

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Universidad de Chile

“Estudio de la vía de señalización asociada a la retracción/inhibición de crecimiento neurítico, mediada por las interacciones $\alpha\beta 3$ /Thy-1 en cultivos neuronales”.

**Laboratorio de Comunicaciones Celulares, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile**

Memoria para optar al grado de Doctor en Bioquímica.
Por

Horacio Javier Maldonado Lorca

DIRECTOR(ES) DE TESIS

Dra. Lisette Leyton

Dr. Andrew Quest

Santiago de Chile, 2015

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Informe de Aprobación

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis de Doctorado presentada por el candidato:

HORACIO JAVIER MALDONADO LORCA

Ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Bioquímica en el examen de defensa de tesis rendido el día.....

Directores de Tesis

Dra. Lisette Leyton.

Dr. Andrew Quest

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Mario Chiong

Dra. Jenny Fiedler

Dr. Andres Couve

Dra. Alejandra Alvarez

**Esta tesis está dedicada a mi
Madre, sin quien este sueño hoy no
sería posible.**

Agradecimientos

Son muchas las personas a quienes quiero agradecer por brindarme su apoyo durante el desarrollo de esta tesis, gracias a los cuales no solo he crecido profesionalmente sino también como persona. En primer lugar me gustaría agradecer a mis tutores la Dra. Lisette Leyton y el Dr. Andrew Quest, quienes me acogieron en su laboratorio y me han guiado este camino muchas veces preocupándose más allá del deber, potenciando mis fortalezas y haciendo notar mis debilidades para crecer. Gracias estimados jefes por toda su comprensión, no podría haberlo logrado sin ustedes. Quiero agradecer también a todos mis compañeros de laboratorio, quienes me han brindado su apoyo y alegría. Particularmente, quisiera agradecer a mi compañera y amiga Natalia Díaz por su amistad y profesionalismo. A Pamela Orellana por su soporte en el laboratorio, su amistad y alegría. De igual manera muchas gracias Valeska Cifuentes y Lilian Corona por su ayuda y apoyo incondicional. Quiero agradecer también a mis compañeros de grupo Thy-1neses. Y hacer una mención especial a los miembros de mi comisión gracias por sus consejos y paciencia. Al Dr. Rodrigo Herrera, quien me recibió en Alemania y me apoyó en cultivos primarios. A mi querida amiga la Dra. Alejandra Valdivia, quien fue la primera en recibirme y aconsejarme en el laboratorio de Comunicaciones Celulares. Finalmente, una mención muy especial a mis padres, gracias por apoyarme en mi sueño de ser científico todos estos años.

Los resultados generados de la presente Tesis dieron origen total o parcial a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos a la fecha.

Publicaciones

- Cárdenas A., Kong M., Alvarez A., Maldonado H., Leyton L.” Signaling pathways involved in neuron-astrocyte adhesion and migration”. Curr Mol Med. 2014 Feb;14(2):275-90.
- Herrera-Molina R, Frischknecht R, Maldonado H, Seidenbecher CI, Gundelfinger ED, Hetz C, Aylwin Mde L, Schneider P, Quest AF, Leyton L. Astrocytic $\alpha V\beta 3$ integrin inhibits neurite outgrowth and promotes retraction of neuronal processes by clustering Thy-1. PLoS One. 2012;7(3):e34295.

Presentaciones a congresos

- Maldonado, H., Herrera-Molina, R., Quest, A.F.G., Leyton, L. “Csk-Binding-Protein mediates Thy-1 signaling and neurite retraction caused by astrocyte $\alpha V\beta 3$ -integrin in neuronal cultures”. Annual meeting ASCB/ifcb 6-10 Diciembre 2014, Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos.
- Maldonado, H., Herrera-Molina, R., Quest, A.F.G., Leyton, L. “Astrocyte $\alpha V\beta 3$ -integrin engages neuronal Thy-1 and induces neurite retraction via CBP-mediated Src inactivation and ROCK pathway activation”. XII PABMB congress, XXXVI Annual meeting Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, XLIX Annual meeting Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular, LVI Annual meeting Sociedad de Biología de

Chile, 4th Latin American protein Society meeting, 9-14 Noviembre 2013, Puerto Varas, Chile.

- **Maldonado, H.**, Ramirez, O., Häertel, S., Quest, A.F.G., Leyton, L. “ $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -integrin induces neuronal retraction by increasing Thy-1-CBP interaction and Src inactivation”. XXVI Congreso anual Sociedad de Biología Celular de Chile, 23-27 octubre 2012, Puerto Varas, Chile.

Estadías en el extranjero

- Leibniz-Institute for Neurobiology LIN, Magdeburgo, Alemania, Enero-Mayo 2013.
- Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, Marzo 2014.

Financiamiento

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Contó con el financiamiento de: Proyectos Fondecyt 1090071, 1110149 y 1130250; Iniciativa Científica Milenio (ICM) grant P09-015-F, Conicyt-FONDAP 15010006, 15130011 y ACT1111, Beca Conicyt programa Doctoral, Becas Chile, beca apoyo de Tesis.

Índice General

Contenido

Agradecimientos	iv
Financiamiento.....	vii
Índice General.....	viii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tablas	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen.....	xv
Summary	xvii
1- Introducción.....	1
1.1- Thy-1, características y funciones celulares descritas.	1
1.2- Señalización celular río abajo de Thy-1(cis).	6
1.3- Thy-1 y quinasas de la familia de Src.....	8
1.4- CBP y p75 dos posibles candidatas para transducir la señalización río abajo de Thy-1 en neuronas.	11
1.5- Rol de Thy-1 en neuronas.....	15
1.6- Vías de señalización asociadas a retracción de neuritas y cambios en el citoesqueleto de actina.	16
2- Hipótesis.....	22
3- Objetivo General.....	22
3.1- Objetivos Específicos	22
4- Materiales y métodos.....	24
4.1- Materiales y reactivos	24
4.2- Cultivos celulares y obtención de cultivos primarios.	26
4.3- Silenciamiento de CBP en células CAD.....	28
4.4- Obtención de proteína recombinante $\alpha\beta 3$ -Fc.....	28
4.5- Ensayos de retracción de procesos neuronales en células CAD y en cultivos corticales de rata.	30
4.6- Inmunofluorescencia indirecta.....	31

4.7- Ensayos de microscopía de lapsos de tiempo <i>in situ</i> y evaluación de velocidad de crecimiento de neuritas.	32
4.8- Ensayos de inmunoprecipitación con proteína A-sefariosa.	33
4.9- Obtención de proteínas recombinante GST-RBD.	34
4.10- Ensayos de precipitación por afinidad e inmunofluorescencia para RhoA activo.....	35
4.11- Análisis por Western Blot.....	36
4.12- Cuantificación de proteínas.	39
4.13- Purificación y cuantificación de plasmidios.	39
4.14- Inmunoprecipitación y análisis por Maldi-Tof.	39
4.15- Análisis estadísticos.....	40
5-Resultados.....	42
5.1- Resultados objetivo específico número 1: “Evaluar la inhibición de Src y activación de las vías RhoA/ROCK/LIMK/Cofilina y RhoA/ROCK/MLCII en la retracción neurítica e inhibición del crecimiento mediada por integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1 en células CAD”.....	42
5.1.1-Estudio de la retracción de neuritas en células CAD diferenciadas.....	42
5.1.2- Evaluación de la participación de Src en la retracción de neuritas mediada por Integrina $\alpha\beta3$ -Fc.....	44
5.1.3- Evaluación de la participación de RhoA en la retracción de neuritas mediada por Integrina $\alpha\beta3$ -Fc.....	47
5.1.4- Evaluación de la activación de la vía de ROCK en la retracción de neuritas mediada por Integrina $\alpha\beta3$ -Fc.	49
5.2- Resultados objetivo específico número 2: “Identificar proteína(s) adaptadora(s) y evaluar su requerimiento en la inhibición de Src mediada por integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1 en células CAD”.	55
5.2.1- Evaluación de p75, CBP y Thy-1 por inmunoprecipitación en células CAD.....	55
5.2.2- Análisis de inmunoprecipitados de Thy-1 por espectrometría de masas.....	57
5.2.3- Evaluación de la co-localización entre Thy-1, CBP y Src en neuritas de células CAD.	59
5.2.4- Evaluación del requerimiento de CBP en la retracción mediada por Integrina $\alpha\beta3$ en células CAD.	60
5.2.5- Evaluación del requerimiento de CBP en la vía de señalización río abajo de Thy-1 en células CAD estimuladas con Integrina $\alpha\beta3$	64

5.3- Resultados objetivo específico número 3: “Evaluar la inhibición de Src y activación de las vías RhoA/ROCK/LIMK/Cofilina y RhoA/ROCK/MLCII, y requerimiento de proteína adaptadora en la retracción neurítica e inhibición del crecimiento mediada por integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1 en cultivos neuronales primarios”.....	67
5.3.1- Estudio de la retracción de procesos neuronales y formación de clusters de Thy-1 en neuronas corticales de rata.	67
5.3.2- Análisis del grado de fosforilación inhibitoria de Src y su distribución con Thy-1. .	69
5.3.3- Estudio de co-precipitación de Thy-1, CBP, Src y Csk en neuronas corticales.	72
5.3.4- Análisis de la co-localización de Thy-1, CBP, Src y Csk por microscopía STED.	74
5.3.5- Analisis del grado de fosforilación de p190RhoGAP.....	77
5.3.6- Análisis de la fosforilación de efectores río abajo de ROCK (MLCII, Cofilina y LimK).....	79
6-Discusión.	81
6.1- Relación entre Thy-1 y Src en la retracción de neuritas.	81
6.2- CBP y su requerimiento como proteína adaptadora de Thy-1.....	83
6.3- Estudio de la formación del complejo de membrana compuesto por Thy-1, CBP y Src..	85
6.4- Relación entre la activación de RhoA, ROCK y la inactivación de Src.	90
6.5-Mecanismo molecular propuesto.	91
6.6- Relevancia y proyecciones del trabajo.....	92
7-Bibliografía.....	99

Índice de Figuras

Figura 1: Representación esquemática en 3D de la estructura de Thy-1.	3
Figura 2: Interacción entre Thy-1 e Integrinas genera respuestas celulares bi-direccionales.	6
Figura 3: Representación esquemática de activación de quinasas de la familia de Src.	10
Figura 4 : Potenciales mecanismos de transducción de señal desde Thy-1 a quinasas de la familia de Src.	11
Figura 5: Representación esquemática de la estructura de CBP.	13
Figura 6: Esquema de activación de RhoA y principales moléculas involucradas.	18
Figura 7: La interacción entre Thy-1 neuronal y la integrina $\alpha\beta3$ presente en astrocitos causa inhibición del crecimiento/retracción de neuritas por una vía asociada a Src/RhoA /Cofilina.	20
Figura 8: Integrina $\alpha\beta3$ causa retracción de neuritas:	44
Figura 9: Integrina $\alpha\beta3$ incrementa la fosforilación inhibitoria de Src y disminuye la fosforilación activadora de Src.	46
Figura 10: El uso de SrcCA bloquea la retracción de neuritas causada por Integrina $\alpha\beta3$	47
Figura 11: Integrina $\alpha\beta3$ incrementa la activación de RhoA en células CAD.	51
Figura 12: La activación de RhoA es requerida en retracción de neuritas causada por Integrina $\alpha\beta3$	53
Figura 13: La inhibición de ROCK bloquea la retracción de neuritas causada por Integrina $\alpha\beta3$	53
Figura 14: Integrina $\alpha\beta3$ aumenta las fosforilaciones de MLCII y Cofilina en células CAD.	54
Figura 15: CBP, pero no p75, co-precipita con Thy-1 en células CAD.	56
Figura 16: Identificación por espectrometría de Masas de Thy-1 presente en células CAD.	58
Figura 17: La adición de Integrina $\alpha\beta3$ aumenta la co-localización entre Thy-1 y CBP.	61
Figura 18: La adición de Integrina $\alpha\beta3$ disminuye la co-localización entre CBP y Src.	62
Figura 19: El silenciamiento de CBP bloquea la retracción de neuritas causada por Integrina $\alpha\beta3$	63
Figura 20: El silenciamiento de CBP previene el aumento en la fosforilación inhibitoria de Src causado por Integrina.	65
Figura 21: El silenciamiento de CBP previene el aumento en la fosforilación de Cofilina causado por Integrina.	65
Figura 22: El silenciamiento de CBP previene el aumento en la fosforilación de MLCII causado por Integrina.	66
Figura 23: Integrina $\alpha\beta3$ causa inhibición de crecimiento de procesos neuronales.	68
Figura 24: Integrina $\alpha\beta3$ promueve el agrupamiento de Thy-1 en neuronas corticales.	70
Figura 25: La adición de Integrina $\alpha\beta3$ aumenta la fosforilación inhibitoria de Src en neuronas corticales.	71
Figura 26: Integrina $\alpha\beta3$ aumenta la co-localización entre Thy-1 y Src inactivo en neuronas corticales.	72

Figura 27: Thy-1, CBP, Src y Csk co-precipitan en neuronas corticales.....	73
Figura 28: Integrina $\alpha\beta 3$ aumenta la co-localización entre Thy-1 y CBP en neuronas corticales.	75
Figura 29: Integrina $\alpha\beta 3$ disminuye la co-localización entre CBP y Src en neuronas corticales.	76
Figura 30: Integrina $\alpha\beta 3$ aumenta la co-localización entre CBP y Csk en neuronas corticales.	77
Figura 31: La adición de Integrina $\alpha\beta 3$ disminuye la fosforilación en tirosina de p190RhoGAP.	78
Figura 32: La adición de Integrina $\alpha\beta 3$ incrementa las fosforilaciones de Cofilina, MLCII y LimK en neuronas corticales.	80
Figura 33: Regulación de Csk via CBP en lipid rafts.	90
Figura 34: Mecanismo molecular propuesto.....	93

Índice de Tablas

Tabla 1: listado de reactivos utilizados.....	24
Tabla 2: Resumen de anticuerpos primarios utilizados.....	37
Tabla 3: Resumen de anticuerpos Secundarios utilizados.	38
Tabla 4: Listado de proteínas que co-precipitan con Thy-1, detectadas por espectrometría de masas.....	59
Tabla 5: Distancia entre centros de masa de señales co-localizadas de Thy-1, CBP y Src pY527.	76

Abreviaturas

ANOVA	Análisis de varianza.
ATP	Adenosín tri-fosfato.
CBP	Proteína que une a Csk.
Csk	Quinasa del C-terminal de Src.
DRG	Ganglio de la raíz dorsal.
DMEM	Medio Dubelco modificado.
E18	Estadio 18 días.
FAK	Quinasa de adhesiones focales.
GAP	Proteína que activa GTPasas.
GDI	Inhibidor de disociación de nucleótidos de guanina.
GDP	Guanosin di-fosfato.
GEF	Intercambiador de nucleótidos de guanidina.
GFP	Proteína fluorescente verde.
GFP-RBD	Proteína fusión GFP-RBD.
GFP-RhoA-DN	RhoA dominante negativo, fusión GFP.
GPI	Glicosil fosfatidil inositol.
GSH	Glutación.
GST	Glutación S transferasa.
GST-RBD	Proteína fusión GST-RBD.
GTP	Guanosin tri-fosfato.
HBSS	Solución salina balanceada de Hank.
HEK	Células embrionarias de riñón humano.

HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana.
IgG	Inmunoglobulina G.
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2.
MLCII	Fragmento liviano de la Miosina II.
NP-40	Nonidet p-40.
PBS	Amortiguador de fosfato salino.
PKC	Proteína quinasa C.
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.
RBD	Dominio de unión a Rotekin.
ROCK	Quinasa de Rho.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SEM	Error estándar medio.
SFB	Suero fetal bovino.
SFKs	Quinasas de la familia de Src.
SH2	Dominio homólogo de Src 2.
SH3	Dominio homólogo de Src 3.
ShCBP	ShRNA contra el mensajero de CBP.
ShControl	ShRNA Control transfección.
ShRNA	Horquilla corta de ácido ribonucleico.
SNC	Sistema nervioso central.
SrcCA	Src constitutivo activo.
TSP-1	Trombospondina-1
WB	Western blot.

Resumen

Previamente describimos que la interacción entre Thy-1 neuronal y la integrina $\alpha\beta3$ presente en astrocitos aumenta la fosforilación inhibitoria de Src, provoca retracción de neuritas e inhibe el crecimiento de éstas. Sin embargo, Thy-1 es una proteína anclada a la membrana vía un glicoplípido (GPI) y carece de dominios transmembrana e intracelular, y por lo tanto no puede transducir señales al interior de la célula. Aquí, evaluamos si la proteína que une a Csk (CBP), una proteína de andamiaje para las quinasas de la familia de Src, actúa como un transductor de Thy-1 y estudiamos los acontecimientos de señalización río abajo que causan la retracción de las neuritas desencadenada por la interacción de Thy-1 con Integrina $\alpha\beta3$.

Para estudiar estas vías de señalización, se utilizaron dos modelos celulares diferentes. El primero de ellos fue células CAD; estas células se pueden diferenciar a un fenotipo neuronal por privación de suero. Luego estimulamos las células con la proteína fusión de Integrina $\alpha\beta3$ -Fc para estudiar su efecto. El segundo fue neuronas corticales de rata de 14 días en cultivo. Después de este período, también estimulamos añadiendo Integrina $\alpha\beta3$. En ambos modelos se analizó el efecto de Integrina en la composición del complejo de membrana conformado por Thy-1, CBP y Src. Realizamos ensayos de inmunoprecipitación, microscopía STED, análisis de inmunofluorescencia entre otros. La participación de CBP, Src y RhoA también se evaluaron con herramientas de biología molecular y además se analizó el estado de fosforilación de sus efectores.

Encontramos que Thy 1, CBP y Src forman un complejo funcional en los procesos neuronales que induce la inactivación de Src. Además, la adición de Integrina $\alpha\beta3$ aumentó la activación de RhoA y su efector ROCK, eventos que causan la retracción de las neuritas a través de la disrupción del citoesqueleto de actina. Por otro lado, la utilización de una construcción de Src constitutivamente activa o el silenciamiento de CBP bloqueó la retracción neuronal causado por la interacción con Integrina $\alpha\beta3$. Aquí, se propone un mecanismo molecular novedoso gatillado por la unión de Integrina $\alpha\beta3$ astrocitaria a Thy-1 que involucra el agrupamiento de Thy-1 y la formación de un complejo de membrana el que a través de la activación de RhoA/ROCK lleva a la retracción de las neuritas.

Una mejor comprensión de las vías de señalización implicadas en la comunicación celular entre las neuronas y astrocitos, que generan un ambiente no permisivo para la regeneración neuronal, debería ser útil en el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas para ayudar a re-establecer redes neuronales dañadas.

Summary

We have previously described that the interaction between neuronal Thy-1 and $\alpha\beta3$ -Integrin in astrocytes increases the inactivating phosphorylation of Src, causes neurite retraction and inhibits neurite outgrowth. Thy-1 is a GPI-anchored membrane protein, which lacks membrane-spanning and cytosolic domains and therefore cannot directly transduce signals to the cell interior. Thus, we evaluated whether Csk-Binding-Protein (CBP), a scaffolding protein for Src-family kinases, acts as a Thy-1 transducer and studied the downstream signaling events that cause neurite retraction triggered by Thy-1 interaction with $\alpha\beta3$ Integrin.

To study these signaling pathways, we used two different cellular models. The first one was CAD cells which can be differentiated to a neuronal phenotype by serum deprivation. Afterwards we added a fusion protein $\alpha\beta3$ Integrin-Fc. The second one was rat cortical neurons of 14 days in culture. Following this period, these cells were also stimulated the cells by adding the $\alpha\beta3$ Integrin. In both models we analyzed the effects of the Integrin the composition of the Thy-1, CBP and Src membrane complex. We performed immunoprecipitation assays, STED microscopy and immunofluorescence analysis among other assays. CBP, Src and RhoA participation was also evaluated using molecular biology approaches and by analyzing the phosphorylation state of downstream effectors.

