient anchorage of cross-linked glycosyl-phosphatidylinositol-

anchored proteins depends on cholesterol, Src family kinases, caveolin, and phosphoinositides. *J. Cell Biol.* 175, 169-178.

54. **Chen, Y., Thelin, W. R., Yang, B., Milgram, S. L. and Jacobson, K.** (2006a). Transient anchorage of cross-linked glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins depends on cholesterol, Src family kinases, caveolin, and phosphoinositides. *J. Cell Biol.* 175, 169-178.
55. **Chen, Z. L. and Strickland, S.** (2003). Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J. Cell Biol.* 163, 889-899.
56. **Chen, Z. L., Yu, W. M. and Strickland, S.** (2007). Peripheral regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 209-233.
57. **Chierzi, S., Ratto, G. M., Verma, P. and Fawcett, J. W.** (2005). The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2051-2062.
58. **Chu, G. K. and Tator, C. H.** (2001). Calcium influx is necessary for optimal regrowth of transected neurites of rat sympathetic ganglion neurons in vitro. *Neuroscience* 102, 945-957.
59. **Clary, D. O. and Reichardt, L. F.** (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, 11133-11137.
60. **Coggeshall, R. E., Reynolds, M. L. and Woolf, C. J.** (1991). Distribution of the growth associated protein GAP-43 in the central processes of axotomized primary afferents in the adult rat spinal cord; presence of growth cone-like structures. *Neurosci. Lett.* 131, 37-41.
61. **Coggins, P. J. and Zwiers, H.** (1989). Evidence for a single protein kinase C-mediated phosphorylation site in rat brain protein B-50. *J. Neurochem.* 53, 1895-1901.
62. **Colburn, R. W., Thoa, N. B. and Kopin, I. J.** (1975). Influence of ionophores which bind calcium on the release of norepinephrine from synaptosomes. *Life Sci.* 17, 1395-1399.
63. **Cotman, C. W., Haycock, J. W. and White, W. F.** (1976). Stimulus-secretion coupling processes in brain: analysis of noradrenaline and gamma-aminobutyric acid release. *J. Physiol* 254, 475-505.
64. **Coughlin, S. R.** (1998). Sol Sherry lecture in thrombosis: how thrombin 'talks' to cells: molecular mechanisms and roles in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 514-518.
65. **Craig, W., Kay, R., Cutler, R. L. and Lansdorp, P. M.** (1993). Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 177, 1331-1342.

66. **Cunningham, M. E., Stephens, R. M., Kaplan, D. R. and Greene, L. A.** (1997). Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 10957-10967.
67. **de Belleruche, J. S. and Bradford, H. F.** (1972a). Metabolism of beds of mammalian cortical synaptosomes: response to depolarizing influences. *J. Neurochem.* 19, 585-602.
68. **de Belleruche, J. S. and Bradford, H. F.** (1972b). Synaptosome beds: a method for the study in vitro of the metabolism and function of nerve endings. *Biochem. J.* 127, 21P.
69. **Degtyarev, M. Y., Spiegel, A. M. and Jones, T. L.** (1993). The G protein alpha s subunit incorporates [3H]palmitic acid and mutation of cysteine-3 prevents this modification. *Biochemistry* 32, 8057-8061.
70. **Dekker, L. V., De Graan, P. N., Versteeg, D. H., Oestreicher, A. B. and Gispen, W. H.** (1989). Phosphorylation of B-50 (GAP43) is correlated with neurotransmitter release in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 52, 24-30.
71. **Denny, J. B.** (2006). Molecular Mechanisms, Biological Actions, and Neuropharmacology of the Growth-Associated Protein GAP-43. *Curr. Neuropharmacol.* 4, 293-304.
72. **Dent, E. W. and Meiri, K. F.** (1998). Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior. *J. Neurobiol.* 35, 287-299.
73. **Dietzen, D. J., Hastings, W. R. and Lublin, D. M.** (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* 270, 6838-6842.
74. **Dihanich, M., Kaser, M., Reinhard, E., Cunningham, D. and Monard, D.** (1991). Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron* 6, 575-581.
75. **Downward, J.** (1990). The ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15, 469-472.
76. **Downward, J.** (1991). Plugging the GAPs. *Curr. Biol.* 1, 353-355.
77. **Doyu, M., Sobue, G., Ken, E., Kimata, K., Shinomura, T., Yamada, Y., Mitsuma, T. and Takahashi, A.** (1993). Laminin A, B1, and B2 chain gene expression in transected and regenerating nerves: regulation by axonal signals. *J. Neurochem.* 60, 543-551.
78. **Drevot, P., Langlet, C., Guo, X. J., Bernard, A. M., Colard, O., Chauvin, J. P., Lasserre, R. and He, H. T.** (2002). TCR signal initiation machinery

is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J.* 21, 1899-1908.

79. **Dreyer, E. B., Leifer, D., Heng, J. E., McConnell, J. E., Gorla, M., Levin, L. A., Barnstable, C. J. and Lipton, S. A.** (1995). An astrocytic binding site for neuronal Thy-1 and its effect on neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 11195-11199.
80. **Drisdell, R. C., Alexander, J. K., Sayeed, A. and Green, W. N.** (2006). Assays of protein palmitoylation. *Methods* 40, 127-134.
81. **Drisdell, R. C. and Green, W. N.** (2004). Labeling and quantifying sites of protein palmitoylation. *Biotechniques* 36, 276-285.
82. **Drobnik, W., Borsukova, H., Bottcher, A., Pfeiffer, A., Liebisch, G., Schutz, G. J., Schindler, H. and Schmitz, G.** (2002). Apo AI/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains. *Traffic* 3, 268-278.
83. **Duman, J. G. and Forte, J. G.** (2003). What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am. J. Physiol Cell Physiol* 285, C237-C249.
84. **Duncan, J. A. and Gilman, A. G.** (1996). Autoacylation of G protein alpha subunits. *J. Biol. Chem.* 271, 23594-23600.
85. **Duncan, J. A. and Gilman, A. G.** (1998). A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J. Biol. Chem.* 273, 15830-15837.
86. **Eckhardt, M., Bukalo, O., Chazal, G., Wang, L., Goridis, C., Schachner, M., Gerardy-Schahn, R., Cremer, H. and Dityatev, A.** (2000). Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SialIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 20, 5234-5244.
87. **Edidin, M.** (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 257-283.
88. **El-Husseini, A. and Brecht, D. S.** (2002). Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 791-802.
89. **El-Husseini, A., Craven, S. E., Brock, S. C. and Brecht, D. S.** (2001). Polarized targeting of peripheral membrane proteins in neurons. *J. Biol. Chem.* 276, 44984-44992.
90. **El-Husseini, A., Schnell, E., Dakoji, S., Sweeney, N., Zhou, Q., Prange, O., Gauthier-Campbell, C., Guilera-Moreno, A., Nicoll, R. A. and Brecht, D. S.** (2002). Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* 108, 849-863.