We found that Thy-1, CBP and Src form a functional complex in neuronal processes that induces Src inactivation. Furthermore, treatment with $\alpha\beta3$ -Integrin increased the

activation of RhoA and its effector ROCK, both of which induce neurite retraction through the Actin cytoskeleton disruption. On the other hand, constitutively active Src or CBP abrogation prevented neuronal retraction caused by $\alpha\beta3$ Integrin engagement. Here, we propose a novel molecular mechanism triggered by the binding of astrocytic $\alpha\beta3$ Integrin to Thy-1 that involves Thy-1 clustering and the formation of a membrane complex with that through RhoA/ROCK activation leads to neurite retraction.

A better understanding of the signaling pathways involved in cellular communication between neurons and astrocytes that generate a non-permissive environment for neuronal regeneration should be helpful to develop new therapies to help re-establishing damaged neuronal networks.

1- Introducción

La capacidad regenerativa del sistema nervioso central (SNC) adulto es muy limitada. Durante el proceso de regeneración, la expresión de moléculas de superficie y la comunicación celular entre las células gliales y las neuronas tienen un rol importante. En este contexto, nuestro grupo ha estudiado la comunicación celular entre astrocitos y neuronas. Describimos previamente que la interacción entre la integrina $\alpha\beta3$ (presente en astrocitos) y Thy-1 (presente en neuronas) causa inhibición del crecimiento neuritas y/o retracción de los procesos neuronales existentes (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). Sin embargo, Thy-1 es una proteína que se ancla a la cara externa de la membrana plasmática a través de su tallo de glucosil fosfatidil inositol (GPI), por lo cual no es posible el atribuirle una función directa en estos eventos. El propósito de esta tesis fue dilucidar el mecanismo molecular y la vía de señalización por la cual la interacción entre Thy-1 e Integrina $\alpha\beta3$ causan retracción de neuritas.

1.1- Thy-1, características y funciones celulares descritas.

Thy-1 (CD90) es una glicoproteína pequeña de entre 25 a 37 kDa, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Rege and Hagood 2006; Rege and Hagood 2006). Se ancla a la cara externa de la membrana plasmática mediante su tallo GPI (Fig. 1) en dominios ricos en colesterol conocidos como balsas lipídicas (Kemshead, Ritter et al. 1982; Wilson, Steinberg et al. 2004; Leyton and Hagood 2014). Se expresa en timocitos, ciertas células T, fibroblastos, células endoteliales activadas y en neuronas; siendo Thy-1

la proteína de superficie neuronal más abundante (comprende 2,5 % a 7% en cerebro de ratón adulto)(Stohl and Gonatas 1977; Kemshead, Ritter et al. 1982). La función de Thy-1 no es del todo clara; sin embargo, ha sido implicada en varios procesos incluyendo adhesión de Timocitos al epitelio tímico, regulación de apoptosis y el control de la extensión de procesos neuronales (Dreyer, Leifer et al. 1995; Morita, Isobe et al. 1996; Hueber, Bernard et al. 1997). Esto ha llevado a varios autores a señalarla como un importante regulador de las interacciones célula-célula y célula-matriz (Rege and Hagood 2006; Leyton and Hagood 2014).

Thy-1 posee en su secuencia aminoacídica dos dominios reportados importantes que le permiten interactuar con otras moléculas y desencadenar respuestas biológicas. Un tri-peptido RLD (Fig. 1), homólogo a RGD, que puede interactuar con moléculas de la familia de las Integrinas, incluyendo las Integrinas $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ (Leyton, Schneider et al. 2001; Choi, Leyton et al. 2005; Saalbach, Wetzel et al. 2005; Hermosilla, Muñoz et al. 2008; Zhou, Hagood et al. 2010; Fiore, Ju et al. 2014). Además existe una secuencia policatiónica REKRRK (Fig.1) que le permite interactuar con proteoglicanos de heparán sulfato (dominio de unión a heparina, HBD), que incluyen a miembros de la familia de los Syndecan, como Syndecan-4 (Avalos, Valdivia et al. 2009). Recientemente, el grupo del Dr. Thomas Barker describió una nueva forma en la que Thy-1 puede interactuar con otras moléculas al que llamaron “atrapamiento dinámico” (“Dynamic catch”) (Fiore, Ju et al. 2014). En esta interacción Thy-1 puede interactuar tanto con la Integrina $\alpha 5\beta 1$ como con Syndecan-4 en forma independiente. Sin embargo, la Integrina $\alpha 5\beta 1$ y Syndecan-4 pueden interactuar cooperativamente

con Thy-1, lo que permite aumentar la vida media y fuerza de la unión entre estas tres moléculas (Fiore, Ju et al. 2014).

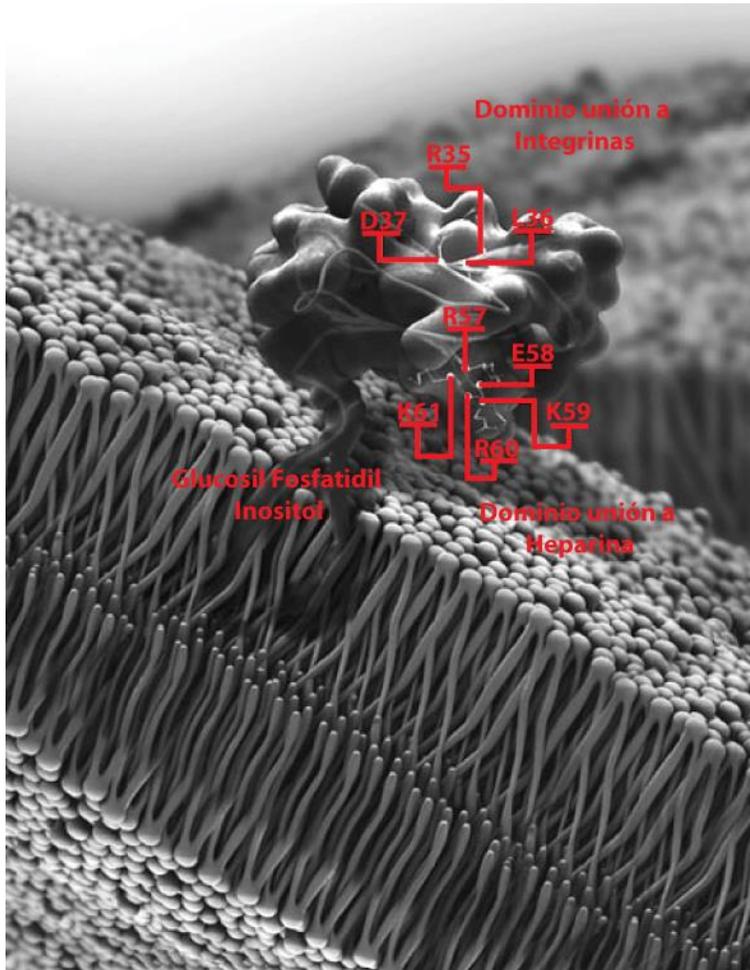


Figura 1: Representación esquemática en 3D de la estructura de Thy-1.

Thy-1 es una proteína que se ancla a la cara externa de la membrana plasmática a través de su tallo de glucosil fosfatidil inositol. Presenta 2 sitios de unión a ligandos: Un dominio de unión a integrinas de secuencia aminoácida RLD y un dominio de unión a heparina de secuencia policitiónica REKRRK. Los números representan los aminoácidos correspondientes a estos dominios en la secuencia de Thy-1 (Leyton and Hagood 2014).

Interesantemente, Thy-1 puede actuar como un ligando o como un receptor. Por una parte, Thy-1 puede activar vías de señalización en *cis* transduciendo señales al espacio intracelular de la célula en la que se expresa (Fig. 2), a través de su interacción con receptores transmembrana, entrecruzamiento con otras moléculas de Thy-1 o por presencia de ligandos como algunas integrinas (Barker, Grenett et al. 2004; Barker and Hagood 2009). Por otra parte, Thy-1 actúa en *trans* (Fig. 2), es decir, esta molécula puede actuar como un ligando extracelular para receptores que desencadenan una respuesta en otros tipos celulares (utilización de “célula efectora”) (Barker and Hagood 2009). En conclusión, la dualidad de Thy-1 como receptor y ligando (señalización en *cis* y *trans*) le permite la generación de señales celulares bi-direccionales tanto en la célula que presenta a Thy-1 como en la célula que presenta la molécula receptor (integrinas, syndecans, etc).

Las respuestas celulares bi-direccionales descritas en las que se encuentra involucrada Thy-1 son diversas (Fig. 2). Entre ellas, Thy-1 presente en células endoteliales activadas interacciona con las integrinas $\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$ o con CD97 presente en células sanguíneas gatillando por una parte, extravasación y transmigración tisular de las células sanguíneas; y por otra parte aumenta la adhesión celular en las células endoteliales (Fig. 2)(Wetzel, Chavakis et al. 2004; Wandel, Saalbach et al. 2012). Nuestro laboratorio mostró que la agrupación de la integrina $\alpha v\beta 3$ luego de su interacción con la secuencia de unión a integrina RLD, presente en Thy-1 neuronal, lleva a la formación de adhesiones focales y fibras de estrés en astrocitos por la activación de RhoA (Leyton, Schneider et al. 2001; Avalos, Arthur et al. 2004; Hermosilla, Muñoz et al. 2008).

Además, esta activación requiere de la interacción de Síndecan-4 con Thy-1 mediante su dominio de unión a heparina. La interacción combinada del par Integrina $\alpha\beta3$ /Síndecan-4 del astrocito con Thy-1 neuronal, promueve la adhesión a la matriz extracelular de una forma dependiente de PKC α y RhoA en astrocitos (Avalos, Valdivia et al. 2009). Por otra parte, **al tratar neuronas corticales o células CAD (línea celular neuronal) con integrina $\alpha\beta3$, se observa inhibición del crecimiento de los procesos neuronales o bien retracción de los procesos neuríticos existentes** (Fig. 2) (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). Estos acontecimientos no ocurren al utilizar células CAD Thy-1 (-), indicando la importancia de la interacción integrina $\alpha\beta3$ -Thy-1 también para las neuronas. Con todos estos antecedentes se evidencia que en nuestro sistema Thy-1 también genera respuestas biológicas en *cis* y en *trans*: su interacción con integrina $\alpha\beta3$ tiene un efecto en *trans* hacia el astrocito (cambio en adhesiones focales y fibras de estrés) y en *cis* hacia la neurona (inhibición del crecimiento/retracción de neuritas). Durante el desarrollo de esta tesis nos centramos en entender los mecanismos moleculares por los cuales Integrina $\alpha\beta3$ gatilla retracción de procesos neuronales, por lo que de aquí en adelante nos enfocaremos en la señalización descrita río abajo de Thy-1 (señalización en *cis*).

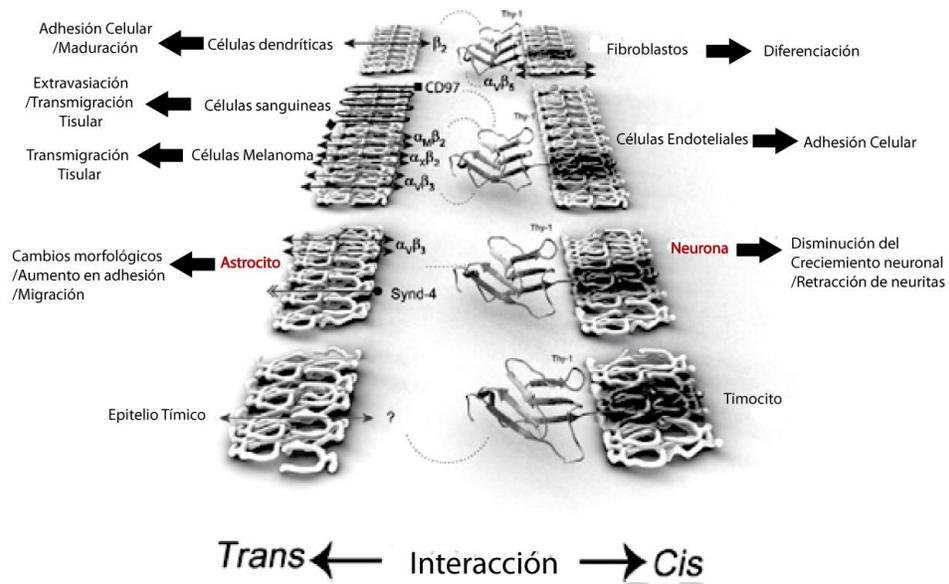


Figura 2: Interacción entre Thy-1 e Integrinas genera respuestas celulares bi-direccionales.

Thy-1 puede generar respuestas biológicas actuando como ligando (trans) o como receptor (cis). Por ejemplo: La interacción entre Thy-1 presente en fibroblastos e Integrina β_2 presente en células dendríticas genera diferenciación en fibroblastos (cis) y aumento en la adhesión celular y maduración en células dendríticas (trans). La interacción entre Thy-1 presente en células endoteliales y las integrinas $\alpha_M\beta_2$, $\alpha\beta_2$, $\alpha\beta_3$ (presentes en células de melanoma) y/o CD97 (presente en células sanguíneas) generan aumento en la adhesión celular en fibroblastos (cis), trans migración tisular en células de melanoma (Trans) o trans migración tisular y extravasación en células sanguíneas (trans). La interacción entre Thy-1 neuronal e Integrina $\alpha\beta_3$ y Syndecan-4 generan disminución del crecimiento neuronal/retracción de neuritas (cis) y cambios morfológicos, aumento en la adhesión y migración celular en astrocitos (trans). La interacción entre Thy-1 y un receptor desconocido genera unión al epitelio tímico. En rojo se denota el modelo de trabajo de nuestro laboratorio (Herrera-Molina, Valdivia et al. 2013).

1.2- Señalización celular río abajo de Thy-1(cis).

Si bien los mecanismos moleculares por los cuales Thy-1 modula las variadas respuestas biológicas que induce en distintos tipos celulares no son del todo claro, son varias las vías de señalización que han sido asociadas a su interacción con ligandos o a su presencia en distintos tipos celulares. Entre ellas, la sobreexpresión de Thy-1 en

fibroblastos pulmonares induce el agrupamiento de Thy-1, un aumento en la fosforilación inhibitoria de Src, una tirosina quinasa tipo no receptor (Barker, Grenett et al. 2004). Además, estas células presentan un aumento en la actividad de RhoA, GTPasa pequeña de la familia de Rho. Estos eventos llevan a cambios morfológicos en los fibroblastos, induciendo un aumento en el tamaño de las adhesiones focales y una disminución en la migración celular (Barker, Grenett et al. 2004). Por otra parte, la incubación con la proteína de matriz celular TSP-1, que puede unirse a dominios de unión a heparina, causa un aumento en la actividad de quinasas de la familia de Src (SFKs) y un aumento en la activación de PI3K/Akt lo que conduce al desensamble de adhesiones focales en fibroblastos pulmonares que expresan Thy-1 (Barker, Pallero et al. 2004; Rege, Pallero et al. 2006). En cambio los fibroblastos que no expresan Thy-1 no responden a TSP1. En neuronas la adición de algunos anticuerpos contra Thy-1 genera crecimiento de procesos neuronales. Estos anticuerpos se unen en un sitio distinto a los descritos para ligandos (Kuroiwa, Torikai et al. 2012), gatillando activación de c-Fyn, otro miembro de la familia de Src (Doherty, Singh et al. 1993). Además, la activación de c-Fyn se ve acompañada de un aumento en la entrada de calcio a través de canales de calcio tipo N y L (Doherty, Singh et al. 1993). Consistentemente, en neuronas DRG se observa un mayor número de neuritas y mayor complejidad de éstas tras la incubación con anticuerpo contra Thy-1 por 6 horas; en este caso, la señalización reportada involucra un aumento en la activación de PKA y del eje MEK-ERK-CREB (Doherty, Singh et al. 1993; Chen, Chen et al. 2007; Yang, Chen et al. 2008). Interesantemente, en nuestro modelo de trabajo la adición de Integrina $\alpha\beta 3$ a neuronas corticales mostró un

aumento en la fosforilación inhibitoria de Src, así como una re-distribución de esta quinasa en las neuritas (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). Asimismo, se encuentra ampliamente reportado que estas SFKs (Src, Fyn, Lck y Csk) pueden co-inmunoprecipitar con Thy-1 desde homogenizados de distintos tipos celulares, tales como: leucocitos, timocitos, células T, fibroblastos, neuronas, entre otras (Draberova and Draber 1993; Draberova and Draber 1993; Rege and Hagood 2006; Rege and Hagood 2006). En resumen, Thy-1 puede regular variadas vías de señalización; siendo las quinasas de la familia de Src los principales efectores descritos en distintos modelos celulares. Sin embargo, no se sabe cómo estas proteínas se pueden asociar a Thy-1 dado que ellas se insertan a la capa opuesta de la membrana plasmática.

1.3- Thy-1 y quinasas de la familia de Src.

Las SFKs se asocian a la cara interna de la membrana plasmática por modificaciones lipídicas presentes en el extremo amino terminal y/o físicamente uniéndose a distintos receptores transmembrana. Se sabe que el mecanismo de activación de SFKs implica múltiples eventos de fosforilación y desfosforilación (Fig. 3). Las SFKs poseen dos sitios de fosforilación regulatorios en Y⁵²⁷ y en Y⁴¹⁶ (Hunter 1987; Bradshaw 2010). Por una parte, Y⁵²⁷ es una fosforilación inhibitoria, cuya desfosforilación es pre-requisito para la activación. Interesantemente, este sitio puede ser re-fosforilado por Csk (C-terminal Src kinase) disminuyendo la actividad de la quinasa (Wong, Lieser et al. 2005; Okada 2012). Por otra parte, la fosforilación en la Y⁴¹⁶ es una modificación que aumenta la actividad

basal de la quinasa. Adicionalmente, su unión a ligandos SH2 y SH3 también incrementan su actividad, siendo el incremento gradual de la actividad de esta quinasa una de sus principales características (Fig. 3) (Bradshaw 2010). Basados en nuestros antecedentes de asociación de Thy-1 a Src, sabemos que la estimulación de neuronas corticales con Integrina $\alpha\beta3$ causa un aumento en la fosforilación inhibitoria de Src (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). Por otra parte, la estimulación con integrina $\alpha\beta3$ -Fc, de neuronas corticales de rata, causa re-distribución de Src y de Thy-1 y una localización similar para ambas proteínas. Además, la inhibición de Src causa inhibición del crecimiento de procesos neuríticos en células CAD (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012; Herrera-Molina, Valdivia et al. 2013). **Thy-1 interacciona con miembros de la familia Src en dominios de membrana ricos en colesterol, aunque no es claro si directa o indirectamente** (Stefanova, Horejsi et al. 1991; Thomas and Samelson 1992). Se postulan dos posibles mecanismos por los cuales Thy-1 podría activar proteínas de la familia de quinasas Src (Rege and Hagood 2006). Por una parte, el tallo GPI de Thy-1 podría interactuar en forma directa con el palmitato de cisteínas palmitoiladas de SFKs (Fig 4A). Apoyando esta hipótesis, la mutagénesis sitio dirigida de los sitios palmitoilables en miembros de la familia SFK como Lck y Fyn es capaz de inhibir la interacción con las proteínas CD55 y CD59, las cuales también poseen un tallo GPI en células mesenquiales de rata (Narisawa-Saito, Yamanashi et al. 1996). Por otra parte, la co-agrupación de Thy-1 con otras moléculas presentes en las balsas lipídicas, que poseen dominios intracelulares, le podría permitir transducir una señalización intracelular (Fig. 4B) (Rege and Hagood 2006; Herrera-Molina, Valdivia et al. 2013; Miyagawa-

Yamaguchi, Kotani et al. 2014). No obstante, ningún estudio ha sido concluyente hasta la fecha. Debido a que Src es una proteína miroistoilada (Patwardhan and Resh 2010), que no posee sitios palmotoilables, **propusimos que en nuestro modelo Thy-1 requería de una proteína adaptadora transmembrana que permita la inactivación de Src.**

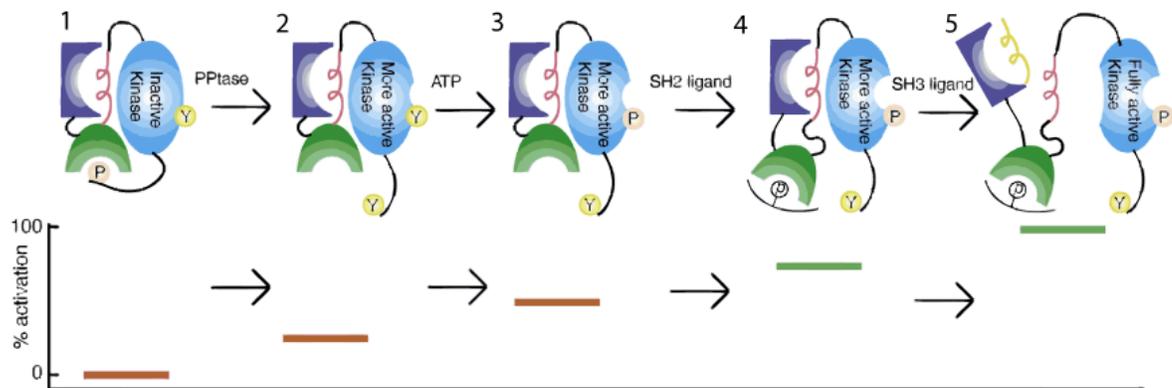


Figura 3: Representación esquemática de activación de quinasas de la familia de Src.