91. **Engelman, J. A., Chu, C., Lin, A., Jo, H., Ikezu, T., Okamoto, T., Kohtz, D. S. and Lisanti, M. P.** (1998). Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett.* 428, 205-211.
92. **Englund, P. T.** (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 121-138.
93. **Esmann, M., Hideg, K. and Marsh, D.** (1992). Conventional and saturation transfer EPR spectroscopy of Na⁺/K⁺-ATPase modified with different maleimide-nitroxide derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* 1159, 51-59.
94. **Etienne-Manneville, S. and Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
95. **Fairhurst, A. S., Julien, R. M. and Whittaker, M. L.** (1975). Effects of ionophores A23187 and X537A on brain calcium, catecholamines and excitability. *Life Sci.* 17, 1433-1443.
96. **Fajer, P. G.** (2000). *Electron Spin Resonance Spectroscopy Labeling in Peptide and Protein Analysis.* Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd.
97. **Ferguson, M. A.** (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 17), 2799-2809.
98. **Fornes, A., Nunez, E., onso-Torres, P., Aragon, C. and Lopez-Corcuera, B.** (2008). Trafficking properties and activity regulation of the neuronal glycine transporter GLYT2 by protein kinase C. *Biochem. J.* 412, 495-506.
99. **Foster, J. D., Adkins, S. D., Lever, J. R. and Vaughan, R. A.** (2008). Phorbol ester induced trafficking-independent regulation and enhanced phosphorylation of the dopamine transporter associated with membrane rafts and cholesterol. *J. Neurochem.* 105, 1683-1699.
100. **Fra, A. M., Masserini, M., Palestini, P., Sonnino, S. and Simons, K.** (1995). A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Lett.* 375, 11-14.
101. **Frame, M. C.** (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta* 1602, 114-130.
102. **Freed, W. J.** (1976). The role of nerve-growth factor (NGF) in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 1, 393-412.
103. **Frey, D., Laux, T., Xu, L., Schneider, C. and Caroni, P.** (2000). Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J. Cell Biol.* 149, 1443-1454.

104. **Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R. A. and Brecht, D. S.** (2004). Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron* 44, 987-996.
105. **Galbiati, F., Volonte, D., Gil, O., Zanazzi, G., Salzer, J. L., Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Engelman, J. A., Schlegel, A., Parenti, M. et al.** (1998). Expression of caveolin-1 and -2 in differentiating PC12 cells and dorsal root ganglion neurons: caveolin-2 is up-regulated in response to cell injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 10257-10262.
106. **Gallo, G. and Letourneau, P. C.** (1998). Axon guidance: GTPases help axons reach their targets. *Curr. Biol.* 8, R80-R82.
107. **Garnett, D., Barclay, A. N., Carmo, A. M. and Beyers, A. D.** (1993). The association of the protein tyrosine kinases p56lck and p60fyn with the glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins Thy-1 and CD48 in rat thymocytes is dependent on the state of cellular activation. *Eur. J. Immunol.* 23, 2540-2544.
108. **Gennaro, A. M., Luquita, A. and Rasia, M.** (1996). Comparison between internal microviscosity of low-density erythrocytes and the microviscosity of hemoglobin solutions: an electron paramagnetic resonance study. *Biophys. J.* 71, 389-393.
109. **Gil, C., Cubi, R., Blasi, J. and Aguilera, J.** (2006). Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1334-1342.
110. **Glass, J. D., Watanabe, M., Fedorkova, L., Shen, H., Ungers, G. and Rutishauser, U.** (2003). Dynamic regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 117, 203-211.
111. **Glenney, J. R., Jr. and Soppet, D.** (1992). Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 10517-10521.
112. **Gold, B. G.** (1997). FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol. Neurobiol.* 15, 285-306.
113. **Goldberg, J. L., Klassen, M. P., Hua, Y. and Barres, B. A.** (2002). Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells. *Science* 296, 1860-1864.
114. **Gordon-Weeks, P. R.** (1987). Isolation of synaptosomes, growth cones and their subcellular components. In *Neurochemistry: a practical approach*. (eds. A. J. Turner and H. S. Bachelard). Oxford: IRL Press.
115. **Goslin, K. and Banker, G.** (1990). Rapid changes in the distribution of GAP-43 correlate with the expression of neuronal polarity during normal

- development and under experimental conditions. *J. Cell Biol.* 110, 1319-1331.
116. **Goslin, K., Schreyer, D. J., Skene, J. H. and Banker, G.** (1990). Changes in the distribution of GAP-43 during the development of neuronal polarity. *J. Neurosci.* 10, 588-602.
 117. **Gotz, R., Koster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharl, M. and Thoenen, H.** (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372, 266-269.
 118. **Greaves, J. and Chamberlain, L. H.** (2007). Palmitoylation-dependent protein sorting. *J. Cell Biol.* 176, 249-254.
 119. **Griffith, O. H. and Jost, P.** (1976). *Spin label in biological membranes, en Spin labeling: Theory and applications.* New York, EE.UU: Academic Press.
 120. **Grimpe, B. and Silver, J.** (2002). The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog. Brain Res.* 137, 333-349.
 121. **Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B. and Zheng, J. Q.** (2004). Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* 42, 51-62.
 122. **Guirland, C. and Zheng, J. Q.** (2007). Membrane lipid rafts and their role in axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 621, 144-155.
 123. **Haeryfar, S. M. and Hoskin, D. W.** (2004). Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J. Immunol.* 173, 3581-3588.
 124. **Hall, A.** (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249, 635-640.
 125. **Hammarberg, H., Wallquist, W., Piehl, F., Risling, M. and Cullheim, S.** (2000). Regulation of laminin-associated integrin subunit mRNAs in rat spinal motoneurons during postnatal development and after axonal injury. *J. Comp Neurol.* 428, 294-304.
 126. **Hancock, J. F.** (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 373-384.
 127. **Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E. and Marshall, C. J.** (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57, 1167-1177.
 128. **Hanz, S. and Fainzilber, M.** (2006). Retrograde signaling in injured nerve--the axon reaction revisited. *J. Neurochem.* 99, 13-19.
 129. **Hata, Y., Slaughter, C. A. and Sudhof, T. C.** (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366, 347-351.