La parte superior de la figura representa el mecanismo molecular de activación gradual característico de las quinasas de la familia de Src (SFKs). La parte inferior muestra una gráfica con el porcentaje de activación de SFKs para cada evento molecular. 1- Las SFKs se encuentran inactivas, fosforiladas en el carboxilo terminal, dichas fosforilación es reconocida por el dominio SH2 (verde) de la proteína. 2- Por acción de una fosfatasa el carboxilo terminal es desfosforilado, lo que expone el dominio SH2 de la quinaza. La quinaza presenta actividad basal. 3- En presencia de ATP, la quinaza se autofosforila en Y, lo que aumenta su actividad enzimática. 4- La unión de la quinaza con ligandos para el dominio SH2 incrementa su actividad respecto a no estar unida a ligando. 5- La quinaza unida a ligando SH2 puede unir ligandos para el dominio SH3 (morado) lo que incrementa aún más su actividad. Modificada de Bradshaw JM 2010.

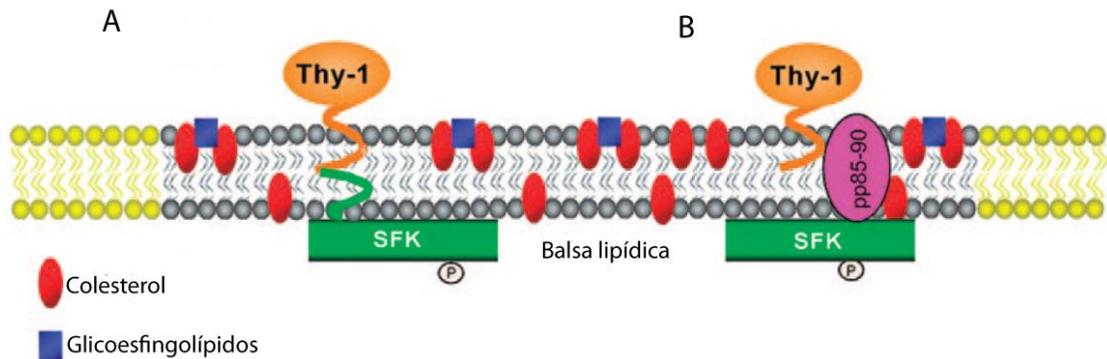


Figura 4 : Potenciales mecanismos de transducción de señal desde Thy-1 a quinasas de la familia de Src.

Existen 2 teorías respecto a cómo puede interactuar Thy-1 con quinasas de la familia de Src (SFK) en balsas lipídicas. A- Thy-1 puede interactuar directamente con SFK a través de la palmitoilación presente en algunos miembros de la familia de Src. B- Thy-1 puede interactuar con SFK a través de proteínas adaptadoras transmembrana que posean sitios de unión para dominios SH2 o SH3 presente en SFK. Figura modificada de Rege & Hagood, 2006a.

1.4- CBP y p75 dos posibles candidatas para transducir la señalización de Thy-1 en neuronas.

Thy-1 es una glicoproteína que se ancla a la cara externa de la membrana plasmática mediante un tallo GPI (Barker and Hagood 2009). El mecanismo por el cual esta proteína es capaz de transducir señales al espacio intracelular se desconoce. Hemos propuesto que **la retracción de procesos neuronales mediada por la unión de integrina $\alpha\beta3$ y Thy-1 neuronal requeriría de una proteína adaptadora transmembrana.** Como posibles proteínas adaptadoras proponemos dos candidatas. Por una parte, la proteína que une a Csk (CBP), la cual ha sido asociada a Thy-1 debido a que co-precipita con ésta y ha sido descrita como una proteína de andamiaje para quinasas de la familia de Src y como una proteína asociada con la maduración del cerebro (Chen, Veracini et al. 2009; Lindquist, Karitkina et al. 2011). Por otra parte, la

proteína p75, la cual ha sido descrita como un transductor de señales para el receptor de Nogo en neuronas. Interesantemente, el receptor de Nogo es una proteína que se ancla a la cara externa de la membrana plasmática vía GPI, de forma similar a Thy-1. Además, el complejo formado por p75 y el receptor de Nogo ha sido involucrado en el colapso del cono de crecimiento neuronal (Ben-Zvi, Ben-Gigi et al. 2007; Lim, McLaughlin et al. 2008).

La proteína CBP, también llamada PAG (proteína asociada con microdominios enriquecidos en glicosfingolípidos), es un adaptador transmembrana de aproximadamente 45 kDa (Takeuchi 2006; Saitou, Kajiwara et al. 2014). CBP se expresa ampliamente en distintos tipos celulares en mamíferos, incluyendo fibroblastos y neuronas. A nivel sub-celular se localiza exclusivamente en regiones ricas en colesterol (balsas lipídicas), debido a que posee dos sitios de palmitoilación (Brdicka, Pavlistova et al. 2000; Simons and Toomre 2000). CBP posee un ectodominio pequeño que no tiene la capacidad de unir ligandos y un dominio citoplasmático que contiene 10 residuos de tirosina (Fig. 5). Esta proteína une proteínas tirosina quinasas citoplasmáticas como Csk, Src, Lck, Fyn y Hck, sugiriendo que es una molécula adaptadora general para la familia de Src, pudiendo unir incluso a varios miembros de esta familia paralelamente, 3 sitios de unión (Ingley 2008). Su unión con moléculas de la familia Src ocurre a través de su carboxilo terminal, en donde une fuertemente proteínas que contengan un dominio SH2 (Fig. 5). Se ha observado que la asociación de CBP con Src puede llevar a la inactivación de la quinasa por la re-fosforilación de Src en Y527 por Csk (Oneyama, Iino et al. 2009; Okada 2012; Saitou, Kajiwara et al. 2014).

Interesantemente, se ha demostrado que se puede asociar a agrupaciones de Thy-1 luego de su fosforilación o tratamiento con pervanadato (Durrheim, Garnett et al. 2001). Además, el uso de dominantes negativos de CBP disminuye drásticamente la agrupación de Thy-1 en la membrana, sugiriendo a CBP como un mediador de la señalización inducida por Thy-1 (Chen, Veracini et al. 2009). Adicionalmente, se ha descrito que la interacción entre Src, Csk y su proteína adaptadora CBP tendría un rol importante en modelos celulares de estudio de neurodegeneración causada por glutamato, en neuronas corticales de rata y células neurales HT4, indicando que este complejo está presente en neuronas (Khanna, Roy et al. 2007). Por lo tanto, proponemos a **CBP como proteína adaptadora que mediaría la interacción entre Src y Thy-1 en neuronas estimuladas con integrina $\alpha\beta3$.**

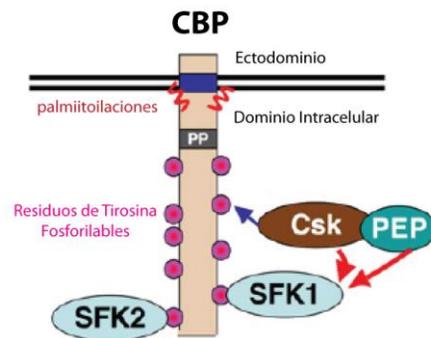


Figura 5: Representación esquemática de la estructura de CBP.

CBP posee 3 dominios: un ectodominio de 10 aminoácidos que no tiene sitios de unión a ligando, un dominio transmembrana (azul) y un dominio intracelular, que presenta residuos de tirosina fosforilables que pueden unir proteínas con dominios SH2 y SH3. Este dominio posee 3 sitios de unión a quinasas de la familia de Src; SFK1 y SFK2 pueden unir a Fyn, Lyn y Src. CBP puede unir a Csk. Además Csk presenta un dominio de unión para la fosfatasa PEP que puede desfosforilar a SFKs en Y416 regulándolas negativamente. Modificado de Ingley, 2008.

El receptor de neurotrofinas p75, es una proteína de 75 kDa cuya función ha sido ampliamente estudiada como receptor de ligandos tales como NGF y BDNF. Sin embargo, también ha sido descrita su asociación a Lingo-1 y el receptor de Nogo como co-receptores (Schechter and Bothwell 2010; McDonald, Bandtlow et al. 2011). El complejo formado por las tres proteínas responde como señal inhibitoria del crecimiento axonal mediante una vía asociada a la activación de RhoA. Interesantemente, el receptor de Nogo, es una proteína anclada a la membrana neuronal a través de un tallo GPI, y al igual que Thy-1, ha sido implicada en la inhibición del crecimiento de neuritas. El complejo proteico recluta a la proteína Rho GDI—proteína que secuestra a RhoA prenilado—incrementando la actividad de ROCK. Destacablemente, p75^{NTR} ha sido implicada en otras dos vías inhibitorias del crecimiento neuronal que involucran Semaforinas y Efrinas (Ben-Zvi, Ben-Gigi et al. 2007). El ligando Semaforina 3 A (SEM3A) actúa uniéndose al complejo de dos receptores Neurifilina-1 y plexina A4, llevando al decaimiento de los procesos neuronales, p75^{NTR} se uniría a Plexina A4 desplazando su unión con neuropilina-1 disminuyendo el efecto de SEM3A (Ben-Zvi, Ben-Gigi et al. 2007). La señalización Efrina A/ p75^{NTR} es mediada por la activación de Fyn y de RhoA (Lim, McLaughlin et al. 2008). Estas evidencias muestran a p75^{NTR} como un importante regulador del crecimiento de los procesos neuronales, distinta de su clásica asociación a neurotrofinas (NGF, BDNF, GDNF). Dados estos antecedentes propusimos, alternativamente, que **el receptor p75^{NTR} podría encontrarse implicado en la inhibición del crecimiento/retracción de neuritas mediada por la interacción entre Thy-1 neuronal y la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ presente en astrocitos.**

1.5- Rol de Thy-1 en neuronas.

Thy-1 se encuentra presente en prácticamente todos los tipos neuronales, y en altos niveles en todas las neuronas motoras, sensoriales e hipocámpales y en el 10% de las neuronas corticales y cerebelares (Raff, Fields et al. 1979; Morris 1985), sugiriendo un importante y conservado papel para esta molécula en el SNC. Thy-1 se localiza en el soma de neuronas inmaduras post-nacimiento; en el axón y las dendritas en neuronas diferenciadas y en la punta de aquellos procesos que han dejado de crecer y que conforman un circuito neuronal (Xue, Calvert et al. 1990; Xue and Morris 1990; Chen, Wang et al. 2005). Por esta razón, algunos autores vinculan a Thy-1 en la estabilización de redes neuronales y en la inhibición del crecimiento de los procesos neuronales. Por otra parte, la sobre-expresión de Thy-1 en líneas neuronales inhibe el crecimiento de neuritas sobre astrocitos maduros, pero no así sobre células de Schwann o células gliales embrionales (Tiveron, Barboni et al. 1992). Además, la adición de Thy-1 soluble revierte la inhibición del crecimiento de neuritas (Schlamp, Johnson et al. 2001; Chen, Wang et al. 2005), sugiriendo que Thy-1 actuaría como un estabilizador de la sinapsis neuronal y que podría bloquear la reparación de circuitos neuronales en regiones del cerebro ricas en astrocitos. Por otra parte, ratones que son Thy-1 negativos fallan en aprender de otros ratones que alimentos son seguros para comer (Mayeux-Portas, File et al. 2000). Interesantemente, estas fallas del aprendizaje social pueden ser revertidas luego de la re-expresión de Thy-1 o bien por tratamientos farmacológicos con antagonistas del receptor de GABA. Estos datos sugieren que Thy-1 podría estar regulando la inhibición de la neurotransmisión GABAérgica. Por otra parte, nuestro

grupo demostró que la interacción de Integrina $\alpha\beta3$, presente en astrocitos, y Thy-1 neuronal gatilla retracción de procesos neuronales y la inhibición del crecimiento de neuritas (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). En conclusión, Thy-1 jugaría un rol importante tanto en la formación/estabilización de circuitos neuronales como en la retracción de procesos neuronales en condiciones patológicas. Por estas razones, nos propusimos investigar la señalización río abajo de Thy-1 que gatilla la retracción de procesos neuronales inducida por la adición de Integrina $\alpha\beta3$.

1.6- Vías de señalización asociadas a retracción de neuritas y cambios en el citoesqueleto de actina.

Se ha descrito varias vías de transducción de señales que llevan al colapso del cono de crecimiento y del axón, las cuales podrían dar cuenta de la retracción mediada por integrina $\alpha\beta3$ y Thy-1. Estas vías principalmente afectan el citoesqueleto de Actina (microfilamentos) o Tubulina (microtúbulos) (Luo 2002; Gordon-Weeks 2004). En esta tesis nos hemos centrado fundamentalmente en las proteínas que modulan el cono de crecimiento axonal y al citoesqueleto de actina.

El citoesqueleto de Actina en el cono de crecimiento axonal se encuentra regulado, fundamentalmente, por la subfamilia de Rho GTPasas, proteínas G monoméricas que incluyen a Rho, Rac y Cdc42 (Koh 2006). La actividad de estas GTPasas pequeñas es controlada por su capacidad de unir GTP, siendo activas en su estado unido a GTP e inactivas en su estado unido a GDP (Fig. 6). Tres clases distintas de proteínas regulan la actividad de estas GTPasas: los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina

(GEFs), promueven el estado activo facilitando el intercambio de GDP por GTP; los inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina (GDIs), que secuestran la forma prenilada de la proteína; y las proteínas que activan GTPasas (GAPs), las cuales incrementan la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Rho promoviendo la hidrólisis de GTP y la inactivación de la proteína. Específicamente en neuronas, RhoA es regulada en forma positiva por las GEFs: Egefina, Kalirina (GEF2), GEF KIAA03880 y p190RhoGEF. Esta última requiere ser fosforilada por la quinasa de las adhesiones focales (FAK) para su activación (Zhai, Lin et al. 2003; Koh 2006). Además, RhoA es regulada negativamente por las GAPs: Grit y p190RhoGAP. Interesantemente, se ha descrito que p190RhoGAP es el sustrato más importante de Src en el cerebro adulto. La fosforilación en Y (por Src) aumenta la actividad de p190RhoGAP disminuyendo la activación de RhoA. Notoriamente, la activación de RhoA induce retracción neurítica en células PC12 y cultivos neuronales primarios (Sebok, Nusser et al. 1999; Koh 2006; Jeon, Kim et al. 2010). En particular la retracción neurítica inducida por la activación de RhoA es mediada por la acción de la quinasa asociada a Rho (ROCK) (Fig. 6). Sin embargo, se conocen otros efectores de las GTPasas de Rho que podrían dar cuenta de esta retracción.

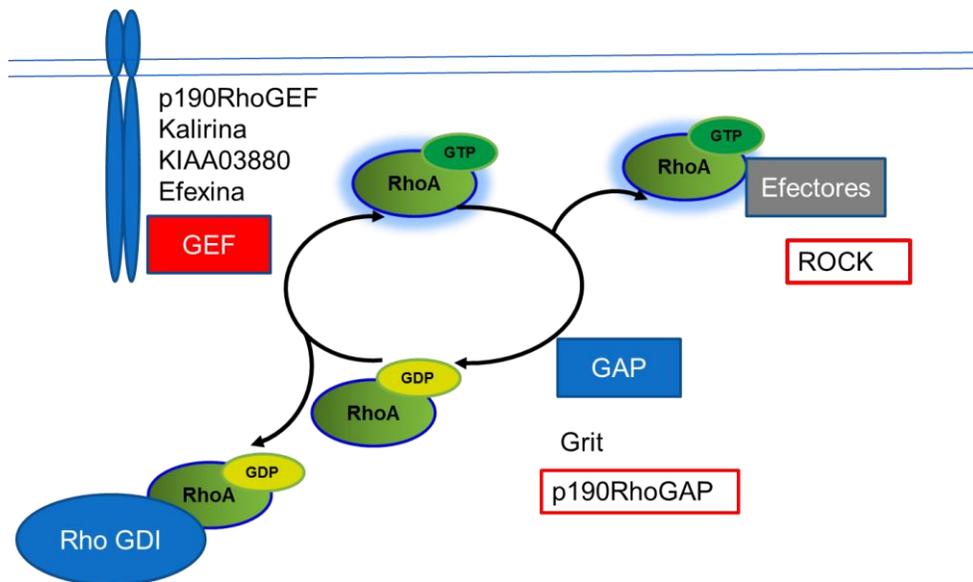


Figura 6: Esquema de activación de RhoA y principales moléculas involucradas.

RhoA es regulada por 3 tipos de proteínas: GEF (activan a RhoA, promueven estado unido a GTP), GAP (promueven actividad GTPásica de RhoA y la inactivan) y proteínas Rho GDI (secuestran forma prenilada de RhoA). Junto a cada tipo de proteína regulatoria se detalla una lista de los principales miembros encontrados en neuronas. RhoA activo puede interaccionar con efectores tales como ROCK.

La inhibición directa de ROCK causa el crecimiento de neuritas en líneas neuronales y una disminución de la fosforilación inhibitoria de Cofilina, proteína que al activarse despolimeriza los filamentos de actina (Zhang, Ottens et al. 2006). Cofilina no es un sustrato directo de ROCK, sino de LIMK , PKC y PAK1, siendo LIMK un sustrato directo de ROCK (Maciver and Hussey 2002). Interesantemente, la fosforilación de Cofilina por parte de LIMK es necesaria para el colapso del cono de crecimiento axonal (Aizawa, Wakatsuki et al. 2001). Sin embargo, la fosforilación de Cofilina lleva a su inactivación y este evento resulta paradójal a su función. En la literatura no es del todo claro el cómo esta inactivación aporta a la contracción del citoesqueleto y al colapso del

cono de crecimiento. Algunos autores postulan que Cofilina inactiva estabiliza los filamentos de actina y no permite la formación de nuevos extremos que permitiría la elongación de los filamentos de Actina, arrojando el recambio de los monómeros de Actina, impidiendo el crecimiento de los procesos neuronales (Aizawa, Wakatsuki et al. 2001; Maciver and Hussey 2002; Zhang, Ottens et al. 2006). Por otra parte, ROCK puede regular el estado de fosforilación de la cadena liviana de la Miosina (MLCII) en S¹⁹ (Koh 2006; Zhang, Ottens et al. 2006). La Miosina II se encuentra implicada en la contracción del citoesqueleto de Actina, de esta forma ROCK, en forma indirecta (vía MLCII) regula la contracción celular. ROCK puede aumentar la fosforilación en S¹⁹ de MLCII por dos mecanismos: por una parte, ROCK regula en forma positiva a la quinasa que fosforila la cadena liviana de la miosina; y por otra parte, regula en forma negativa la fosfatasa que desfosforila en S¹⁹ a MLCII, estos eventos inducen la contracción del citoesqueleto de Actina. En neuroblastomas, tratamientos con oligonucleótidos antisentido contra el mensajero de la miosina IIB (uno de los dos genes de miosina II en mamíferos) reduce la extensión de neuritas (Wylie, Wu et al. 1998). Inportantemente, la disminución de la actividad de Src también ha sido asociada fosforilación/desfosforilación de Cofilina y a variaciones de formas celulares atribuibles a cambios en el citoesqueleto de actina (Koh 2006; Tripathi and Zelenka 2009).

En su conjunto, estas observaciones nos han llevado a proponer que **la interacción Thy-1/integrina- α v β 3 causa el acortamiento de los procesos neuronales por una vía mediada por Src y ROCK, que involucraría inactivación Src y disminución de la actividad de p190RhoGAP, lo que llevaría a un incremento de la actividad de**

RhoA, ROCK, y la fosforilación de los efectores río abajo de la vía, Cofilina y MLCII. Además, que la señalización de Thy-1 requeriría de una proteína adaptadora transmembrana (CBP o p75). En la figura 7 se resumen los antecedentes y el modelo propuesto.

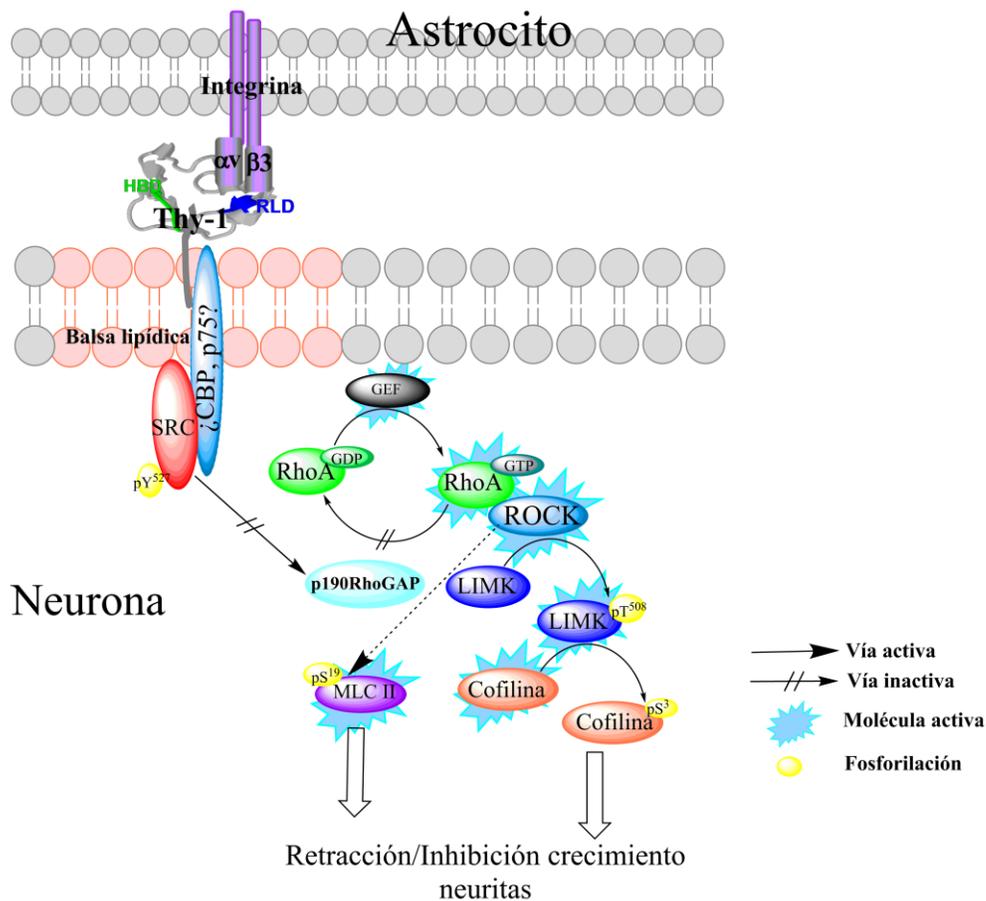


Figura 7: La interacción entre Thy-1 neuronal y la integrina $\alpha\beta3$ presente en astrocitos causa inhibición del crecimiento/retracción de neuritas por una vía asociada a Src/RhoA/Cofilina.

En la figura se muestra que la interacción entre Thy-1 e integrina $\alpha\beta3$ ocurre a través de la secuencia aminoacídica RLD de Thy-1. Esta unión induce formación de complejo con una proteína adaptadora transmembrana (ζ CBP/p75?) y Src lo que lleva a la inactivación de Src. La inactivación de Src impide la activación de la proteína p190RhoGAP, la cual no inactivaría a RhoA incrementándose la actividad de esta última. RhoA-GTP activa a la quinasa ROCK, la que fosforila por una parte a LIMK en T⁵⁰⁸ activándola; y por otra parte, causa aumento de la fosforilación de la cadena liviana de la Miosina II

(MLCII). LIMK fosforila a cofilina en S³ lo que inhibe su capacidad de despolimerizar actina, evento necesario para el colapso del cono de crecimiento neuronal, llevando a retracción o inhibición del crecimiento de neuritas. Las flechas interrumpidas con líneas paralelas indican vías inactivadas.

2- Hipótesis

“La retracción/inhibición del crecimiento de los procesos neuronales, causada por la interacción Thy-1 con Integrina $\alpha\beta3$, ocurre por la inactivación de Src, lo que lleva a un aumento de la actividad de RhoA e incremento en la fosforilación de sus efectores, y requiere de la participación de una proteína adaptadora transmembrana”

3- Objetivo General

Estudiar las cascadas de señalización inducidas por las interacciones Integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1, en células CAD y neuronas primarias, incluyendo la inhibición de Src y la activación de las vías RhoA/ROCK/LIMK/Cofilina y RhoA/ROCK/MLCII, y el requerimiento de proteína adaptadora de membrana.

3.1- Objetivos Específicos

1. Evaluar la inhibición de Src y activación de las vías RhoA/ROCK/LIMK/Cofilina y RhoA/ROCK/MLCII en la retracción neurítica e inhibición del crecimiento mediada por integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1 en células CAD.

2. Identificar proteína(s) adaptadora(s) y evaluar su requerimiento en la inhibición de Src mediada por integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1 en células CAD.

3. Evaluar la inhibición de Src y activación de las vías RhoA/ROCK/LIMK/Cofilina y RhoA/ROCK/MLC II , y requerimiento de proteína adaptadora en la retracción neurítica e inhibición del crecimiento mediada por integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1 en cultivos neuronales primarios.

4- Materiales y métodos

4.1- Materiales y reactivos

Tabla 1: listado de reactivos utilizados.

Listado de reactivos utilizados, se clasificaron de acuerdo a la marca, con su respectivo número de catálogo.

Fabricante	Reactivo	Número de Catálogo
AGFA	Fijador	G-334
	Revelador radiográfico	G-150
Bio-Rad	Solución acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 40%	161-0156
Calbiochem	Antipaína	178220
	Benzamidina	199001
	Ciclosporina A	239835
	Leupeptina	108975
	Mowiol	475904
	PMSF	52332
	Y-27632	688001
Chemicon International	Re-Blot Plus Mild Antibody Stripping Solution	2502
	Sistema de detección quimioluminiscente ECL	2600
Falcon	Placas de cultivo de 24 y 96 pocillos	
	Placas plásticas para cultivo de 6 y 10 cm	
Fermentas	Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	SM0671
Fluka	Azul de bromofenol	18030
	Azul de Coomasie	27816
	Cloruro de calcio	21101
	Cloruro de magnesio	63072
	Cloruro de potasio	60129
	EDTA	3609
	EGTA	3780
	Hidróxido de sodio	71691
	SDS	71729
	Isobutanol	58450
	Hidróxido de potasio	60369

GIBCO	2-mercaptoetanol para cultivo celular	21985-023
	RPMI 1640	23400-021
	DMEM-F12	12400-016
	MEM	11400-016
	Neurobasal	21103-049
	Suplemento B-27	NC17504044
	PBS 10X para cultivo celular	70013-073
	Penicilina-estreptomicina	15140-1229
	Tripsina-EDTA	25200-056
	HBSS++	14025050
	HEPES 1 M	15630-080
HACHEREY-NAGEL	NucleoBond [®] Xtra Midi EF	740420.50
Hyclone	Suero fetal equino	15777-014
	Suero fetal de bovino	16777-014
Kodak	Películas auto radiográficas BioMax MR	1314219
Lab-TekII	Chambered #1.5 German coverglass System	155409
Merck	Temed	1.107.320.100
	Tritón X-100	1.086.031.000
	Glucosa	1.083.421.000
Pierce	Kit para medición de proteínas con BCA	P23223
	AminoLink Plus ^R Immobilization Kit	44894
	Super Signal West Femto ^R Maximum Sensivity Subtrate	34095
Qiagen	SureSilencing shRNA kit	336314 KM3377P
Riedel de Haen	Azul de Tripano	32700
Roche	Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	0469312401
	PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	0490684501
Scharlau	Cloruro de sodio	SO0227
	Na ₂ HPO ₄	SO0337
Sigma	Azida de sodio	S8032
	BSA	A2153
	Bicarbonato de sodio	S7795
	Dimetilsulfóxido para cultivo celular	D2438
	DABCO	D2522

	Esferas de Proteína A-sefarosa	P3391
	Esferas de glutatión-agarosa	G4510
	Glicina	G7126
	Ortovanadato de sodio	O6508
	Paraformaldehido	P6148
	PIPES	P1851
	Rojo Ponceau	P3504
	Puromicina	p9620
	Trizma base	T1503
	Tris-HCl	T3253
	Tween 20	P1379
	Iodoacetamida	I6125
	Acetonitrilo	271004
	NP-40	I3021
	CHAPS	C-3023
TCL	Metanol grado técnico	-----
	Etanol grado técnico	-----
US Biological	Dimetilsulfóxido	D8050
	IPTG	C5050417
Winkler	Acetato de sodio	BM-1560
	2-mercaptoetanol	BM-1200
	Isopropanol	BM-0210

4.2- Cultivos celulares y obtención de cultivos primarios.

Se trabajó con una variante de células CATH—células catecolaminérgicas del sistema nervioso central de ratón, obtenidas de tumor cerebral—células **CAD**, las cuales pueden ser diferenciadas a fenotipo neuronal (Qi, Wang et al. 1997). Estas células se mantuvieron en medio completo (DMEM-F12 con 8% suero fetal bovino y 1% penicilina/estreptomicina). Se trabajó además, con células HEK 293T para la obtención

de proteínas fusión y éstas se mantuvieron en DMEM-alta glucosa con 10% suero fetal bovino y 1% penicilina/estreptomicina (Graham et al., 1977).

Se usó cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de rata (E18) de 14 días *in vitro*. Para su obtención: la disección de los cerebros y obtención de las cortezas se realizó utilizando como medio de disección HBSS++ en hielo. Luego las cortezas obtenidas se lavaron dos veces con este medio y disgregadas utilizando 3 mL de tripsina durante 5 minutos a 37°C. Las cortezas precipitaron por gravedad y se realizó 2 lavados con HBSS++. A continuación, estas células se pipetearon y re-disgregaron en forma mecánica utilizando una pipeta pasteur con la punta flameada. Los restos de tejidos se separaron centrifugando 30 segundos a 500 x g a temperatura ambiente y se conservó la fracción de células en solución. Las células obtenidas se sembraron a razón de 20000 células por cm² en placas recubiertas con L-polilisina, en medio de adhesión (MEM con 10% suero equino y 1% penicilina/estreptomicina). Luego de 5 horas, el medio de adhesión se reemplazó por medio neurobasal suplementado con B27, 1 mM de glutamina y 1% penicilina/estreptomicina. Luego de 7 días, la mitad del medio fue reemplazado por medio fresco. Las células se mantuvieron durante 14 días en estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂, luego de lo cual se realizó todos los experimentos. La pureza del cultivo fue de 90% el día 14, el cual se corroboró tiñendo las neuronas y astrocitos por inmunofluorescencia con anticuerpos contra Thy-1 y GFAP respectivamente. El protocolo para el manejo de animales y obtención de estas neuronas primarias fue aprobado por el Comité de Bioética de Animales (protocolo #CBA0377FMUCH) de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

4.3- Silenciamiento de CBP en células CAD.

Para el silenciamiento de CBP células CAD se transfectaron con fosfato de calcio (establemente) con un plasmidio (pGeneClip) que contenía la secuencia para shRNA contra el mensajero de CBP (NM_053182.5) (inserto “ACACAAACCTGGACGACCATGTAT”) o un control vacío (inserto “GGAAATCTCATTCGSTGCATAC”) (SureSilencing shRNA kit, Qiagen). Para ello: el día previo a la transfección células CAD se sembraron a razón de 10000 células por cm^2 en medio completo. El día de la transfección, el medio se reemplazó por medio fresco media hora antes de la transfección. Para la transfección a 1 mL de solución que contiene 500 mM de CaCl_2 en agua ultrapura se le adicionó 20 μg de DNA, luego se mezcló con 1 mL de una solución de 50 mM HEPES pH 7.05 que contiene 140 mM de NaCl, 1,5 mM Na_2PO_4 en agua ultrapura. La mezcla se agitó por vortex exactamente un minuto y luego se adicionó a una placa de 10 cm^2 , que previamente estaba sembrada con células CAD con 10 mL de medio completo. Luego de 4 horas, se realizó un lavado con medio completo y se reemplazó el medio por medio fresco. Al día siguiente, el medio se reemplazó por medio completo con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina. Las células se seleccionaron durante 2 semanas cambiando el medio cada 2 días. El silenciamiento de CBP y expresión de Thy-1 fue corroborada por Western blot.

4.4- Obtención de proteína recombinante $\alpha\text{v}\beta 3$ -Fc.

La proteína recombinante $\alpha_v\beta_3$ -Fc se obtuvo de la co-transfección de células HEK 293T con los plásmidos PS711 y PS675 que contienen las secuencias para la expresión de las proteínas de fusión α_v -Fc y β_3 -Fc, respectivamente, usando fosfato de calcio (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). Para ello: un día antes de la transfección, las células HEK 293T de una placa de 100 cm² a una confluencia del 90 % se lavaron 2 veces con PBS y tripsinizadas con 0,5 mL de tripsina por 5 minutos. Luego se agregó 9,5 mL de DMEM suplementado con 5 % suero fetal bovino y 1 % penicilina/estreptomicina. Las células fueron resuspendidas, se sembró 1 mL de esa suspensión en una placa de cultivo de 100 cm² que contenía 9 mL de medio fresco. El día de la transfección se mezcló al mismo tiempo 0,5 mL de solución A (500 mM CaCl₂ en agua ultra pura y filtrada) con 20 μ g del plásmido PS711 y 20 μ g del plásmido PS675. Luego se agregó 0,5 mL de solución B (140 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,05, 1,5 mM Na₂PO₄ en agua ultra pura filtrada) por exactamente 60 segundos para formar el precipitado de fosfato de calcio. Luego, se adicionó la solución resultante a las células sembradas el día anterior. Transcurridas 4 horas, el medio se reemplazó por medio fresco. Al día siguiente se removió el medio completo y se reemplazó por 6 mL de DMEM sin suero. La proteína recombinante $\alpha_v\beta_3$ -Fc es secretada por las células al medio de cultivo (Hermosilla, Muñoz et al. 2008). La proteína se recolectó del sobrenadante de medio de cultivo luego de 48 horas post-transfección en medio libre de suero. La detección de la proteína recombinante se realizó por Western blot contra la región Fc, previa precipitación con proteína A-sefarosa.

4.5- Ensayos de retracción de procesos neuronales en células CAD y en cultivos corticales de rata.

Las células CAD se sembraron con medio completo a una densidad de 10.000 células/cm² y mantenidas en incubadora toda la noche. A continuación, las células se diferenciaron por privación de suero y adición de selenito de sodio 50 ng/mL por 24 horas. Luego, se adicionó el sobrenadante que contiene la proteína $\alpha v\beta 3$ -Fc o medio control depletado de la proteína de fusión (depletado por precipitación con proteína A-Sefarosa)(Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012) a razón de 100 μ L de integrina o control por mL de medio de diferenciación de células CAD, en cursos temporales de hasta una hora. Luego, se obtuvo lisados celulares, o las células se siguieron por microscopía *in situ*, o bien las células se fijaron para la realización de inmunofluorescencia indirecta.

El crecimiento de procesos neuronales se siguió por microscopía, obteniendo microfotografías a los distintos tiempos para el posterior análisis morfológico. El largo de los procesos neuronales se midió utilizando el plug-in NeuronJ para ImageJ. Considerando el inicio de la neurita en el soma y su término en el final del terminal. Se consideraron sólo aquellos procesos en que se pudiese distinguir claramente su inicio y final dentro del campo visualizado con el objetivo 40X. Se consideraron diferenciadas todas aquellas células que presentaban al menos una prolongación igual o mayor a 15 μ m (aproximadamente 1,5 veces mayor que el soma celular).

En el caso de los ensayos realizados con neuronas corticales de rata, luego de 14 días de cultivo las neuronas se incubaron con Integrina $\alpha\beta3$ a distintos tiempos y se realizaron los distintos experimentos. Para la medición del largo de los procesos neuronales se siguieron los mismos protocolos descritos para células CAD. Se midieron los procesos de al menos 100 células por condición y tiempo. Los experimentos se realizaron 3 veces en forma independiente.

4.6- Inmunofluorescencia indirecta.

En los ensayos de Inmunofluorescencia las células se fijaron con paraformaldehído al 6% en buffer HBSS++ durante 20 minutos, luego de lo cual las células se lavaron 4 veces durante 5 minutos con un buffer que contenía: 10% suero fetal bovino, 0,1 mM de glicina y 0,1% Tritón X100 en buffer HBSS++. A continuación se incubaron las muestras con anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente (tabla 2). Seguidamente, se realizaron 3 lavados con PBS. Luego se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente; anti-IgG de ratón Alexa-488 (1:400), anti-IgG de conejo (1:400), anti-IgG de ratón Atto (1:200), anti-IgG de conejo Atto (1:400), anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo Abberior (1:200). Finalmente, las muestras se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos y montadas en portaobjeto con 7 μ l de mowiol (con 2,5% DABCO).

Las imágenes obtenidas a partir ya sea de microscopía confocal (Olympus IX81 Fv 1000) o bien microscopía STED (Leica TCS STED-SP5), primeramente se

de-convolucionaron utilizando el software Huygens profesional. Luego, las imágenes se analizaron utilizando NeuronJ para medir el largo de procesos neuronales y el software Imaris para los análisis de co-localización e intensidad de spots. Se analizaron 10 procesos por condición y tiempo. Los experimentos se realizaron 3 veces en forma independiente.

Para el análisis de tamaño de cluster de Thy-1, el área del cluster y el análisis de intensidad de señales en función de la distancia se calculó utilizando imágenes obtenidas por STED con el programa ImageJ. El largo de spots de señales co-localizadas y la distancia entre centros de masas de señales co-localizadas se analizaron utilizando la herramienta “análisis avanzado de objetos” del programa Huygens profesional.

4.7- Ensayos de microscopía de lapsos de tiempo *in situ* y evaluación de velocidad de crecimiento de neuritas.

Para todos los ensayos realizados *in situ*, las células CAD se sembraron en placas especiales para este tipo de microscopía a una densidad de 5.000 células/cm². Al día siguiente las células se transfentaron usando fosfato de calcio con los plasmidios que codifican para: en el caso de los ensayos realizados para evaluar la participación de RhoA, la proteína fusión GST-RBD, dominante negativo de RhoA-GFP, GFP. En el caso del análisis de la participación de Src se co-transfectó con pEGFP y una construcción de Src constitutivamente activa (SrcCA) o con pEGFP y el plasmidio vacío pCMV1 de acuerdo al protocolo previamente descrito por nuestro laboratorio

(Hermosilla, Muñoz et al. 2008; Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). Al día siguiente de la transfección, las células se diferenciaron de acuerdo al protocolo descrito en el punto 4.5 y 24 horas más tarde, se les adicionó el estímulo de integrina. Las células se monitorearon con un microscopio confocal (Olympus FV10i) *in situ* en forma individual en lapsos de tiempo de 10 minutos por 1 hora. Esto permitió calcular la velocidad de crecimiento de los procesos, midiendo en las fotografías obtenidas, el largo de cada proceso en forma individual y calculando la pendiente de la curva de largo versus tiempo. Los valores negativos reflejan el acortamiento de procesos. Para cada condición se midió el largo de 100 neuritas en el tiempo. Los experimentos se realizaron 3 veces en forma independiente.

4.8- Ensayos de inmunprecipitación con proteína A-sefarosa.