130. **Hayashi, N., Matsubara, M., Titani, K. and Taniguchi, H.** (1997). Circular dichroism and 1H nuclear magnetic resonance studies on the solution and membrane structures of GAP-43 calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 272, 7639-7645.
131. **He, F. and Sun, Y. E.** (2007). Glial cells more than support cells? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 661-665.
132. **He, Q., Dent, E. W. and Meiri, K. F.** (1997). Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J. Neurosci.* 17, 3515-3524.
133. **Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G. and Schaper, F.** (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1-20.
134. **Henderson, C. E.** (1996). Programmed cell death in the developing nervous system. *Neuron* 17, 579-585.
135. **Henke, R. C., Seeto, G. S. and Jeffrey, P. L.** (1997). Thy-1 and AvGp50 signal transduction complex in the avian nervous system: c-Fyn and G alpha i protein association and activation of signalling pathways. *J. Neurosci. Res.* 49, 655-670.
136. **Herdegen, T., Kummer, W., Fiallos, C. E., Leah, J. and Bravo, R.** (1991). Expression of c-JUN, JUN B and JUN D proteins in rat nervous system following transection of vagus nerve and cervical sympathetic trunk. *Neuroscience* 45, 413-422.
137. **Hermosilla, T., Munoz, D., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Munoz, N., Nham, S. U., Schneider, P., Burridge, K., Quest, A. F. and Leyton, L.** (2008). Direct Thy-1/alphaVbeta3 integrin interaction mediates neuron to astrocyte communication. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1111-1120.
138. **Hess, D. T., Patterson, S. I., Smith, D. S. and Skene, J. H.** (1993). Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* 366, 562-565.
139. **Hollrigel, G. S., Morris, R. J. and Soltesz, I.** (1998). Enhanced bursts of IPSCs in dentate granule cells in mice with regionally inhibited long-term potentiation. *Proc. Biol. Sci.* 265, 63-69.
140. **Hou, H., Subramanian, K., LaGrassa, T. J., Markgraf, D., Dietrich, L. E., Urban, J., Decker, N. and Ungermann, C.** (2005). The DHHC protein Pfa3 affects vacuole-associated palmitoylation of the fusion factor Vac8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 17366-17371.
141. **Hu, F. and Strittmatter, S. M.** (2004). Regulating axon growth within the postnatal central nervous system. *Semin. Perinatol.* 28, 371-378.

142. **Huang, D. W., McKerracher, L., Braun, P. E. and David, S.** (1999). A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 24, 639-647.
143. **Huang, E. J. and Reichardt, L. F.** (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609-642.
144. **Huang, E. M.** (1989). Agonist-enhanced palmitoylation of platelet proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1011, 134-139.
145. **Huang, K. and El-Husseini, A.** (2005). Modulation of neuronal protein trafficking and function by palmitoylation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 527-535.
146. **Huang, K., Yanai, A., Kang, R., Arstikaitis, P., Singaraja, R. R., Metzler, M., Mullard, A., Haigh, B., Gauthier-Campbell, C., Gutekunst, C. A. et al.** (2004). Huntingtin-interacting protein HIP14 is a palmitoyl transferase involved in palmitoylation and trafficking of multiple neuronal proteins. *Neuron* 44, 977-986.
147. **Huber, A. B., Kolodkin, A. L., Ginty, D. D. and Cloutier, J. F.** (2003). Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 509-563.
148. **Hulo, S., Alberi, S., Laux, T., Muller, D. and Caroni, P.** (2002). A point mutant of GAP-43 induces enhanced short-term and long-term hippocampal plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1976-1982.
149. **Hutt, D. M., Cardullo, R. A., Baltz, J. M. and Ngsee, J. K.** (2002). Synaptotagmin VIII is localized to the mouse sperm head and may function in acrosomal exocytosis. *Biol. Reprod.* 66, 50-56.
150. **Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C. and Sudhof, T. C.** (1995). Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81, 435-443.
151. **Ignelzi, M. A., Jr., Padilla, S. S., Warder, D. E. and Maness, P. F.** (1992). Altered expression of pp60c-src induced by peripheral nerve injury. *J. Comp Neurol.* 315, 171-177.
152. **Ingley, E.** (2008). Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 56-65.
153. **Inuzuka, H., Redies, C. and Takeichi, M.** (1991). Differential expression of R- and N-cadherin in neural and mesodermal tissues during early chicken development. *Development* 113, 959-967.
154. **Irwin, N., Chao, S., Goritchenko, L., Horiuchi, A., Greengard, P., Nairn, A. C. and Benowitz, L. I.** (2002). Nerve growth factor controls GAP-43 mRNA stability via the phosphoprotein ARPP-19. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 12427-12431.

155. **Iwata, T., Namikawa, K., Honma, M., Mori, N., Yachiku, S. and Kiyama, H.** (2002). Increased expression of mRNAs for microtubule disassembly molecules during nerve regeneration. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 102, 105-109.
156. **Jalink, K., Hordijk, P. L. and Moolenaar, W. H.** (1994). Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator. *Biochim. Biophys. Acta* 1198, 185-196.
157. **Jalink, K. and Moolenaar, W. H.** (1992). Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers. *J. Cell Biol.* 118, 411-419.
158. **Jayanthi, L. D., Samuvel, D. J. and Ramamoorthy, S.** (2004). Regulated internalization and phosphorylation of the native norepinephrine transporter in response to phorbol esters. Evidence for localization in lipid rafts and lipid raft-mediated internalization. *J. Biol. Chem.* 279, 19315-19326.
159. **Jia, M., Li, M., Dunlap, V. and Nelson, P. G.** (1999). The thrombin receptor mediates functional activity-dependent neuromuscular synapse reduction via protein kinase C activation in vitro. *J. Neurobiol.* 38, 369-381.
160. **Kahn, R. A., Der, C. J. and Bokoch, G. M.** (1992). The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature. *FASEB J.* 6, 2512-2513.
161. **Kalia, L. V., Gingrich, J. R. and Salter, M. W.** (2004). Src in synaptic transmission and plasticity. *Oncogene* 23, 8007-8016.
162. **Kamiguchi, H., Hlavin, M. L. and Lemmon, V.** (1998). Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol. Cell Neurosci.* 12, 48-55.
163. **Kamiguchi, H. and Lemmon, V.** (1997). Neural cell adhesion molecule L1: signaling pathways and growth cone motility. *J. Neurosci. Res.* 49, 1-8.
164. **Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Jessell, T. M.** (2000). *Principles of neural science.* Mc Graw-Hill Companies.
165. **Kaplan, D. R.** (1998). Studying signal transduction in neuronal cells: the Trk/NGF system. *Prog. Brain Res.* 117, 35-46.
166. **Kaplan, D. R. and Miller, F. D.** (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 381-391.
167. **Katsuragi, T. and Su, C.** (1980). Purine release from vascular adrenergic nerves by high potassium and a calcium ionophore, A-23187. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 215, 685-690.
168. **Kim, S. H., Kim, M. K., Yu, H. S., Kim, H. S., Park, I. S., Park, H. G., Kang, U. G. and Kim, Y. S.** (2010). Electroconvulsive seizure increases phosphorylation of PKC substrates, including GAP-43, MARCKS, and

neurogranin, in rat brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 115-121.