Neuronas corticales (una placa de 100 cm²) o células CAD diferenciadas (una placa de 100 cm²), estimuladas o no con integrina $\alpha\beta$ 3-Fc durante 20 minutos, fueron lisadas utilizando buffer Chaps (20 mM Chaps, en buffer 10mM Tris-OH pH 7,2 que contiene: 50 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamida y 0,5 mM Na₃VO₄) en hielo mediante raspado de la placa con Cell-scrapers. Luego los lisados se centrifugaron por 20 minutos a 15.000 g y la fracción soluble de proteína se utilizó para la precipitación con anticuerpo (1 mg de proteína). Las muestras obtenidas se incubaron con 10 μ L de anti-CBP, anti- Thy-1 o un anticuerpo no relacionado como control durante 1 hora a 4°C. A continuación las muestras se incubaron durante 1 hora a 4°C con 50 μ L de proteína A-sefarosa. Las muestras luego se centrifugaron a 1000 g durante

1 minuto a 4°C y el sobrenadante se guardó para su posterior análisis. Los precipitados obtenidos se lavaron 3 veces con PBS frío con centrifugaciones de 1 minuto a 1000 g a 4°C. Finalmente, los precipitados obtenidos se re-suspendieron con 50 µL de buffer de carga 4x y hervidos 5 minutos a 100°C para su posterior análisis por Western blot.

4.9- Obtención de proteínas recombinante GST-RBD.

La producción de la proteína recombinante de fusión GST-RBD se realizó en cultivos de *E.coli* previamente transformadas con el plasmidio pGEX-2p que contenía la secuencia que codifica para esta proteína de acuerdo al protocolo descrito (Worthylake, Lemoine et al. 2001). A partir del glicerol stock se sembró bacterias en una placa de medio LB-agar con 50 µg/mL de ampicilina y se incubó a 37°C durante toda la noche. El día siguiente a partir de una colonia aislada se realizó un pre-inóculo de 40 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina durante al menos 5 horas a 37 °C en baño termostático con agitación (200 rpm). Luego el pre-inóculo se llevó a 400 mL de medio LB fresco con 100 µg/mL de ampicilina e incubado a 37 °C en baño termostático con agitación por una hora. A continuación se le adicionó 0,6 mM de IPTG para inducir la expresión de la proteína y se incubó a 20 °C toda la noche con agitación (16 horas). Al día siguiente se separó el cultivo en tubos de 50 mL y las bacterias se centrifugaron a 3000 x g por 30 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y las bacterias se re-suspendieron en 1 mL de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 50 mM NaCl, 5 mM MgCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, BAL 1X, 1% Tritón X-100 y 10% etilenglicol). A continuación las bacterias se sonicaron en hielo mediante 6 pulsos de 20 segundos a 75 Watts cada vez. Las muestras

se centrifugaron a 13000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Luego se rescató el sobrenadante y se incubó con 1 mL de esferas de glutatión-agarosa durante 1 hora a 4 °C por rotación. Luego las esferas se recuperaron centrifugando a 13000 x g por 1 minuto y se realizaron 3 lavados con tampón de lisis y luego tres lavados con tampón de lisis sin Tritón. Finalmente, las esferas se re-suspendieron en 500 µL de tampón de lisis sin Tritón y se les adicionó 500 µL de glicerol, las proteínas fueron alicuotadas y congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta su utilización. Expresión y purificación de la proteína fusión fue corroborada por Western blot y/o tinción con azul de Tripiano.

4.10- Ensayos de precipitación por afinidad e inmunofluorescencia para RhoA activo.

Una placa de 100 cm² de células CAD se trató con integrina $\alpha\beta3$ (100 µL/mL) y luego lisadas, en hielo, utilizando buffer (25 mM Tris-Glicina pH 7,2; 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% NP-40, 5% glicerol e inhibidores de proteasas), luego de lo cual, las muestras se centrifugaron a 16000 x g por 15 minutos. La fracción de proteína soluble se incubó durante 1 hora a 4°C con 100 µL de la proteína recombinante GST-RBD previamente unida a GSH-sefarosa. RBD corresponde al dominio de unión a Rho de Rhotekin, el cual reconoce a RhoA activo. Luego, las muestras se centrifugaron a 1000 g por 1 minuto y lavadas con el mismo buffer de lisis 3 veces. Finalmente los precipitados obtenidos se re-suspendieron en 50 µL de buffer de carga 5x se incubaron durante 5 minutos, luego de lo cual se realizó una última centrifugación a 2000 g por 1 minuto a

4°C. Las muestras se hirvieron a 100°C por 5 minutos y posteriormente analizadas por Western blot.

Para la inmunofluorescencia de RhoA activo, la proteína GST-RBD se utilizó como primer anticuerpo contra RhoA activo, en muestras fijadas y tratadas de acuerdo al punto 4.6. Luego, se lavó tres veces con PBS frío por 5 minutos cada vez. A continuación se utilizó un anticuerpo anti-GST de conejo (1:200) y se continuó con el protocolo estándar para inmunofluorescencia antes descrito en el punto 4.6.

4.11- Análisis por Western Blot.

Neuronas corticales o células CAD diferenciadas (sembradas de acuerdo a sección 4.2) fueron lisadas utilizando buffer Ripa (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS) y raspando las placas utilizando cell scrapers en hielo. Luego las muestras obtenidas se centrifugaron por 20 minutos a 15.000 g. La fracción de proteína soluble se recuperó y cuantificó (ver sección 4.12). Luego se cargaron 50 ug de proteína por carril en geles de 10 ó 12% acrilamida. Los geles se corrieron a voltaje constante (100 volts) hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a voltaje constante (100 volts 2 horas). Las membranas se bloqueron utilizando leche descremada al 5% en PBS 0,1% Tween durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes toda la noche a 4°C (Tabla 1). Posteriormente, se realizó 3 lavados de 10 minutos con PBS 0,1 %

Tween y se incubó con el segundo anticuerpo 1 hora a temperatura ambiente; anti- IgG de ratón (1:3000), anti- IgG de conejo (1:5000). A continuación se realizó 3 lavados de 10 minutos con PBS 0,1 % Tween y se incubó la membrana con solución quimio-luminiscente (femto- sensible para análisis de fosforilaciones y pico sensible para inmunoprecipitaciones) y finalmente se expuso la membrana contra un film fotográfico o bien se utilizó sistema de revelado con cámara digital.

Tabla 2: Resumen de anticuerpos primarios utilizados.

Tabla muestra lista de anticuerpos utilizados, especie hospedera, clonalidad, aplicación y dilución en la que se utilizó el anticuerpo.

Anticuerpo contra	Especie hospedera	Clonalidad	Empresa	Aplicación	Dilución
Thy-1	Conejo	policlonal	ProScience	WB	1:2000
				IFI	1:400
				IFI-STED	-----
Thy-1	Ratón	Monoclonal	BD Pharmingen	WB	1:1000
				IFI	1:200
				IFI-STED	1:100
CBP	Conejo	policlonal	Abcam	WB	1:1500
				IFI	1:400
				IFI-STED	1:200
CBP	Ratón	Monoclonal	Abcam	WB	1:1000
				IFI	1:200
				IFI-STED	1:100
Src	Conejo	policlonal	Cell signaling	WB	1:2000
				IFI	1:200
				IFI-STED	1:200
Src	Ratón	Monoclonal	Millipore	WB	1:1000
				IFI	1:200
				IFI-STED	-----
CSK	Ratón	Monoclonal	Millipore	WB	1:500
				IFI	-----
				IFI-STED	1:50

RhoA	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz	WB	1:250
				IFI	1:100
				IFI-STED	-----
ROCK 1	Conejo	policlonal	Cell signaling	WB	-----
				IFI	1:200
				IFI-STED	-----
Cofilina	Conejo	policlonal	Cell signaling	WB	1:1000
				IFI	-----
				IFI-STED	-----
pCofilina	Conejo	policlonal	Cell signaling	WB	1:1000
				IFI	-----
				IFI-STED	-----
Miosina	Conejo	policlonal	Cell signaling	WB	1:1000
				IFI	-----
				IFI-STED	-----
pMiosina	Conejo	policlonal	Cell signaling	WB	1:1000
				IFI	-----
				IFI-STED	-----
Actina	Conejo	policlonal	Sigma	WB	1:5000
				IFI	-----
				IFI-STED	-----
MAP2	Ratón	Monoclonal	Cell signaling	WB	-----
				IFI	1:1000
				IFI-STED	-----
GST	Conejo	policlonal	Millipore	WB	-----
				IFI	1:500
				IFI-STED	-----

Tabla 3: Resumen de anticuerpos Secundarios utilizados.

Tabla muestra lista de anticuerpos utilizados, especie hospedera, aplicación y dilución en la que se utilizó el anticuerpo.

Anticuerpo contra	Conjugado Con	Especie hospedera	Empresa	Aplicación	Dilución
Ratón	HRPO	Cabra	Cell signaling	WB	1:2000
Conejo	HRPO	Cabra	Cell signaling	WB	1:2000
Ratón	HRPO	Cabra	KPL	WB	1:3000

Conejo	HRPO	Cabra	Sigma	WB	1:5000
Ratón	Alexa 488	Cabra	Life Technologies	IFI	1:200
Conejo	Alexa 546	Cabra	Life Technologies	IFI	1:200
Ratón	ATTO 647N	Cabra	ATTO tec	IFI-STED	1:400
Conejo	ATTO 647N	Cabra	ATTO tec	IFI-STED	1:400
Ratón	Abberior Star 580	Cabra	Abberior	IFI-STED	1:200
Conejo	Abberior Star 580	Cabra	Abberior	IFI-STED	1:200

4.12- Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas totales para todos los ensayos, fue realizado utilizando el kit comercial de Pierce “BCA protein assay” de acuerdo a las instrucciones del fabricante en placas de Elisa.

4.13- Purificación y cuantificación de plasmidios.

La purificación de plasmidios se realizó utilizando el kit de purificación NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey-Nagel) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación del DNA se realizó utilizando 2 µL del plasmidio purificado en un equipo NanoQuant Infinite modelo M200Pro (TECAN).

4.14- Inmunoprecipitación y análisis por Maldi-Tof.

Células CAD diferenciadas (sembradas de acuerdo a sección 4.2) se lizaron por raspado de las placas de cultivo con tampón Chaps (20 mM Chaps, en buffer 10mM Tris-OH pH 7,2 que contiene: 50 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamida y 0,5 mM Na₃VO₄) en hielo. Luego, las muestras se centrifugaron a 16000 x g por 15 minutos

y se recuperó la fracción soluble de las proteínas. A continuación las muestras se precipitaron utilizando el kit Amino-link de Pierce de acuerdo a las instrucciones del fabricante y un anticuerpo contra Thy-1. Luego, los precipitados obtenidos se concentraron utilizando una centrifuga speed vac a temperatura ambiente y re-suspendidas en 100 uL de 50 mM NH_4HCO_3 . Los precipitados re-suspendidas se incubaron con 25 μL de 45 mM DTT a 50 °C por 15 minutos y luego con 25 μL de 100 mM iodoacetamida por otros 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se incubaron con 5 μL de tripsina porcina y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Los péptidos obtenidos se desecaron por speed vac y se disolvieron en 0,1% v/v de ácido fórmico. Una alícuota de cada muestra se desalinizó utilizando Zip Tip C18. Como matriz para Maldi-Tof se utilizó una solución stock de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico disolviendo 10 mg/mL de la matriz en 50% v/v de acetonitrilo y 0,05% v/v de ácido fórmico. La matriz se mezcló a razón de 1:10 con las muestras las que se cristalizaron en la placa para Maldi-Tof (micro scout target). Los espectros de masas se adquirieron en un equipo Maldi-Tof tipo Microflex (Bruker Daltonics) en modo positivo y modo reflexión. El análisis de los espectros obtenidos se realizó para identificación de proteínas usando las herramientas “peptide mass fingerprint” y “sequence Query” de la base de datos de Mascot.

4.15- Análisis estadísticos.

Todos los experimentos se realizaron al menos en triplicado en forma independiente. La normalidad de los datos obtenidos se analizaron utilizando el test Shapiro Wilk. Los

datos obtenidos de la medición del largo de procesos neuronales presentaron distribuciones normales, por lo que se el análisis estadístico se realizó utilizando T-Student o bien ANOVA de dos vías dependiendo si se deseaba analizar diferencias entre 2 o más grupos independientes. En la ANOVA se utilizó luego el análisis de Bonferroni para determinar la diferencia entre los distintos grupos de estudio. En el caso de los datos obtenidos en los análisis por Western blot y análisis de imágenes por inmunofluorescencia; los datos se analizaron utilizando ManWithney-U o bien Kruskal-Walis, dependiendo si se deseaba analizar diferencias entre 2 o más grupos independientes. Los datos se expresaron como promedio \pm error estándar medio (SEM) en todos los casos. En todos los casos se consideró significativo un valor probabilístico $p < 0,05$. El software utilizado para estadísticas fue SPSS ver 22 y Graphpad prisma versión 5 para graficar.

5-Resultados

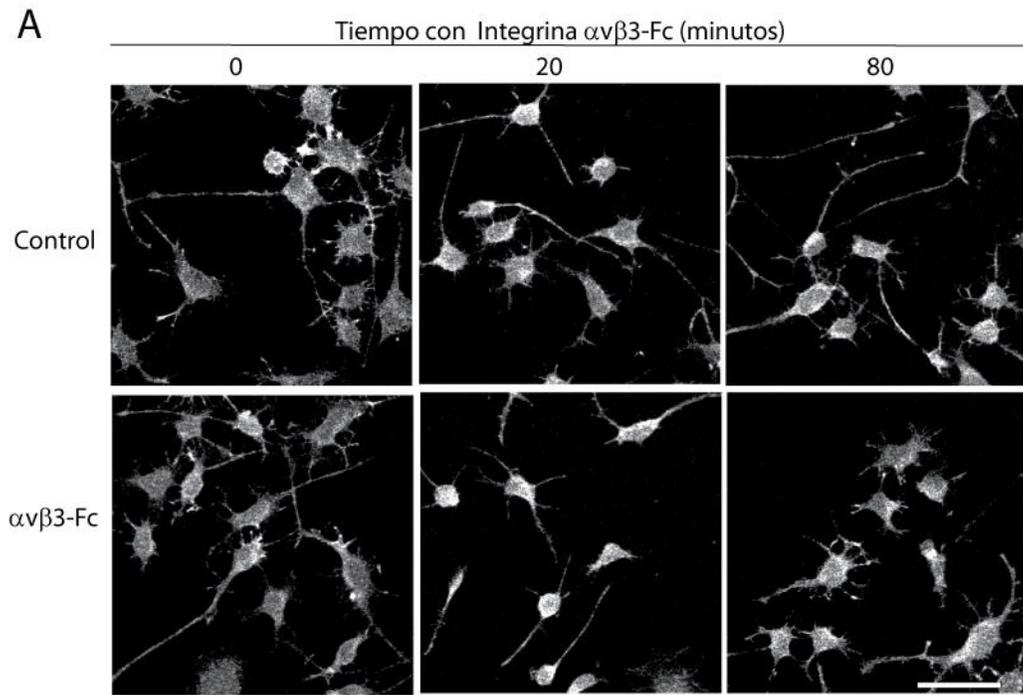
5.1- Resultados objetivo específico número 1: “Evaluar la inhibición de Src y activación de las vías RhoA/ROCK/LIMK/Cofilina y RhoA/ROCK/MLCII en la retracción neurítica e inhibición del crecimiento mediada por integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1 en células CAD”

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la interacción entre la Integrina $\alpha\beta3$ y Thy-1 causa retracción de neuritas, inhibición del crecimiento de neuritas y un incremento en la fosforilación inhibitoria de Src (Y527) (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). En el presente estudio se realizó, estudios cinéticos para observar la ocurrencia temporal de estos eventos en células CAD, y permitir así relacionar la vía de señalización gatillada río abajo de Thy-1 (por la adición de Integrina) con la retracción de procesos neuronales.

5.1.1-Estudio de la retracción de neuritas en células CAD diferenciadas.

Para estos ensayos células CAD se diferenciaron durante 24 horas, luego de lo cual se les adicionó Integrina $\alpha\beta3$ -Fc por hasta 160 minutos. Estas células se siguieron por microscopía de contraste de fases y el largo de las neuritas se midió en las imágenes obtenidas (Fig. 8 A). Encontramos que Integrina $\alpha\beta3$ causa retracción de neuritas. La retracción de procesos fue estadísticamente significativa a partir de los 20 minutos de estimulación (Fig. 8 A y 8 B), alcanzando un máximo a partir de los 40 minutos de estimulación, luego de lo cual el largo de las neuritas se estabilizó (40 a 160 minutos).

Por otra parte, el largo de las neuritas tratadas con el medio depletado de Integrina (control) se mantuvo constante durante todo el ensayo, no observándose acortamiento. Esta cinética nos permitió establecer que el estudio de señalización río abajo de Thy-1, se realizó a tiempos entre 0 y 40 minutos de estimulación en células CAD.



B

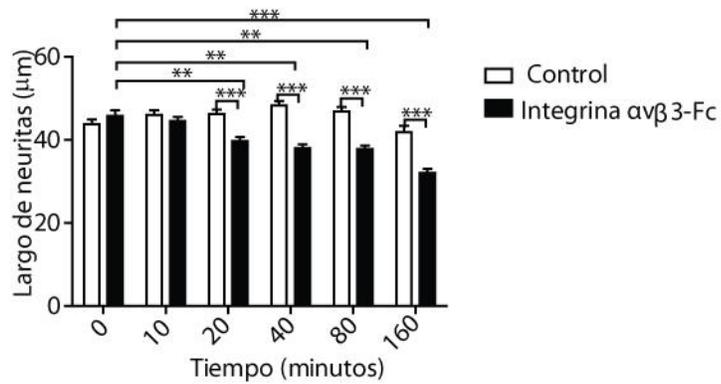


Figura 8: Integrina $\alpha\beta3$ causa retracción de neuritas:

Células CAD diferenciadas se estimularon o no con Integrina $\alpha\beta3$ -Fc por hasta 160 minutos, luego de lo cual a partir de las imágenes obtenidas se midió el largo de las neuritas. A- Imágenes representativas de células CAD tratadas o no (control) a distintos tiempos con Integrina, obtenidas de células teñidas por inmunofluorescencia indirecta contra Thy-1. Barra blanca representa 30 μm . B- Cuantificación del largo de neuritas promedio de células tratadas o no con Integrina. Datos se muestran como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. En cada experimento se midieron las neuritas de 100 células por condición y tiempo. El análisis estadístico utilizado fue una ANOVA de dos vías. **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

5.1.2- Evaluación de la participación de Src en la retracción de neuritas mediada por Integrina $\alpha\beta3$ -Fc.

Siguiendo la misma metodología señalada en el punto anterior, se procedió a evaluar el grado de fosforilación de Src en sus fosforilaciones inhibitoria (Y527) y activadora (Y416), en cinéticas de estimulación con Integrina $\alpha\beta3$ por Western blot. Por una parte, se observó que la fosforilación inhibitoria de Src aumentó en forma gradual desde los 10 minutos (tendencia), siendo este aumento estadísticamente significativo a los 20 minutos de estimulación con Integrina (Fig. 9 A y 9 B), respecto a la condición basal. Por otra parte, encontramos que la fosforilación activadora de Src disminuyó significativamente a los 15 minutos de estimulación con Integrina (Fig. 9 C y 9 B). Estos hallazgos, nos permiten concluir que Integrina $\alpha\beta3$ causa la inactivación de Src. Además, dicha inactivación de Src podría encontrarse involucrada en la retracción de procesos neuronales mediada por Integrina.

Para evaluar si la inactivación de Src es necesaria para la retracción de neuritas causada por la adición de Integrina, utilizamos una construcción de Src constitutivamente activa (SrcCA, Src no fosforilable en Y527), para así eludir la señalización gatillada por

Integrina. Células CAD se co-transfectaron con plasmidios que codifican para GFP y SrcCA o bien con GFP y el plasmidio pCMV1 (Mock) como control. Luego las células se diferenciaron y se les incubó con Integrina durante 1 hora; tiempo durante el cual se siguieron por microscopía en lapsos de tiempo real (células GFP positivas). Interesantemente, el efecto de la retracción observado en células Mock causado por la adición de Integrina $\alpha\beta3$ fue bloqueado en las células transfectadas con SrcCA (Fig. 10 A). Además el seguimiento de las neuritas en células únicas en tiempo real, que nos proporciona esta clase de microscopía, nos permitió calcular la velocidad de crecimiento de neuritas. El control mostró una velocidad promedio de $-0,11 \pm 0,04 \mu\text{m}/\text{min}$, representando el signo negativo la retracción de neuritas (Fig. 10B); a diferencia de las células transfectadas con SrcCA de $+0,02 \pm \mu\text{m}/\text{min}$ (+ indica crecimiento). La diferencia encontrada es estadísticamente significativa. Estos hallazgos en su conjunto indican que Integrina $\alpha\beta3$ causa retracción de procesos neuronales a través de la inhibición de Src en células CAD.

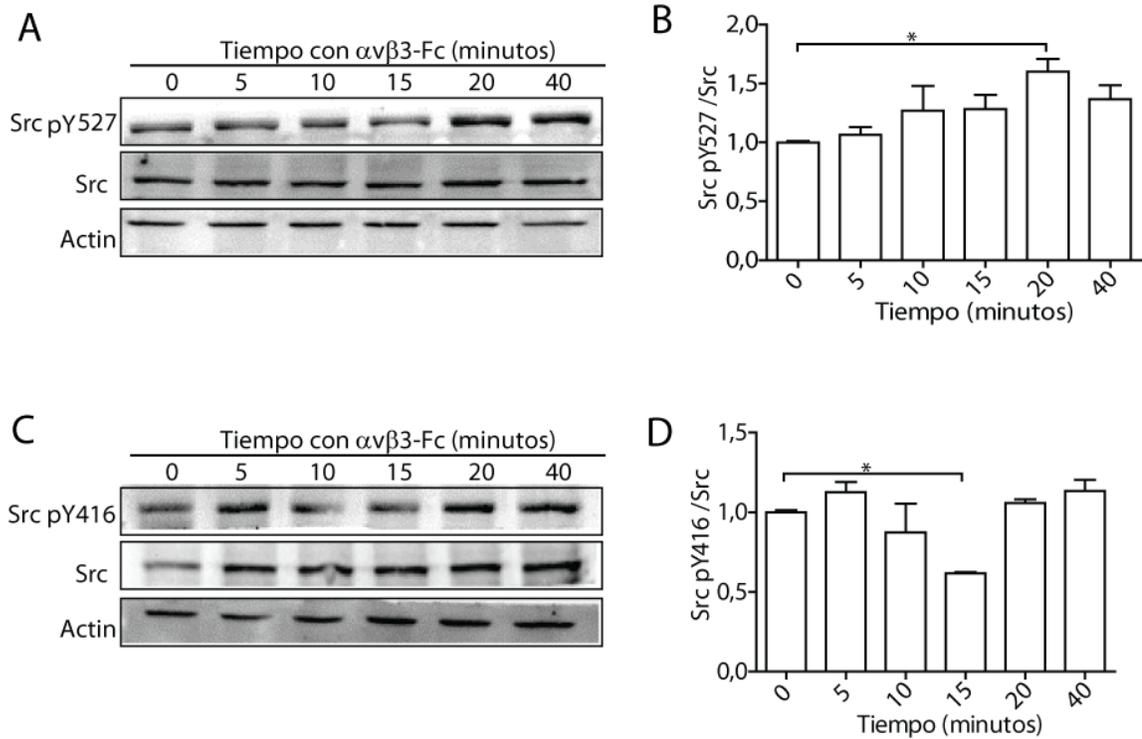


Figura 9: Integrina $\alpha\beta3$ incrementa la fosforilación inhibitoria de Src y disminuye la fosforilación activadora de Src.

Células CAD diferenciadas se estimularon o no con Integrina $\alpha\beta3$ -Fc a diferentes intervalos de tiempo, luego de lo cual se analizó el estado de fosforilación de Src por WB. A-Western blot, para Src pY527, Src y actina obtenido de lisados celulares de células CAD. B- Cuantificación de WB Src pY527/ Src estandarizados por el tiempo inicial. C- Western blot, para Src pY416, Src y actina obtenido de lisados celulares de células CAD. D- Cuantificación de WB Src pY416/ Src estandarizados por el tiempo inicial. Datos expresados como promedio \pm SEM de al menos 5 experimentos independientes. Se utilizó Mann Whitney U comparando el tiempo inicial con los respectivos tiempos. *= $p < 0,05$.

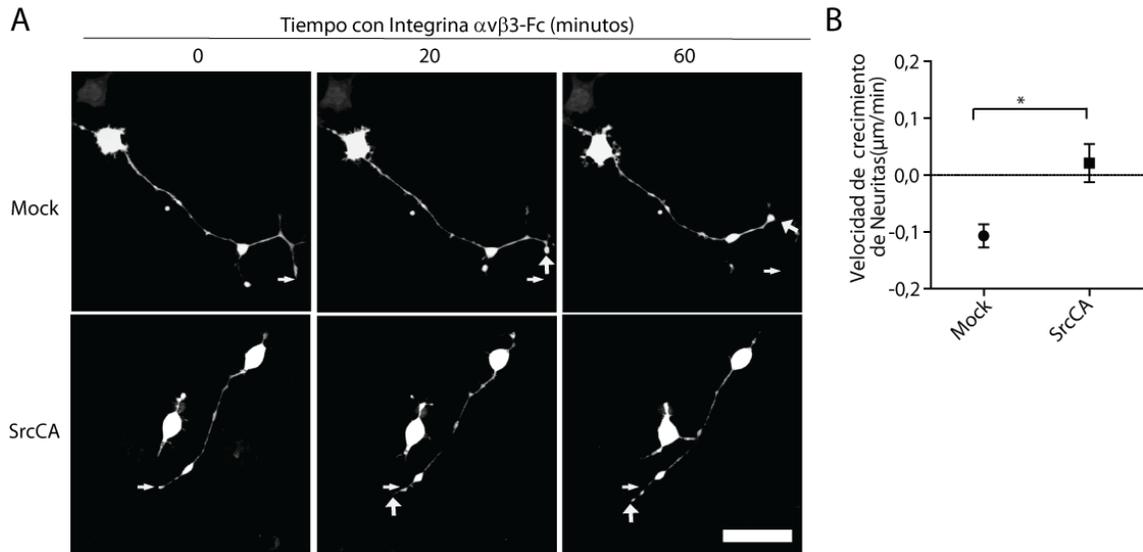


Figura 10: El uso de SrcCA bloquea la retracción de neuritas causada por Integrina $\alpha\beta$ 3.

Células CAD se co-transfectaron con los plasmidios pCMV1 y el que codifica para GFP (Mock) o bien con los plasmidios que codifican para GFP y Src constitutivo activo (SrcCA). Las células se diferenciaron por 24 horas y luego se incubaron con 100 $\mu\text{l}/\text{mL}$ de medio con integrina $\alpha\beta$ 3-Fc por 1 hora. Las células se siguieron por microscopía de lapsos de tiempo. A- Imágenes representativas de células Mock o SrcCA tratadas con Integrina. B-Se calculó la velocidad de crecimiento de neuritas. El signo negativo indica acortamiento. Datos se expresan como promedio \pm SEM. Se midieron 100 neuritas por condición, de 3 ensayos independientes. Barra blanca corresponde a 20 μm . Flecha triangular marca el punto más distal respecto al soma de la neurita en tiempo 0, flecha abierta muestra el punto más distal de la neurita respecto al soma luego de la estimulación con integrina $\alpha\beta$ 3.

5.1.3- Evaluación de la participación de RhoA en la retracción de neuritas mediada por Integrina $\alpha\beta$ 3-Fc.

Como previamente mencionamos RhoA es uno de los principales reguladores del citoesqueleto de actina en neuronas (Koh 2006). Por esta razón, decidimos evaluar si la adición de Integrina $\alpha\beta$ 3 afecta los niveles de RhoA activo en células CAD. Para ello, como primera aproximación experimental, realizamos ensayos de precipitación por

afinidad con una proteína fusión compuesta en su porción amino terminal por Glutation-S-transferasa (GST) y hacia el carboxilo terminal el dominio de unión de Rhotekin a Rho (RBD). Esta construcción posee una alta afinidad por la forma activa de RhoA (cargada con GTP). Encontramos que la forma activa de RhoA aumenta gradualmente a partir de los 10 minutos, observándose un aumento significativo respecto al basal a los 20 minutos de estimulación con Integrina (Fig. 11 A y 11 B). Además, como control positivo de la activación de RhoA las células CAD se estimularon por 5 minutos con 3% SFB y como control negativo las células se estimularon 20 minutos con medio libre de suero, depletado de Integrina (Fig. 11 A y 11 B). La activación de RhoA se corroboró realizando inmunofluorescencia contra RhoA activo en células CAD estimuladas con integrina; obteniéndose resultados similares, es decir, un incremento de la intensidad de fluorescencia a partir de los 20 minutos de estimulación (Fig. 11 C). Considerando estos resultados quisimos evaluar si la activación de RhoA es necesaria para la retracción de neuritas causada por Integrina $\alpha\beta3$. Para ello, utilizamos una construcción de RhoA dominante negativo-GFP (GFP-RhoA-DN) y una construcción GFP-RBD (RBD), la cual se une a RhoA activo e impide que se una con sus efectores inhibiendo su acción. Células CAD se transfectaron con una u otra construcción o bien con el vector vacío que contiene GFP (GFP-Mock). Las células se estimularon con Integrina $\alpha\beta3$ durante 1 hora y se siguieron por microscopía *in situ* por lapsos de tiempos. Las células que se transfectaron con GFP-RhoA-DN o bien con GFP-RBD presentaron menor complejidad y tamaño de neuritas una vez diferenciadas respecto a las células Mock (Tiempo 0) (Fig. 12A). Sin embargo, ni las células GFP-RhoA-DN ni

las células GFP-RBD estimuladas con Integrina retrajeron sus procesos, a diferencia de lo observado en las células control estimuladas (Fig. 12 A y 12 B). Esto se vió claramente reflejado en la velocidad de crecimiento de neuritas calculado (Fig. 12 B). Considerando estos resultados podemos concluir que Integrina $\alpha\beta3$ causa retracción de neuritas vía un incremento de la activación de RhoA en células CAD.

5.1.4- Evaluación de la activación de la vía de ROCK en la retracción de neuritas mediada por Integrina $\alpha\beta3$ -Fc.

ROCK es uno de los principales efectores de RhoA en neuronas. Para ser activado, ROCK necesita entrar en el bolsillo de unión a nucleótido generado por el cambio conformacional de RhoA luego de su carga con GTP (Ishizaki, Maekawa et al. 1996). Por esta razón, observamos la localización de RhoA y ROCK en neuritas estimuladas o no con Integrina por inmunofluorescencia. Luego de la estimulación con Integrina $\alpha\beta3$, RhoA se encontró preferentemente distribuido en el extremo terminal de las neuritas (Fig. 13 A). Por otra parte ROCK se encontró homogéneamente distribuido a lo largo de la neurita. Este resultado sugiere que en el extremo terminal de las neuritas RhoA y ROCK tendrían una mayor probabilidad de interacción y por tanto de activación de ROCK en forma localizada.

Para evaluar si la activación de ROCK es necesaria para la retracción de procesos neuronales causada por Integrina $\alpha\beta3$, medimos el largo de procesos neuronales de células CAD diferenciadas pre-incubadas o no con el inhibidor farmacológico de ROCK

Y27632 e incubadas con Integrina. Observamos que las células tratadas con el inhibidor de ROCK no mostraron retracción de neuritas, teniendo un comportamiento similar al control no tratado con Integrina (Fig. 13 B). Por el contrario, las células que no fueron tratadas con el inhibidor y estimuladas con Integrina mostraron acortamiento de neuritas a los 20 minutos, como ya antes descrito (Fig. 13 B). Además estudiamos el grado de fosforilación de 2 efectores río abajo de ROCK: MLCII (S19), y Cofilina (S3) en fosforilaciones atribuibles a un aumento de actividad de ROCK. Por una parte, MLCII integra el motor molecular de Actino-Miosina que regula la contracción celular. Y por otra parte, Cofilina regula la polimerización de los filamentos de Actina. Encontramos que tanto la fosforilación de Cofilina (Fig. 14 A y 14 B) como la de MLCII (Fig. 14 C y 14 D) se encontraron aumentadas a los 15 y 20 minutos de estimulación con integrina respectivamente. En conclusión podemos señalar que la adición de Integrina causa un aumento en la fosforilaciones río abajo de ROCK y que ROCK se encuentra involucrada en la retracción de neuritas.

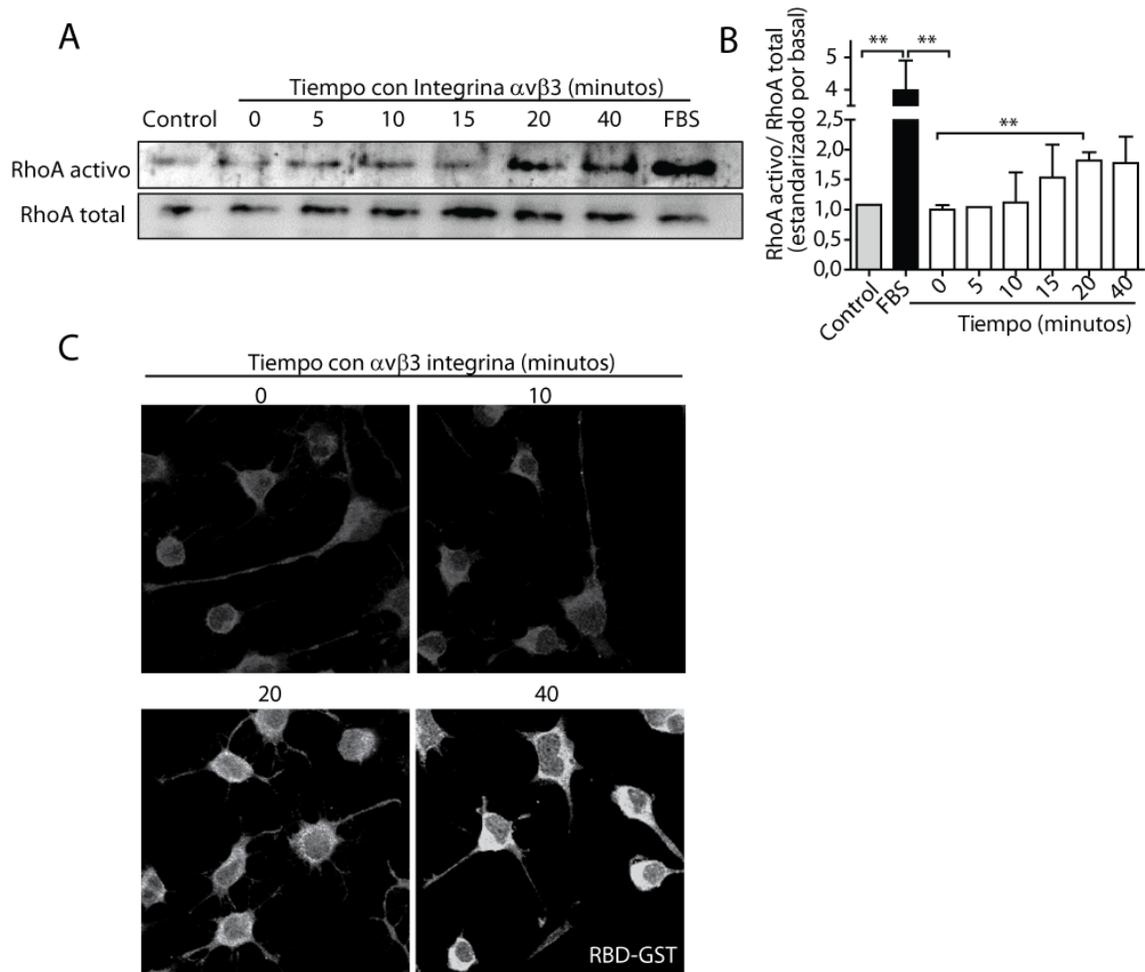


Figura 11: Integrina $\alpha\beta3$ incrementa la activación de RhoA en células CAD.

Células CAD diferenciadas se estimularon con integrina $\alpha\beta3$ a distintos tiempos, luego de lo cual se midió la forma activa de RhoA. A- Western blot para RhoA a partir de muestras aisladas por precipitación por afinidad con GST-RBD. Como control positivo se utilizó 5 minutos de estimulación con suero fetal bovino al 3% (FBS), como control negativo (Control) se utilizó 20 minutos de estimulación con medio depletado de integrina $\alpha\beta3$. B- Gráfico que resume la cuantificación de RhoA activo/RhoA total, estandarizado por el control. Resultados expresados como promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se consideró significativo $p < 0,05$ usando Mann Whitney U, $**p < 0,01$. C- Inmunofluorescencia indirecta contra RhoA activo obtenido con GST-RBD y luego anti-GST y un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo, en células CAD estimuladas con integrina.

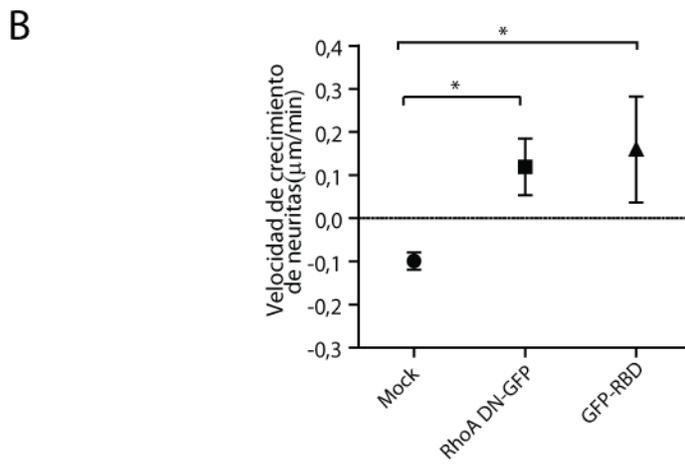
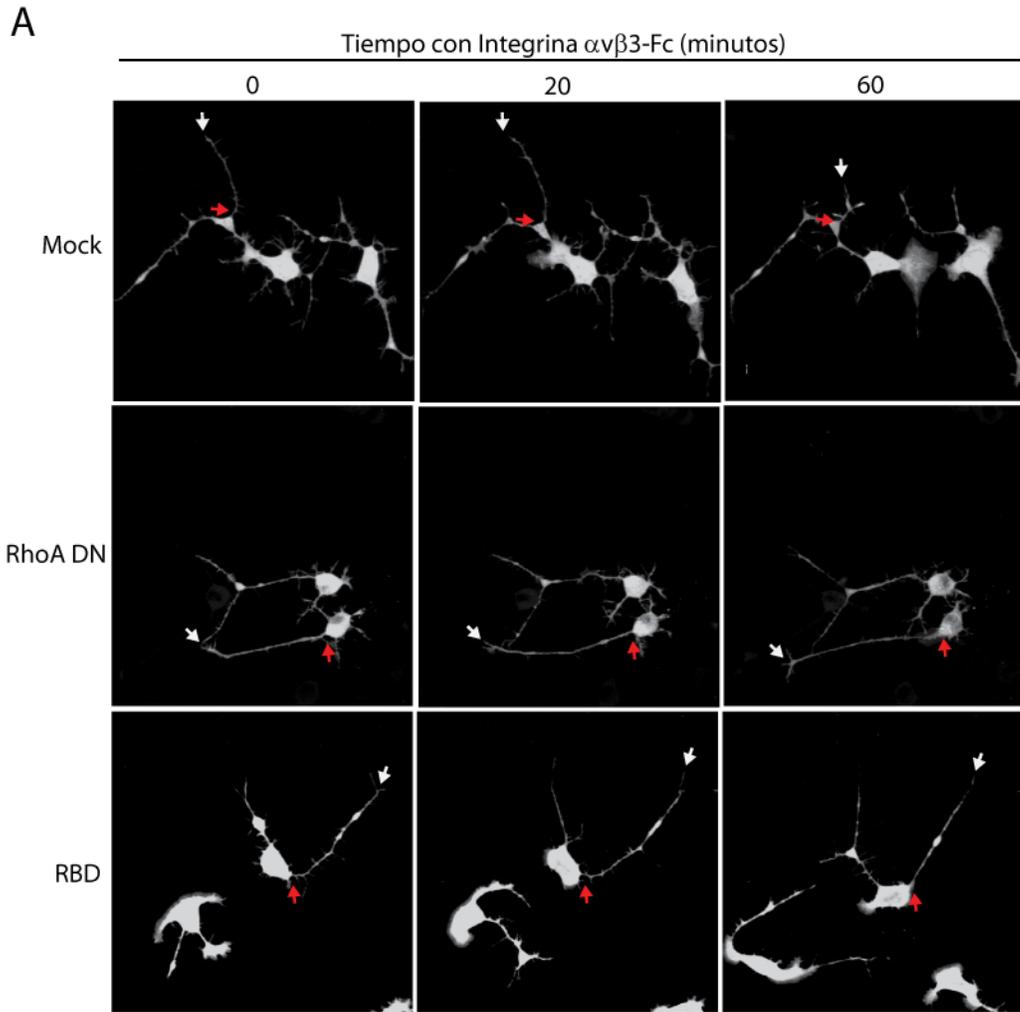


Figura 12: La activación de RhoA es requerida en retracción de neuritas causada por Integrina $\alpha\beta 3$.