169. **Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C. and Pawson, T.** (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252, 668-674.
170. **Koegl, M., Zlatkine, P., Ley, S. C., Courtneidge, S. A. and Magee, A. I.** (1994). Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem. J.* 303 (Pt 3), 749-753.
171. **Koliatsos, V. E., Clatterbuck, R. E., Winslow, J. W., Cayouette, M. H. and Price, D. L.** (1993). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron* 10, 359-367.
172. **Kosloff, M., Elia, N. and Selinger, Z.** (2002). Structural homology discloses a bifunctional structural motif at the N-termini of G alpha proteins. *Biochemistry* 41, 14518-14523.
173. **Kruger, K., Tam, A. S., Lu, C. and Sretavan, D. W.** (1998). Retinal ganglion cell axon progression from the optic chiasm to initiate optic tract development requires cell autonomous function of GAP-43. *J. Neurosci.* 18, 5692-5705.
174. **Kuhn, T. B., Meberg, P. J., Brown, M. D., Bernstein, B. W., Minamide, L. S., Jensen, J. R., Okada, K., Soda, E. A. and Bamburg, J. R.** (2000). Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *J. Neurobiol.* 44, 126-144.
175. **Kuromi, H., Honda, A. and Kidokoro, Y.** (2004). Ca²⁺ influx through distinct routes controls exocytosis and endocytosis at drosophila presynaptic terminals. *Neuron* 41, 101-111.
176. **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
177. **Lam, K. K., Davey, M., Sun, B., Roth, A. F., Davis, N. G. and Conibear, E.** (2006). Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J. Cell Biol.* 174, 19-25.
178. **Landis, S. C.** (1983). Neuronal growth cones. *Annu. Rev. Physiol* 45, 567-580.
179. **Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D. and Caroni, P.** (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J. Cell Biol.* 149, 1455-1472.
180. **Lee, H., Woodman, S. E., Engelman, J. A., Volonte, D., Galbiati, F., Kaufman, H. L., Lublin, D. M. and Lisanti, M. P.** (2001a). Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae

effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14). *J. Biol. Chem.* 276, 35150-35158.

181. **Lee, K. R., Betz, A. L., Kim, S., Keep, R. F. and Hoff, J. T.** (1996). The role of the coagulation cascade in brain edema formation after intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir. (Wien.)* 138, 396-400.
182. **Lee, P., Zhuo, H. and Helke, C. J.** (2001b). Axotomy alters neurotrophin and neurotrophin receptor mRNAs in the vagus nerve and nodose ganglion of the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 87, 31-41.
183. **Lents, N. H., Irintcheva, V., Goel, R., Wheeler, L. W. and Baldassare, J. J.** (2009). The rapid activation of N-Ras by alpha-thrombin in fibroblasts is mediated by the specific G-protein Galphai2-Gbeta1-Ggamma5 and occurs in lipid rafts. *Cell Signal.* 21, 1007-1014.
184. **Levi-Montalcini, R.** (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154-1162.
185. **Levi-Montalcini, R., Dal, T. R., della, V. F., Skaper, S. D. and Leon, A.** (1995). Update of the NGF saga. *J. Neurol. Sci.* 130, 119-127.
186. **Levy, W. B., Haycock, J. W. and Cotman, C. W.** (1976). Stimulation-dependent depression of readily releasable neurotransmitter pools in brain. *Brain Res.* 115, 243-256.
187. **Lewin, G. R.** (1996). Neurotrophins and the specification of neuronal phenotype. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 351, 405-411.
188. **Lewin, G. R. and Barde, Y. A.** (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 289-317.
189. **Leyton, L., Schneider, P., Labra, C. V., Ruegg, C., Hetz, C. A., Quest, A. F. and Bron, C.** (2001). Thy-1 binds to integrin beta(3) on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. *Curr. Biol.* 11, 1028-1038.
190. **Li, S., Couet, J. and Lisanti, M. P.** (1996a). Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 29182-29190.
191. **Li, S., Song, K. S. and Lisanti, M. P.** (1996b). Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J. Biol. Chem.* 271, 568-573.
192. **Liang, N. Y., Hower, J. A. and Borchardt, R. T.** (1985). Release of endogenous brain epinephrine by the calcium ionophores X537A and A23187. *Brain Res.* 341, 297-302.

193. **Liang, X., Lu, Y., Neubert, T. A. and Resh, M. D.** (2002). Mass spectrometric analysis of GAP-43/neuromodulin reveals the presence of a variety of fatty acylated species. *J. Biol. Chem.* 277, 33032-33040.
194. **Liang, X., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Bornmann, W., Tempst, P. and Resh, M. D.** (2001). Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 276, 30987-30994.
195. **Linder, M. E. and Deschenes, R. J.** (2003). New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* 42, 4311-4320.
196. **Linder, M. E., Middleton, P., Hepler, J. R., Taussig, R., Gilman, A. G. and Mumby, S. M.** (1993). Lipid modifications of G proteins: alpha subunits are palmitoylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 3675-3679.
197. **Liu, Y., Fisher, D. A. and Storm, D. R.** (1994). Intracellular sorting of neuromodulin (GAP-43) mutants modified in the membrane targeting domain. *J. Neurosci.* 14, 5807-5817.
198. **Liu, Y. C., Chapman, E. R. and Storm, D. R.** (1991). Targeting of neuromodulin (GAP-43) fusion proteins to growth cones in cultured rat embryonic neurons. *Neuron* 6, 411-420.
199. **Lobo, S., Greentree, W. K., Linder, M. E. and Deschenes, R. J.** (2002). Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277, 41268-41273.
200. **Lodish, H. F., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A. and Krieger, M.** (2008). *Molecular Cell Biology*. P.
201. **Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M. and varez-Buylla, A.** (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981.
202. **Lovinger, D. M., Colley, P. A., Akers, R. F., Nelson, R. B. and Routtenberg, A.** (1986). Direct relation of long-term synaptic potentiation to phosphorylation of membrane protein F1, a substrate for membrane protein kinase C. *Brain Res.* 399, 205-211.
203. **Low, M. G. and Kincade, P. W.** (1985). Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein. *Nature* 318, 62-64.
204. **Luckenbill-Edds, L.** (1997). Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 23, 1-27.
205. **Luo, L. and O'Leary, D. D.** (2005). Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 127-156.
206. **Madore, N., Smith, K. L., Graham, C. H., Jen, A., Brady, K., Hall, S. and Morris, R.** (1999). Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J.* 18, 6917-6926.

207. **Madura, T., Yamashita, T., Kubo, T., Tsuji, L., Hosokawa, K. and Tohyama, M.** (2004). Changes in mRNA of Slit-Robo GTPase-activating protein 2 following facial nerve transection. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 123, 76-80.
208. **Maekawa, S., Kumanogoh, H., Funatsu, N., Takei, N., Inoue, K., Endo, Y., Hamada, K. and Sokawa, Y.** (1997). Identification of NAP-22 and GAP-43 (neuromodulin) as major protein components in a Triton insoluble low density fraction of rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1323, 1-5.
209. **Maggi, D., Biedi, C., Segat, D., Barbero, D., Panetta, D. and Cordera, R.** (2002). IGF-I induces caveolin 1 tyrosine phosphorylation and translocation in the lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 1085-1089.
210. **Mahanthappa, N. K. and Patterson, P. H.** (1992a). Thy-1 involvement in neurite outgrowth: perturbation by antibodies, phospholipase C, and mutation. *Dev. Biol.* 150, 47-59.
211. **Mahanthappa, N. K. and Patterson, P. H.** (1992b). Thy-1 multimerization is correlated with neurite outgrowth. *Dev. Biol.* 150, 60-71.
212. **Maier, D. L., Mani, S., Donovan, S. L., Soppet, D., Tessarollo, L., McCasland, J. S. and Meiri, K. F.** (1999). Disrupted cortical map and absence of cortical barrels in growth-associated protein (GAP)-43 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 9397-9402.
213. **Makwana, M. and Raivich, G.** (2005). Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J.* 272, 2628-2638.
214. **Maness, P. F.** (1992). Nonreceptor protein tyrosine kinases associated with neuronal development. *Dev. Neurosci.* 14, 257-270.
215. **Maness, P. F. and Cox, M. E.** (1992). Protein tyrosine kinases in nervous system development. *Semin. Cell Biol.* 3, 117-126.
216. **Mansouri, M. R., Marklund, L., Gustavsson, P., Davey, E., Carlsson, B., Larsson, C., White, I., Gustavson, K. H. and Dahl, N.** (2005). Loss of ZDHHC15 expression in a woman with a balanced translocation t(X;15)(q13.3;cen) and severe mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet.* 13, 970-977.
217. **Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T. and Barbacid, M.** (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol. Cell Biol.* 9, 24-33.
218. **McCabe, J. B. and Berthiaume, L. G.** (2001). N-terminal protein acylation confers localization to cholesterol, sphingolipid-enriched membranes but not to lipid rafts/caveolae. *Mol. Biol. Cell* 12, 3601-3617.

219. **McLeod, M., Stein, M. and Beach, D.** (1987). The product of the *mei3+* gene, expressed under control of the mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. *EMBO J.* 6, 729-736.
220. **Meberg, P. J.** (2000). Signal-regulated ADF/cofilin activity and growth cone motility. *Mol. Neurobiol.* 21, 97-107.
221. **Meiri, K. F. and Burdick, D.** (1991). Nerve growth factor stimulation of GAP-43 phosphorylation in intact isolated growth cones. *J. Neurosci.* 11, 3155-3164.
222. **Meiri, K. F. and Gordon-Weeks, P. R.** (1990). GAP-43 in growth cones is associated with areas of membrane that are tightly bound to substrate and is a component of a membrane skeleton subcellular fraction. *J. Neurosci.* 10, 256-266.
223. **Micera, A., Lambiase, A., Aloe, L., Bonini, S., Levi-Schaffer, F. and Bonini, S.** (2004). Nerve growth factor involvement in the visual system: implications in allergic and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 411-417.
224. **Micera, A., Puxeddu, I., Aloe, L. and Levi-Schaffer, F.** (2003). New insights on the involvement of Nerve Growth Factor in allergic inflammation and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 369-374.
225. **Milligan, G., Parenti, M. and Magee, A. I.** (1995). The dynamic role of palmitoylation in signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* 20, 181-187.
226. **Monier, S., Parton, R. G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A. and Kurzchalia, T. V.** (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* 6, 911-927.
227. **Morris, R.** (1992). Thy-1, the enigmatic extrovert on the neuronal surface. *Bioessays* 14, 715-722.
228. **Morris, R. J., Tiveron, M. C. and Xue, G. P.** (1992). The relation of the expression and function of the neuronal glycoprotein Thy-1 to axonal growth. *Biochem. Soc. Trans.* 20, 401-405.
229. **Munro, S.** (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377-388.
230. **Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V. and Simons, K.** (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10339-10343.
231. **Neumann, S., Bradke, F., Tessier-Lavigne, M. and Basbaum, A. I.** (2002). Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* 34, 885-893.

232. **Neumann, S. and Woolf, C. J.** (1999). Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron* 23, 83-91.
233. **Nguyen, L., He, Q. and Meiri, K. F.** (2009). Regulation of GAP-43 at serine 41 acts as a switch to modulate both intrinsic and extrinsic behaviors of growing neurons, via altered membrane distribution. *Mol. Cell Neurosci.* 41, 62-73.
234. **Nicholls, D. G.** (2010). Stochastic aspects of transmitter release and bioenergetic dysfunction in isolated nerve terminals. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 457-459.
235. **Nielander, H. B., Schrama, L. H., van Rozen, A. J., Kasperaitis, M., Oestreicher, A. B., Gispen, W. H. and Schotman, P.** (1990). Mutation of serine 41 in the neuron-specific protein B-50 (GAP-43) prohibits phosphorylation by protein kinase C. *J. Neurochem.* 55, 1442-1445.
236. **Nilsson, A. S., Fainzilber, M., Falck, P. and Ibanez, C. F.** (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett.* 424, 285-290.
237. **Nishiyama, J. and Kuninori, T.** (1992). Assay of thiols and disulfides based on the reversibility of N-ethylmaleimide alkylation of thiols combined with electrolysis. *Anal. Biochem.* 200, 230-234.
238. **Noorbakhsh, F., Vergnolle, N., Hollenberg, M. D. and Power, C.** (2003). Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 981-990.
239. **Nosten-Bertrand, M., Errington, M. L., Murphy, K. P., Tokugawa, Y., Barboni, E., Kozlova, E., Michalovich, D., Morris, R. G., Silver, J., Stewart, C. L. et al.** (1996). Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1. *Nature* 379, 826-829.
240. **Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P.** (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 5419-5422.
241. **Onofri, F., Messa, M., Matafora, V., Bonanno, G., Corradi, A., Bachi, A., Valtorta, F. and Benfenati, F.** (2007). Synapsin phosphorylation by SRC tyrosine kinase enhances SRC activity in synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 282, 15754-15767.
242. **Oyama, T., Miyoshi, Y., Koyama, K., Nakagawa, H., Yamori, T., Ito, T., Matsuda, H., Arakawa, H. and Nakamura, Y.** (2000). Isolation of a novel gene on 8p21.3-22 whose expression is reduced significantly in human colorectal cancers with liver metastasis. *Genes Chromosomes. Cancer* 29, 9-15.