Células CAD se transfectaron con construcciones que inhiben la acción de RhoA y luego se estimularon durante 1 hora con integrina $\alpha\beta 3$. Las células se siguieron por microscopía de lapsos de tiempo *in situ*. A- Microfotografías tomadas a diferentes tiempos de estimulación con integrina. En el panel superior se muestran células transfectadas con el vector vacío (GFP-Mock), el panel intermedio muestra células transfectadas con un dominante negativo de RhoA (GFP-RhoA DN), el panel inferior muestra células transfectadas con GFP-RBD. Flecha blanca señala el final de una neurita y flecha roja señala el inicio de una neurita a modo de ejemplo. B- Cuantificación de la velocidad de crecimiento de neuritas para las neuritas de 100 células por condición. Datos expresados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se consideró significativo un valor $*p < 0,05$ utilizando Mann Whitney U.

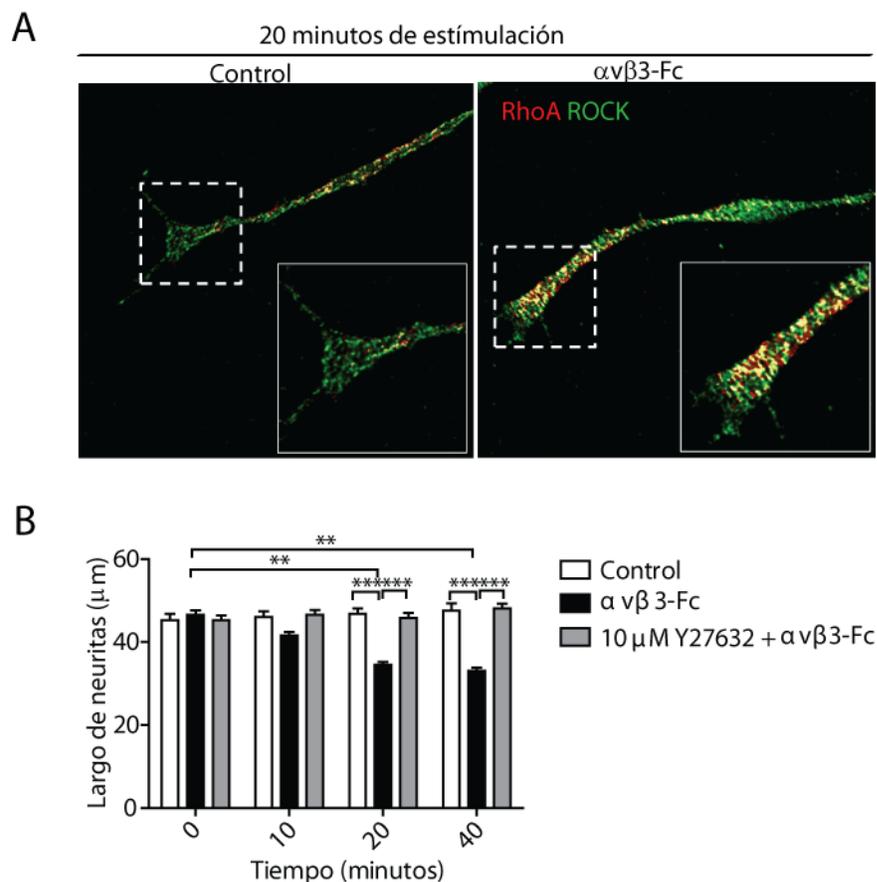


Figura 13: La inhibición de ROCK bloquea la retracción de neuritas causada por Integrina $\alpha\beta 3$.

A- Imágenes representativas de la localización de RhoA y ROCK obtenida del extremo más distal de las neuritas de células CAD diferenciadas y estimuladas o no con Integrina $\alpha\beta 3$ por 20 minutos, luego de lo

cual se realizó inmunofluorescencia indirecta contra ROCK (verde) y RhoA (rojo). Inserto es un zoom digital de 4x del área demarcada con líneas entrecortadas. B- Células CAD diferenciadas se trataron o no con 10 μ M de Y27632 (inhibidor de ROCK) durante una hora. A continuación las células se trataron o no con Integrina α v β 3 por 40 minutos. Las células se siguieron por microscopía de contraste de fases y se analizó el largo de las neuritas a partir de las imágenes obtenidas. Datos expresados como largo promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. En cada experimento se midieron las neuritas de 100 células al azar por cada condición y por cada tiempo. En el análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos vías. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

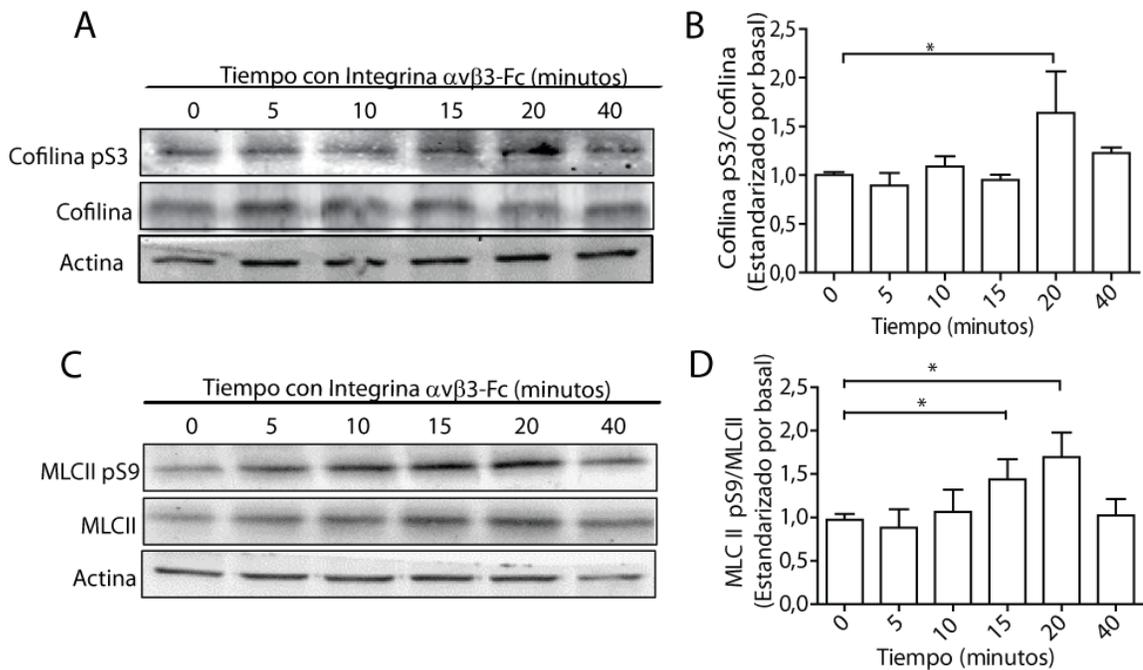


Figura 14: Integrina α v β 3 aumenta las fosforilaciones de MLCII y Cofilina en células CAD.

Células CAD diferenciadas se estimularon o no con Integrina α v β 3-Fc a diferentes intervalos de tiempo, luego de lo cual se analizó el estado de fosforilación de Cofilina y MLCII por WB. A- Western blot (WB) para Cofilina pS3, Cofilina y actina obtenido de lisados de células CAD. B- Cuantificación de WB Cofilina pS3/ Cofilina estandarizados por el tiempo inicial. C- WB para MLCII pS9, MLCII y actina obtenido de lisados de células CAD. D- Cuantificación de WB MLCII pS9/ MLCII estandarizados por el tiempo inicial. Datos expresados como promedio \pm SEM de al menos 5 experimentos independientes. Se utilizó Mann Whitney U comparando el tiempo inicial con los respectivos tiempos. * = $p < 0,05$.

5.2- Resultados objetivo específico número 2: “Identificar proteína(s) adaptadora(s) y evaluar su requerimiento en la inhibición de Src mediada por integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1 en células CAD”.

Previamente mostramos que Thy-1 es el receptor de Integrina $\alpha\beta3$ en neuronas (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). Sin embargo, Thy-1 no posee un dominio intracelular que nos permita atribuirle en forma directa una función en la inactivación de Src y en la activación de la vía de RhoA/ROCK observadas ante la adición de Integrina en células CAD. Es por ello que propusimos que Thy-1 requiere de una proteína adaptadora transmembrana que permita la transducción de la señal de Integrina al espacio intracelular. Estudiamos 2 posibles candidatas, las proteínas p75 y CBP.

5.2.1- Evaluación de p75, CBP y Thy-1 por inmunoprecipitación en células CAD.

El primer paso en este objetivo fue identificar si las proteínas p75 y CBP se detectaban en lisados de células CAD y/o co-precipitaban con Thy-1. Para ello, a partir de lisados de células CAD se inmunoprecipitó con anticuerpos comerciales contra Thy-1, p75 y CBP con proteína A sefarosa, utilizando buffer de lisis con CHAPS para mantener los complejos proteicos formados. Fue posible precipitar las 3 proteínas desde los lisados. Sin embargo, no fue posible observar ni co-precipitación de p75 con Thy-1 (Fig. 15 A y 15 B), ni co-precipitación de Thy-1 con p75 (Fig. 15A). En el caso de CBP se observó tanto co-precipitación de CBP con Thy-1 como de Thy-1 con CBP (Fig. 15 B).

Considerando el resultado anterior, se realizó ensayos de co-inmunoprecipitación para Thy-1 y CBP a partir de lisados de células CAD con y sin estimulación de integrina $\alpha\beta3$ -Fc durante 20 minutos. La co-inmunoprecipitación de Thy-1 con CBP aumentó ante el estímulo con integrina (Fig. 15 C y 15 D). Además, se observó que la interacción con $\alpha\beta3$ aumenta la precipitación de Thy-1 (Fig. 15 C), sugiriendo que la unión de la Integrina a Thy-1 aumenta la formación de agregados de Thy-1 (Clustering) haciendo más eficiente la precipitación.

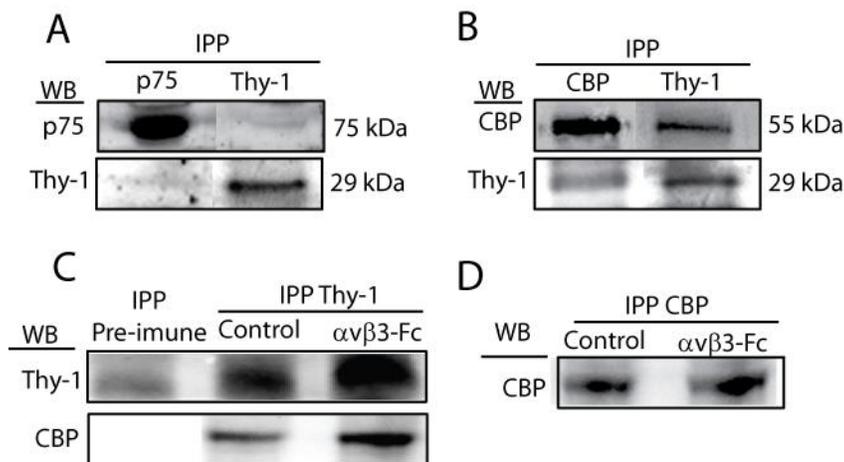


Figura 15: CBP, pero no p75, co-precipita con Thy-1 en células CAD.

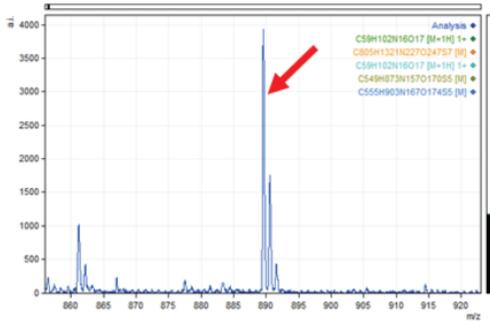
Utilizando lisados celulares obtenidos de células CAD se realizaron inmunoprecipitaciones para las proteínas p75, CBP y Thy-1 con proteína A-Sefarosa. A- WB contra p75 y Thy-1 de Inmunoprecipitado de Thy-1 y p75. B- WB contra CBP y Thy-1 de inmunoprecipitado de Thy-1 y CBP. C- WB contra CBP y Thy-1 de inmunoprecipitados contra Thy-1 obtenidos de celulares de células CAD estimuladas o no con Integrina $\alpha\beta3$ -Fc por 20 minutos. Como control negativo de precipitación se utilizó el suero pre-inmune del anticuerpo de Thy-1. D- WB contra CBP de inmunoprecipitado contra CBP obtenidos de lisados celulares de células CAD estimuladas o no con Integrina $\alpha\beta3$ -Fc por 20 minutos.

5.2.2- Análisis de inmunoprecipitados de Thy-1 por espectrometría de masas

Una vez confirmada la co-precipitación de Thy-1 y CBP quisimos identificar que otras proteínas podrían encontrarse precipitando con Thy-1. Para ello inmunoprecipitamos Thy-1 utilizando el kit Aminolink de Pierce, el cual permite unir el anticuerpo en forma covalente a la resina, y realizamos análisis por espectrometría de masas (MALDI-Tof). En primer lugar identificamos la presencia de péptidos correspondientes a Thy-1, confirmando su precipitación. Se observaron 2 péptidos de Thy-1 en el análisis de la secuencia correspondientes a los aminoácidos 155-162 (QALDFI SL carboxilo terminal) de la pre-pro-proteína (Fig. 16 A), señal observada a 890,0807 m/z y correspondientes a los aminoácidos 103 al 113 (SVYRDKLVKCG) de la proteína madura—no posee aminoácidos 1-19 (péptido señal) ni 131-161(pro-proteína)—señal observada a 1307,5697 m/z (Fig. 16 B). Interesantemente, este análisis permitió la identificación de péptidos de Src en la muestra (Tabla 2), lo cual confirma que Thy-1 y Src co-precipitan en células CAD. Además, este análisis mostró péptidos correspondientes a las proteínas RhoA y ROCK (Tabla 2).

A

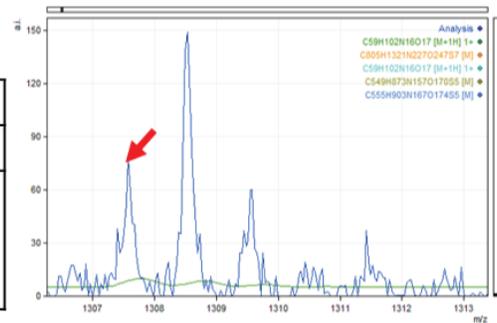
Aminoácidos	Masa Mo	Masa prom	Covertura
162	18344.5831	18355.9784	4.9 %
MNPAISVALL LSVLQVSRGQ KVTSLTACLV NQNLRLDCRH ENNTKDNSIQ HEFSLTREKR KHVLSGTLGI PEHTYRSRV LSNQPYIKVL TLANFTTKDE GDYFCELQVS GANPMSSNKS ISVYRDKLVK CGGISLLVQN TSWMLLLLLL LSL <u>QALDFI</u> SL			



Prom. m/z	Calc. m/z	δ (Da)	δ (ppm)	Rel. Int. (%)	Anotación	Formula
890.0807	890.0127	0.0679	76.3	0.67	155-162 thy-1	C42H64N8O13

B

Aminoácidos	Masa Mo	Masa Prom	Covertura
113	13095.6356	13103.6871	9.7 %
QKVTSLTACL VNQNLRLDCR HENNTKDNSI QHEFSLTREK RKHVLSGTLG IPEHTYRSRV TSNQPYIKV LTLANFTTKD EGDYFCELRV SGANPMSSNK SI <u>SVYRDKLV</u> KCG			



Prom. m/z	Calc. m/z	δ (Da)	δ (ppm)	Rel. Int. (%)	Anotación	Formula
1307.5697	1307.5449	0.0248	19.0	0.53	[y-H2O 11] [103-113] i.SVYRDKLVKCG. [1xCarbamidomethyl]	C57H95N17O 16S

Figura 16: Identificación por espectrometría de Masas de Thy-1 presente en células CAD.

Análisis por espectrometría de masas MALDI-ToF de inmunoprecipitados de Thy-1 obtenidos de lisados de células CAD. A- En la figura se muestran en el panel izquierdo la secuencia aminoacídica de Thy-1 (pre-pro-proteína) de ratón, número de aminoácidos, masa molecular, masa promedio y porcentaje de cobertura de los péptidos encontrados. A la derecha se muestra el espectro de masas obtenido, la flecha roja indica la señal del péptido encontrado. La tabla inferior muestra masa/carga promedio, masa/carga obtenida, diferencia entre promedio y obtenida, intensidad relativa, anotación del péptido y fórmula. B- Se presentan los mismos parámetros para la secuencia aminoacídica de Thy-1 (madura).

Tabla 4: Listado de proteínas que co-precipitan con Thy-1, detectadas por espectrometría de masas.

Listado de péptidos identificados por espectrometría de masas MALDI-Tof de proteínas que co-precipitan con Thy-1, obtenidas del análisis de inmunoprecipitado de Thy-1. En la tabla se muestra masa/carga promedio (Prom), masa/carga calculada (Calc), diferencia entre promedio y calculada (δ en Dalton y partes por millón), intensidad relativa de la señal (Rel. Int), anotación del péptido encontrado y fórmula del péptido encontrado.

Proteína	Prom. m/z	Calc. m/z	δ (Da)	δ (ppm)	Rel. Int. (%)	Anotación	Fórmula
Src	7.743.463	7.742.917	0.0546	70.5	0.99	[184-189] r.ESETTK.g	C27H48N7O17P
RhoA	7.714.163	7.713.380	0.0783	101.5	1.09	[123-128] r.NDEHTR.r	C29H46N12O13
ROCK	8.014.584	8.014.326	0.0258	32.2	71.82	[871-876] k.NRENLR.k	C31H56N14O11
ROCK	8.454.831	8.455.091	-0.0260	-30.8	47.91	[858-864] k.TQVKELK.e	C37H68N10O12
ROCK	8.594.897	8.594.996	-0.0098	-11.5	0.69	[61-67]	C36H66N12O12
ROCK	10.215.779	10.214.350	0.1429	139.9	3.99	[702-709] k.HQSIEEAK.s [1xPhospho]	C39H65N12O18P

5.2.3- Evaluación de la co-localización entre Thy-1, CBP y Src en neuritas de células CAD.

Una vez que identificamos que CBP, Thy-1 y Src podrían encontrarse formando un complejo en la membrana plasmática, que permitiera la transducción de señales de Integrina, quisimos analizar tanto si podrían ocurrir cambios localizados en las neuritas en la composición de este complejo; como si la temporalidad en estos cambios pudiesen estar asociados a los cambios en la transducción de señales descrita en el objetivo específico 1. Con este fin, realizamos estudios de co-localización entre estas 3 moléculas a distintos tiempos de estimulación con Integrina (0-80 minutos), usando inmunofluorescencia y microscopía confocal. Encontramos que la co-localización entre

Thy-1 y CBP se encontraba significativamente aumentada a los 20 minutos de estimulación con Integrina $\alpha\beta3$ (Fig. 17A y 17B). Por otra parte, la adición de Integrina disminuyó significativamente la co-localización de CBP y Src a los 20 minutos (Fig. 18A y 18B). Interesantemente, estos hallazgos son temporalmente coincidentes con la mayor parte de los eventos descritos para la señalización río abajo de Thy-1 en el objetivo 1, sugiriendo que CBP se podría encontrar involucrada en la retracción de neuritas y en la señalización gatillada por Integrina, sirviendo de transductor entre Thy-1 y Src.