243. **Patanow, C. M., Day, J. R. and Billingsley, M. L.** (1997). Alterations in hippocampal expression of SNAP-25, GAP-43, stannin and glial fibrillary acidic protein following mechanical and trimethyltin-induced injury in the rat. *Neuroscience* 76, 187-202.
244. **Patterson, S. I.** (2002). Posttranslational protein S-palmitoylation and the compartmentalization of signaling molecules in neurons. *Biol. Res.* 35, 139-150.
245. **Patterson, S. I. and Skene, J. H.** (1994). Novel inhibitory action of tunicamycin homologues suggests a role for dynamic protein fatty acylation in growth cone-mediated neurite extension. *J. Cell Biol.* 124, 521-536.
246. **Patterson, S. I. and Skene, J. H.** (1997). Long-Chain Fatty Acylation of Proteins. In *Neuromethods* (ed. H. C. Hemmings): Human Press Inc.
247. **Patterson, S. I. and Skene, J. H.** (1999). A shift in protein S-palmitoylation, with persistence of growth-associated substrates, marks a critical period for synaptic plasticity in developing brain. *J. Neurobiol.* 39, 423-437.
248. **Paves, H. and Saarma, M.** (1997). Neurotrophins as in vitro growth cone guidance molecules for embryonic sensory neurons. *Cell Tissue Res.* 290, 285-297.
249. **Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K. et al.** (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273, 14037-14045.
250. **Perlson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R. and Fainzilber, M.** (2005). Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 45, 715-726.
251. **Polo-Parada, L., Bose, C. M. and Landmesser, L. T.** (2001). Alterations in transmission, vesicle dynamics, and transmitter release machinery at NCAM-deficient neuromuscular junctions. *Neuron* 32, 815-828.
252. **Povelones, M., Tran, K., Thanos, D. and Ambron, R. T.** (1997). An NF-kappaB-like transcription factor in axoplasm is rapidly inactivated after nerve injury in Aplysia. *J. Neurosci.* 17, 4915-4920.
253. **Prescott, G. R., Gorleku, O. A., Greaves, J. and Chamberlain, L. H.** (2009). Palmitoylation of the synaptic vesicle fusion machinery. *J. Neurochem.* 110, 1135-1149.
254. **Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O. and Williams, S. M.** (2007). *Neurociencia*. Editorial Médica Panamericana.
255. **Quesnel, S. and Silvius, J. R.** (1994). Cysteine-containing peptide sequences exhibit facile uncatalyzed transacylation and acyl-CoA-dependent acylation at the lipid bilayer interface. *Biochemistry* 33, 13340-13348.

256. **Raymond, F. L., Tarpey, P. S., Edkins, S., Tofts, C., O'Meara, S., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Barthorpe, S., Buck, G. et al.** (2007). Mutations in ZDHHC9, which encodes a palmitoyltransferase of NRAS and HRAS, cause X-linked mental retardation associated with a Marfanoid habitus. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 982-987.
257. **Reed, P. W. and Lardy, H. A.** (1972). A23187: a divalent cation ionophore. *J. Biol. Chem.* 247, 6970-6977.
258. **Rege, T. A. and Hagood, J. S.** (2006a). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J.* 20, 1045-1054.
259. **Rege, T. A. and Hagood, J. S.** (2006b). Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 991-999.
260. **Rehder, V., Jensen, J. R. and Kater, S. B.** (1992). The initial stages of neural regeneration are dependent upon intracellular calcium levels. *Neuroscience* 51, 565-574.
261. **Resh, M. D.** (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 1-16.
262. **Robbins, S. M., Quintrell, N. A. and Bishop, J. M.** (1995). Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol. Cell Biol.* 15, 3507-3515.
263. **Roper, K., Corbeil, D. and Huttner, W. B.** (2000). Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat. Cell Biol.* 2, 582-592.
264. **Roth, A. F., Wan, J., Bailey, A. O., Sun, B., Kuchar, J. A., Green, W. N., Phinney, B. S., Yates, J. R., III and Davis, N. G.** (2006). Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell* 125, 1003-1013.
265. **Routtenberg, A., Cantalops, I., Zaffuto, S., Serrano, P. and Namgung, U.** (2000). Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 7657-7662.
266. **Roux, P. P. and Barker, P. A.** (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 67, 203-233.
267. **Saalbach, A., Kraft, R., Herrmann, K., Hausteil, U. F. and Anderegg, U.** (1998). The monoclonal antibody AS02 recognizes a protein on human fibroblasts being highly homologous to Thy-1. *Arch. Dermatol. Res.* 290, 360-366.
268. **Saalbach, A., Wetzig, T., Hausteil, U. F. and Anderegg, U.** (1999). Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA. Fibroblasts and activated

endothelial cells are a possible source of soluble Thy-1 in serum. *Cell Tissue Res.* 298, 307-315.

269. **Salani, B., Briatore, L., Contini, P., Passalacqua, M., Melloni, E., Paggi, A., Cordera, R. and Maggi, D.** (2009). IGF-I induced rapid recruitment of integrin beta1 to lipid rafts is Caveolin-1 dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 489-492.
270. **Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K. S., Sanders, M. C. and Lisanti, M. P.** (1995). Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9407-9411.
271. **Schaffer, W. T. and Olson, M. S.** (1976). Chlorotetracycline-associated fluorescence changes during calcium uptake and release by rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 27, 1319-1325.
272. **Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R. and Serafini, T.** (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101, 657-669.
273. **Scherer, P. E., Lewis, R. Y., Volonte, D., Engelman, J. A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D. S., van, D. E., Peters, P. and Lisanti, M. P.** (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 29337-29346.
274. **Scherer, P. E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H. F. and Lisanti, M. P.** (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 131-135.
275. **Scherer, P. E., Tang, Z., Chun, M., Sargiacomo, M., Lodish, H. F. and Lisanti, M. P.** (1995). Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* 270, 16395-16401.
276. **Schorn, K. and Marsh, D.** (1996). Lipid chain dynamics and molecular location of diacylglycerol in hydrated binary mixtures with phosphatidylcholine: spin label ESR studies. *Biochemistry* 35, 3831-3836.
277. **Schreyer, D. J. and Skene, J. H.** (1991). Fate of GAP-43 in ascending spinal axons of DRG neurons after peripheral nerve injury: delayed accumulation and correlation with regenerative potential. *J. Neurosci.* 11, 3738-3751.
278. **Schuster, T., Krug, M., Hassan, H. and Schachner, M.** (1998). Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM180 following long-term potentiation. *J. Neurobiol.* 37, 359-372.

279. **Schwaiger, F. W., Hager, G., Schmitt, A. B., Horvat, A., Hager, G., Streif, R., Spitzer, C., Gamal, S., Breuer, S., Brook, G. A. et al.** (2000). Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT). *Eur. J. Neurosci.* 12, 1165-1176.
280. **Seki, T. and Arai, Y.** (1993). Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J. Neurosci.* 13, 2351-2358.
281. **Shadiack, A. M., Sun, Y. and Zigmond, R. E.** (2001). Nerve growth factor antiserum induces axotomy-like changes in neuropeptide expression in intact sympathetic and sensory neurons. *J. Neurosci.* 21, 363-371.
282. **Shen, Y., Mani, S., Donovan, S. L., Schwob, J. E. and Meiri, K. F.** (2002). Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J. Neurosci.* 22, 239-247.
283. **Shenoy-Scaria, A. M., Kwong, J., Fujita, T., Olszowy, M. W., Shaw, A. S. and Lublin, D. M.** (1992). Signal transduction through decay-accelerating factor. Interaction of glycosyl-phosphatidylinositol anchor and protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn 1. *J. Immunol.* 149, 3535-3541.
284. **Sheu, F. S., Kasamatsu, T. and Routtenberg, A.** (1990a). Protein kinase C activity and substrate (F1/GAP-43) phosphorylation in developing cat visual cortex. *Brain Res.* 524, 144-148.
285. **Sheu, F. S., Marais, R. M., Parker, P. J., Bazan, N. G. and Routtenberg, A.** (1990b). Neuron-specific protein F1/GAP-43 shows substrate specificity for the beta subtype of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 1236-1243.
286. **Simon, P. D., McConnell, J., Zurakowski, D., Vorwerk, C. K., Naskar, R., Grosskreutz, C. L. and Dreyer, E. B.** (1999). Thy-1 is critical for normal retinal development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 117, 219-223.
287. **Sinensky, M.** (2000). Functional aspects of polyisoprenoid protein substituents: roles in protein-protein interaction and trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 203-209.
288. **Singaraja, R. R., Hadano, S., Metzler, M., Givan, S., Wellington, C. L., Warby, S., Yanai, A., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Yi, H. et al.** (2002). HIP14, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2815-2828.
289. **Singer, S. J. and Nicolson, G. L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
290. **Skene, J. H.** (1989). Axonal growth-associated proteins. *Annu. Rev. Neurosci.* 12, 127-156.

291. **Skene, J. H. and Virag, I.** (1989). Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. *J. Cell Biol.* 108, 613-624.
292. **Smith-Swintosky, V. L., Zimmer, S., Fenton, J. W. and Mattson, M. P.** (1995). Protease nexin-1 and thrombin modulate neuronal Ca²⁺ homeostasis and sensitivity to glucose deprivation-induced injury. *J. Neurosci.* 15, 5840-5850.
293. **Smotrys, J. E., Schoenfish, M. J., Stutz, M. A. and Linder, M. E.** (2005). The vacuolar DHHC-CRD protein Pfa3p is a protein acyltransferase for Vac8p. *J. Cell Biol.* 170, 1091-1099.
294. **Snider, W. D.** (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77, 627-638.
295. **Sofroniew, M. V., Howe, C. L. and Mobley, W. C.** (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1217-1281.
296. **Sretavan, D. W. and Kruger, K.** (1998). Randomized retinal ganglion cell axon routing at the optic chiasm of GAP-43-deficient mice: association with midline recrossing and lack of normal ipsilateral axon turning. *J. Neurosci.* 18, 10502-10513.
297. **Stoll, G. and Muller, H. W.** (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol.* 9, 313-325.
298. **Strigow, F., Riek, M., Breder, J., Henrich-Noack, P., Reymann, K. G. and Reiser, G.** (2000). The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 2264-2269.
299. **Strittmatter, S. M., Cannon, S. C., Ross, E. M., Higashijima, T. and Fishman, M. C.** (1993). GAP-43 augments G protein-coupled receptor transduction in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 5327-5331.
300. **Strittmatter, S. M., Fankhauser, C., Huang, P. L., Mashimo, H. and Fishman, M. C.** (1995). Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. *Cell* 80, 445-452.
301. **Suzuki, Y., Nakagomi, S., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Inagaki, N., Kaibuchi, K., Aizawa, H., Kikuchi, K. and Kiyama, H.** (2003). Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured motor neurons of rat. *J. Neurochem.* 86, 1042-1050.
302. **Tamura, K., Shan, W. S., Hendrickson, W. A., Colman, D. R. and Shapiro, L.** (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N)-cadherin. *Neuron* 20, 1153-1163.

303. **Taniguchi, H.** (1999). Protein myristoylation in protein-lipid and protein-protein interactions. *Biophys. Chem.* 82, 129-137.
304. **Tejero-Diez, P., Rodriguez-Sanchez, P. and ez-Guerra, F. J.** (1999). Microscale purification of proteins exhibiting anomalous electrophoretic migration: application to the analysis of GAP-43 phosphorylation. *Anal. Biochem.* 274, 278-282.
305. **Thomas, S. M. and Brugge, J. S.** (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513-609.
306. **Tiveron, M. C., Barboni, E., Pliego Rivero, F. B., Gormley, A. M., Seeley, P. J., Grosveld, F. and Morris, R.** (1992). Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein. *Nature* 355, 745-748.
307. **Tiveron, M. C., Nosten-Bertrand, M., Jani, H., Garnett, D., Hirst, E. M., Grosveld, F. and Morris, R. J.** (1994). The mode of anchorage to the cell surface determines both the function and the membrane location of Thy-1 glycoprotein. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 7), 1783-1796.
308. **Tong, J., Nguyen, L., Vidal, A., Simon, S. A., Skene, J. H. and McIntosh, T. J.** (2008). Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to Raft bilayers. *Biophys. J.* 94, 125-133.
309. **Trenchi, A., Gomez, G. A. and Daniotti, J. L.** (2009). Dual acylation is required for trafficking of growth-associated protein-43 (GAP-43) to endosomal recycling compartment via an Arf6-associated endocytic vesicular pathway. *Biochem. J.* 421, 357-369.
310. **Tsutsumi, R., Fukata, Y. and Fukata, M.** (2008). Discovery of protein-palmitoylating enzymes. *Pflugers Arch.* 456, 1199-1206.
311. **Tucker, B. A., Rahimtula, M. and Mearow, K. M.** (2008). Src and FAK are key early signalling intermediates required for neurite growth in NGF-responsive adult DRG neurons. *Cell Signal.* 20, 241-257.
312. **Uittenbogaard, A. and Smart, E. J.** (2000). Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J. Biol. Chem.* 275, 25595-25599.
313. **Van Hooff, C. O., De Graan, P. N., Boonstra, J., Oestreicher, A. B., Schmidt-Michels, M. H. and Gispen, W. H.** (1986). Nerve growth factor enhances the level of the protein kinase C substrate B-50 in pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 644-651.
314. **Van Hooff, C. O., Holthuis, J. C., Oestreicher, A. B., Boonstra, J., De Graan, P. N. and Gispen, W. H.** (1989). Nerve growth factor-induced changes in the intracellular localization of the protein kinase C substrate B-50 in pheochromocytoma PC12 cells. *J. Cell Biol.* 108, 1115-1125.

315. **van Meer, G., Voelker, D. R. and Feigenson, G. W.** (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112-124.
316. **van't, H. W. and Resh, M. D.** (1997). Rapid plasma membrane anchoring of newly synthesized p59^{fyn}: selective requirement for NH₂-terminal myristoylation and palmitoylation at cysteine-3. *J. Cell Biol.* 136, 1023-1035.
317. **van't, H. W. and Resh, M. D.** (1999). Dual fatty acylation of p59(Fyn) is required for association with the T cell receptor zeta chain through phosphotyrosine-Src homology domain-2 interactions. *J. Cell Biol.* 145, 377-389.
318. **Verhaagen, J., Van Hooff, C. O., Edwards, P. M., De Graan, P. N., Oestreicher, A. B., Schotman, P., Jennekens, F. G. and Gispen, W. H.** (1986). The kinase C substrate protein B-50 and axonal regeneration. *Brain Res. Bull.* 17, 737-741.
319. **Vinson, M., Rausch, O., Maycox, P. R., Prinjha, R. K., Chapman, D., Morrow, R., Harper, A. J., Dingwall, C., Walsh, F. S., Burbidge, S. A. et al.** (2003). Lipid rafts mediate the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 22, 344-352.
320. **Wallquist, W., Patarroyo, M., Thams, S., Carlstedt, T., Stark, B., Cullheim, S. and Hammarberg, H.** (2002). Laminin chains in rat and human peripheral nerve: distribution and regulation during development and after axonal injury. *J. Comp Neurol.* 454, 284-293.
321. **Wang, H., Ubl, J. J., Stricker, R. and Reiser, G.** (2002). Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 283, C1351-C1364.
322. **Washbourne, P.** (2004). Greasing transmission: palmitoylation at the synapse. *Neuron* 44, 901-902.
323. **Washbourne, P., Cansino, V., Mathews, J. R., Graham, M., Burgoyne, R. D. and Wilson, M. C.** (2001). Cysteine residues of SNAP-25 are required for SNARE disassembly and exocytosis, but not for membrane targeting. *Biochem. J.* 357, 625-634.
324. **Washbourne, P., Dityatev, A., Scheiffele, P., Biederer, T., Weiner, J. A., Christopherson, K. S. and El-Husseini, A.** (2004). Cell adhesion molecules in synapse formation. *J. Neurosci.* 24, 9244-9249.
325. **Wertz, S. L., Savino, Y. and Cafiso, D. S.** (1996). Solution and membrane bound structure of a peptide derived from the protein kinase C substrate domain of neuromodulin. *Biochemistry* 35, 11104-11112.

326. **Widmer, F. and Caroni, P.** (1993). Phosphorylation-site mutagenesis of the growth-associated protein GAP-43 modulates its effects on cell spreading and morphology. *J. Cell Biol.* 120, 503-512.
327. **Wiese, S., Metzger, F., Holtmann, B. and Sendtner, M.** (1999). The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1668-1676.
328. **Williams, A. F. and Gagnon, J.** (1982). Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin. *Science* 216, 696-703.
329. **Wolven, A., Okamura, H., Rosenblatt, Y. and Resh, M. D.** (1997). Palmitoylation of p59fyn is reversible and sufficient for plasma membrane association. *Mol. Biol. Cell* 8, 1159-1173.
330. **Wonnacott, S., Marchbanks, R. M. and Fiol, C.** (1978). Ca²⁺ uptake by synaptosomes and its effect on the inhibition of acetylcholine release by botulinum toxin. *J. Neurochem.* 30, 1127-1134.
331. **Xi, G., Wagner, K. R., Keep, R. F., Hua, Y., de Court, Broderick, J. P., Brott, T. G. and Hoff, J. T.** (1998). Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 29, 2580-2586.
332. **Xue, G. P., Rivero, B. P. and Morris, R. J.** (1991). The surface glycoprotein Thy-1 is excluded from growing axons during development: a study of the expression of Thy-1 during axogenesis in hippocampus and hindbrain. *Development* 112, 161-176.
333. **Yamada, S. and Nelson, W. J.** (2007). Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 267-294.
334. **Yan, Q., Elliott, J. and Snider, W. D.** (1992). Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature* 360, 753-755.
335. **Yanai, A., Huang, K., Kang, R., Singaraja, R. R., Arstikaitis, P., Gan, L., Orban, P. C., Mullard, A., Cowan, C. M., Raymond, L. A. et al.** (2006). Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nat. Neurosci.* 9, 824-831.
336. **Yang, Y., Akiyama, H., Fenton, J. W. and Brewer, G. J.** (1997). Thrombin receptor on rat primary hippocampal neurons: coupled calcium and cAMP responses. *Brain Res.* 761, 11-18.
337. **Yap, A. S., Niessen, C. M. and Gumbiner, B. M.** (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J. Cell Biol.* 141, 779-789.

338. **Zakharov, V. V., Bogdanova, M. N. and Mosevitsky, M. I.** (2005). Specific proteolysis of neuronal protein GAP-43 by calpain: characterization, regulation, and physiological role. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 897-907.
339. **Zakharov, V. V. and Mosevitsky, M. I.** (2007). M-calpain-mediated cleavage of GAP-43 near Ser41 is negatively regulated by protein kinase C, calmodulin and calpain-inhibiting fragment GAP-43-3. *J. Neurochem.* 101, 1539-1551.
340. **Zhao, Y. L., Takagawa, K., Oya, T., Yang, H. F., Gao, Z. Y., Kawaguchi, M., Ishii, Y., Sasaoka, T., Owada, K., Furuta, I. et al.** (2003). Active Src expression is induced after rat peripheral nerve injury. *Glia* 42, 184-193.
341. **Zhou, F. Q., Walzer, M., Wu, Y. H., Zhou, J., Dedhar, S. and Snider, W. D.** (2006). Neurotrophins support regenerative axon assembly over CSPGs by an ECM-integrin-independent mechanism. *J. Cell Sci.* 119, 2787-2796.
342. **Zhou, F. Q., Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y. H. and Snider, W. D.** (2004). NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 β and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42, 897-912.
343. **Zhu, Q. and Julien, J. P.** (1999). A key role for GAP-43 in the retinotectal topographic organization. *Exp. Neurol.* 155, 228-242.
344. **Ziv, N. E. and Spira, M. E.** (1997). Localized and transient elevations of intracellular Ca²⁺ induce the dedifferentiation of axonal segments into growth cones. *J. Neurosci.* 17, 3568-3579.
345. **Zou, L. L., Huang, L., Hayes, R. L., Black, C., Qiu, Y. H., Perez-Polo, J. R., Le, W., Clifton, G. L. and Yang, K.** (1999). Liposome-mediated NGF gene transfection following neuronal injury: potential therapeutic applications. *Gene Ther.* 6, 994-1005.
346. **Zoubine, M. N., Ma, J. Y., Smirnova, I. V., Citron, B. A. and Festoff, B. W.** (1996). A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle. *Dev. Biol.* 179, 447-457.
347. **Zuber, M. X., Strittmatter, S. M. and Fishman, M. C.** (1989). A membrane-targeting signal in the amino terminus of the neuronal protein GAP-43. *Nature* 341, 345-348.