5.2.4- Evaluación del requerimiento de CBP en la retracción mediada por Integrina $\alpha\beta3$ en células CAD.

Para evaluar la participación de CBP en la retracción de procesos neuronales causada por Integrina $\alpha\beta3$, silenciamos CBP en células CAD mediante el uso de shRNA contra el mensajero de CBP. Las células transfectadas se seleccionaron con puromicina durante 2 semanas, tiempo después del cual se realizaron los experimentos. Las células seleccionadas mostraron menor expresión de CBP (shCBP) comparadas con el control de transfección (shControl) (Fig. 19A). Por el contrario, la expresión de Thy-1 fue similar en ambas shCBP y shControl (Fig. 19A). Las células diferenciadas se estimularon o no con Integrina $\alpha\beta3$ durante 40 minutos. Encontramos que las células shControl mostraron acortamiento de neuritas a los 20 minutos de estimulación con Integrina con una cinética similar a la antes descrita (Fig. 19B y 19C). En cambio, las células shCBP y estimuladas con Integrina no mostraron acortamiento de neuritas (Fig. 19B y 19C) y presentaron un comportamiento similar a las células shControl no

estimuladas con Integrina (Fig. 19B y 19C). Este resultado indica que CBP se requiere para la retracción de neuritas inducida por Integrina $\alpha\beta3$.

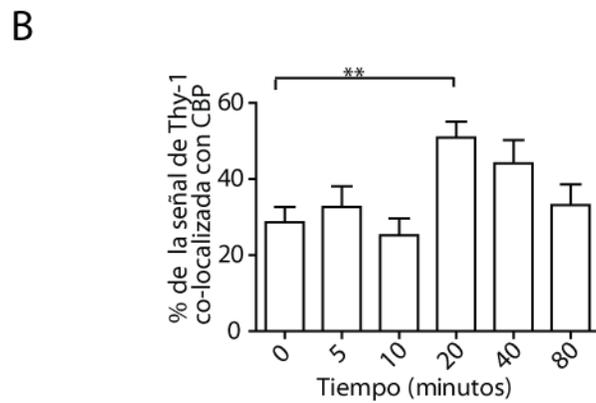
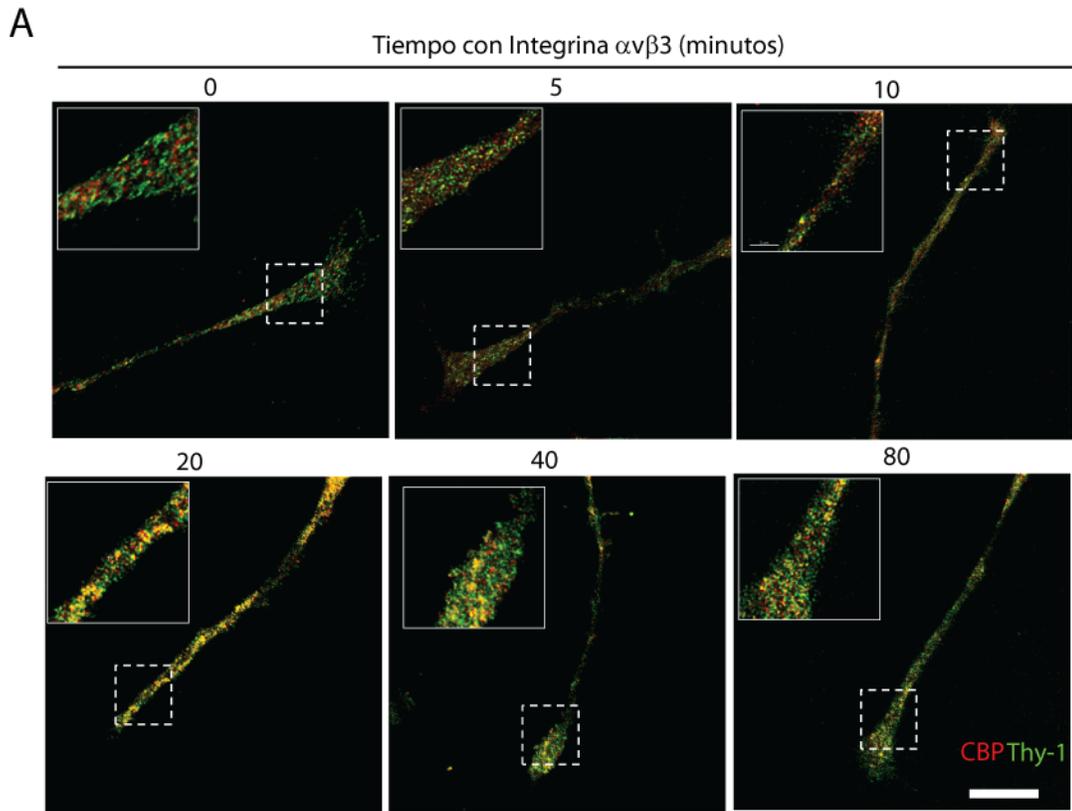
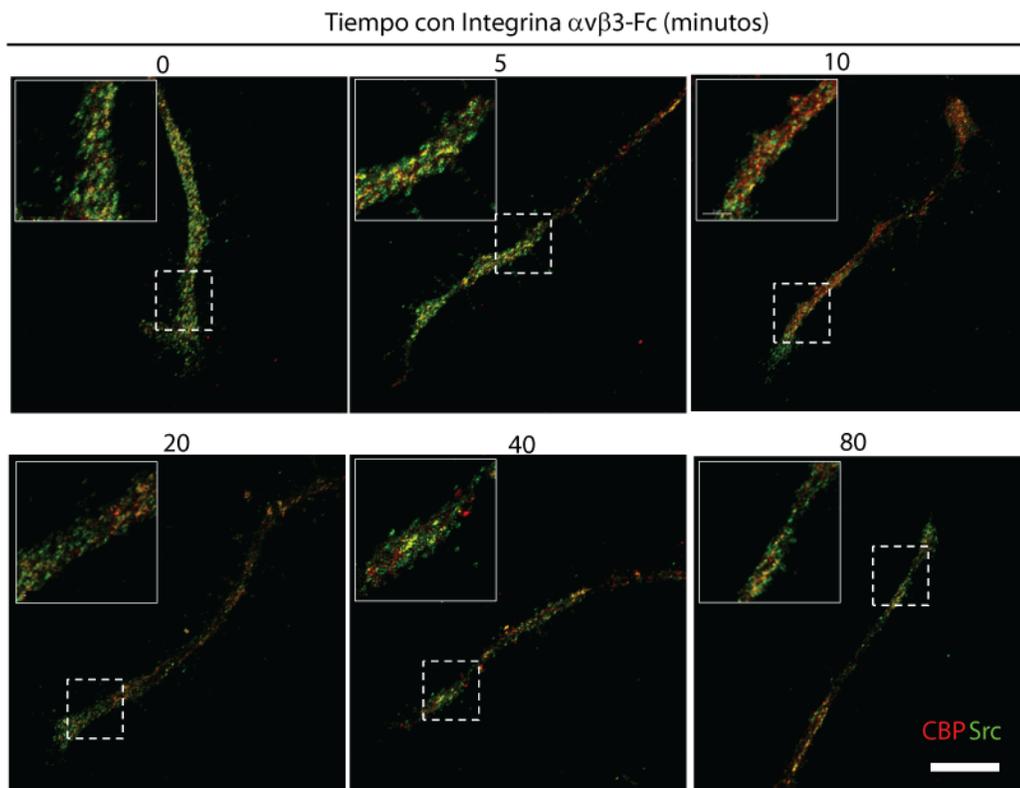


Figura 17: La adición de Integrina $\alpha\beta3$ aumenta la co-localización entre Thy-1 y CBP.

Células CAD diferenciadas se estimularon con integrina $\alpha\beta 3$ a distintos tiempos. A- Inmunofluorescencia indirecta para Thy-1 (verde) y para CBP (rojo) en los terminales de las neuritas, el color amarillo muestra co-localización entre ambas proteínas. B- Porcentaje de co-localización entre Thy-1 y CBP a los distintos tiempos de estimulación con integrina. Se midieron 10 procesos por cada condición y tiempo, datos mostrados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. $**p < 0,01$ utilizando Mann Whitney-U. La barra blanca representa 4 μ m. El recuadro representa un zoom 6x digital del área entre líneas entrecortadas.

A



B

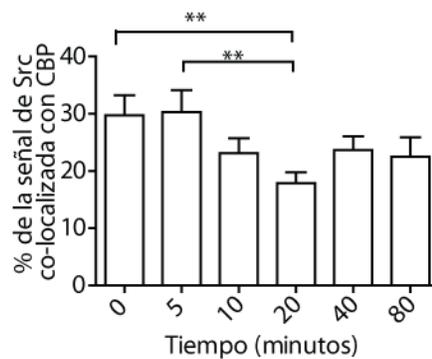


Figura 18: La adición de Integrina $\alpha\beta 3$ disminuye la co-localización entre CBP y Src.

Células CAD diferenciadas se estimularon con Integrina $\alpha\beta3$ a distintos tiempos. A- Inmunofluorescencia indirecta para Src (verde) y para CBP (rojo) en los terminales de las neuritas, el color amarillo muestra co-localización entre ambas proteínas. B- Porcentaje de co-localización entre Src y CBP a los distintos tiempos de estimulación con integrina. Se midieron 10 procesos por cada condición y tiempo, datos mostrados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. $**p < 0,01$ utilizando Mann Whitney-U. La barra blanca representa 4 μm . El recuadro representa un zoom 6x digital del área entre líneas entrecortadas.

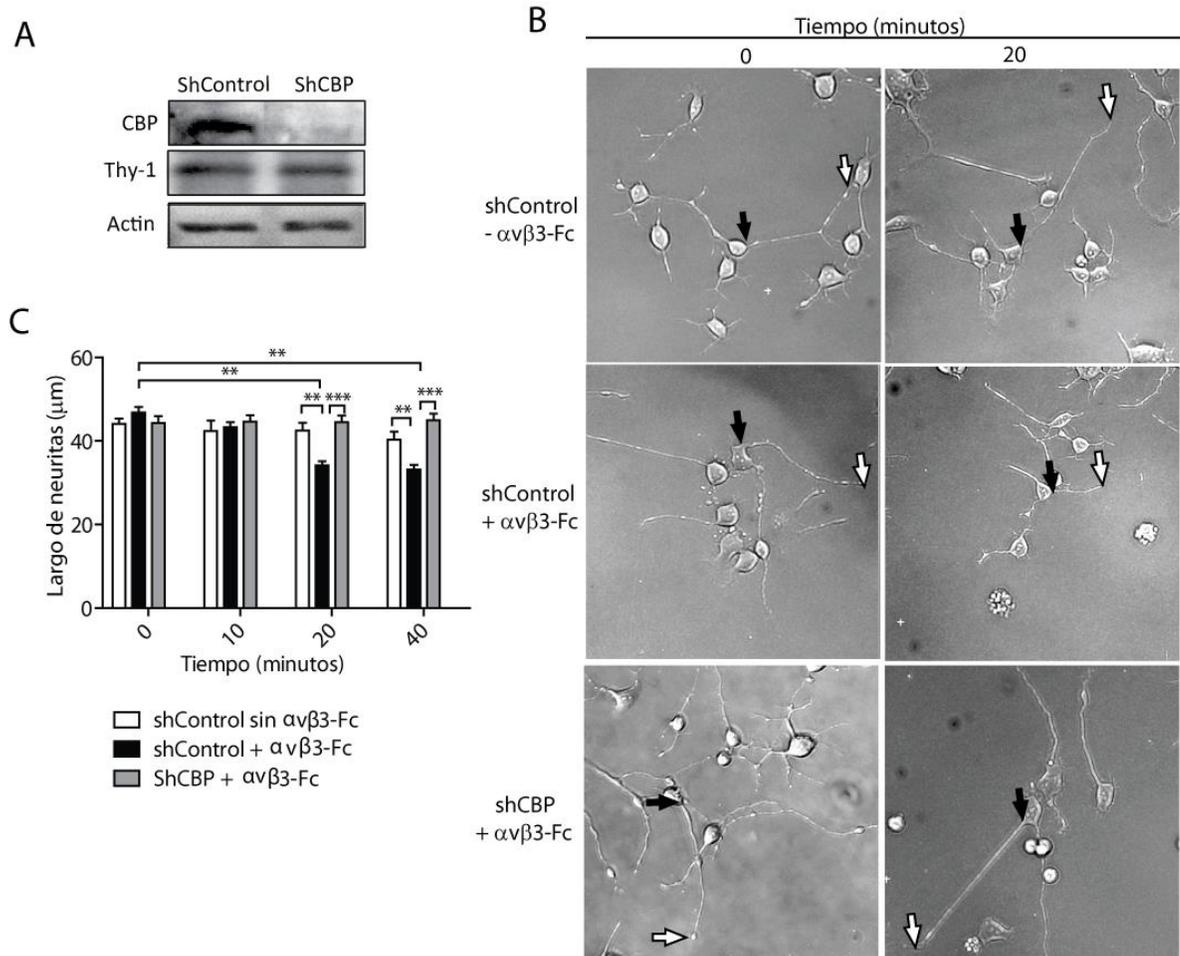


Figura 19: El silenciamiento de CBP bloquea la retracción de neuritas causada por Integrina $\alpha\beta3$.

Células CAD se transfectaron en forma estable con plasmidio que contenía una secuencia de shRNA para CBP o bien con un control vacío. Las células transfectadas se diferenciaron durante 24 horas, luego de lo cual se les adicionó o no integrina $\alpha\beta3$ por 40 minutos. A- WB para CBP, Thy-1 y Actina de lisados obtenidos de células CAD transfectadas con shRNA para CBP y células transfectadas con shControl. B- Microfotografías obtenidas por microscopía de contraste de fases. Se observan las 3 condiciones shControl sin integrina, shControl con integrina, shCBP con integrina; a los tiempos indicados de estimulación. Flechas indican el inicio (negro) y termino (blanco) de una neurita a modo de ejemplo por cada condición. C- Gráfico de la cuantificación del largo promedio de neuritas obtenido de la cuantificación de imágenes con el programa Neuron J. Se midieron 300 procesos por condición y tiempo (de al menos 100 células).

Datos expresados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de 2 vías. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.2.5- Evaluación del requerimiento de CBP en la vía de señalización río abajo de Thy-1 en células CAD estimuladas con Integrina $\alpha v \beta 3$.

Para estudiar el requerimiento de CBP en la señalización río abajo de Thy-1 utilizamos células CAD silenciadas para CBP y analizamos el estado de fosforilación de proteínas que aumentaron su fosforilación luego de la adición de Integrina (Objetivo específico 1). En primer lugar estudiamos si CBP se encontraba involucrada en la inhibición de Src por fosforilación (Y527). Como previamente describimos, la adición de Integrina aumentó la fosforilación inhibitoria de Src a los 20 minutos de estimulación (Fig. 20A y 20B). El uso de las células con CBP silenciado bloqueó el efecto de Integrina en esta fosforilación (Fig. 20A y 20B). Además analizamos el estado de fosforilación de los efectores de ROCK, que se encuentran al final de vía que previamente describimos: MLCII y Cofilina. El aumento causado por la incubación con Integrina observado en las células shControl (20 minutos) fue bloqueado en las células shCBP tanto para MLCII (Fig. 21 A y 21 B) como para Cofilina (Fig. 22 A y 22B). Estos resultados nos indican que CBP se encuentra involucrada en ambas, la inhibición de Src y en la fosforilación de efectores río abajo de ROCK.

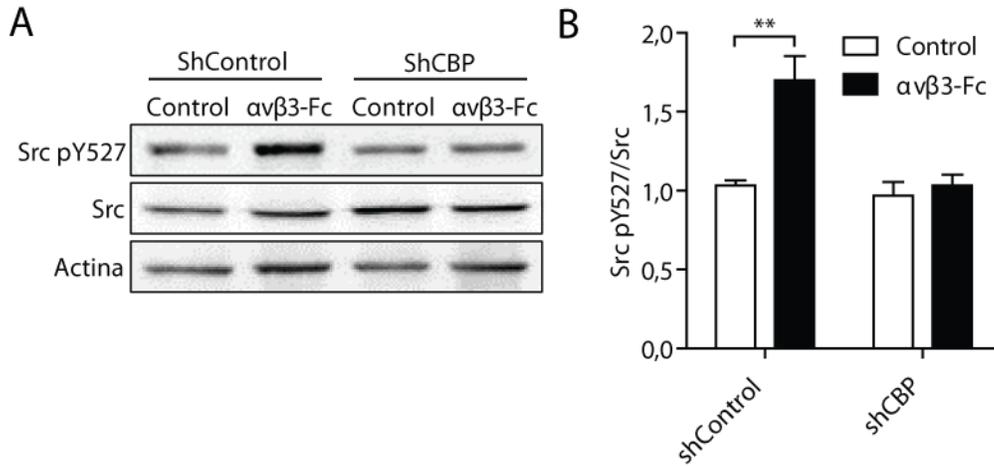


Figura 20: El silenciamiento de CBP previene el aumento en la fosforilación inhibitoria de Src causado por Integrina.

Células CAD se transfectaron en forma estable con plasmidio que contenía una secuencia de shRNA para CBP(shCBP) o bien con un control vacío (shControl). Las células transfectadas se diferenciaron durante 24 horas, luego de lo cual se les adicionó o no integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ por 20 minutos. A- WB representativo contra Src pY527, Src y Actina de células shCBP o shControl estimuladas o no con Integrina. B- Cuantificación de Src pY527/Src estandarizados por el tiempo inicial. Datos expresados como promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se utilizó Mann Whitney U comparando control con $\alpha\text{v}\beta\text{3-Fc}$ de cada condición. ** $p < 0,01$.

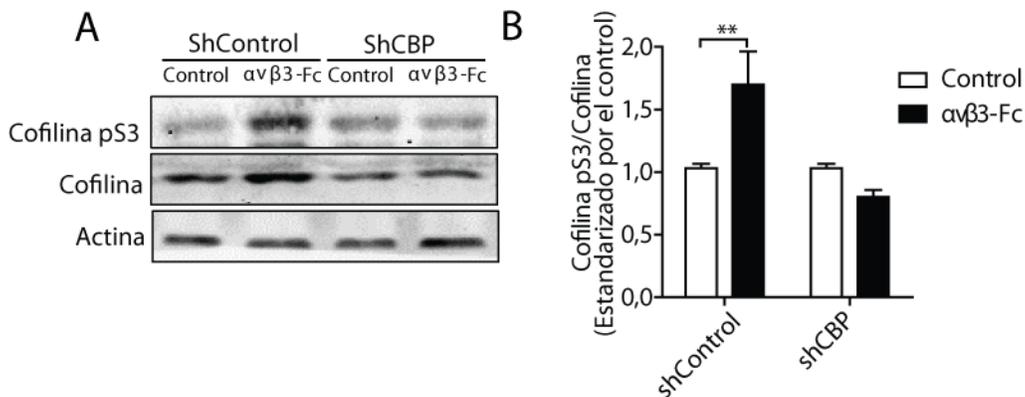


Figura 21: El silenciamiento de CBP previene el aumento en la fosforilación de Cofilina causado por Integrina.

Células CAD se transfectaron en forma estable con plasmidio que contenía una secuencia de shRNA para CBP(shCBP) o bien con un control vacío (shControl). Las células transfectadas se diferenciaron durante 24 horas, luego de lo cual se les adicionó o no integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ por 20 minutos. A- WB representativo contra Cofilina pS3, Cofilina y Actina de células shCBP o shControl estimuladas o no con Integrina. B-

Cuantificación de Cofilina pS3/Cofilina estandarizados por el tiempo inicial. Datos expresados como promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se utilizó Mann Whitney U comparando control con $\alpha\beta3$ -Fc de cada condición. $**p < 0,01$.

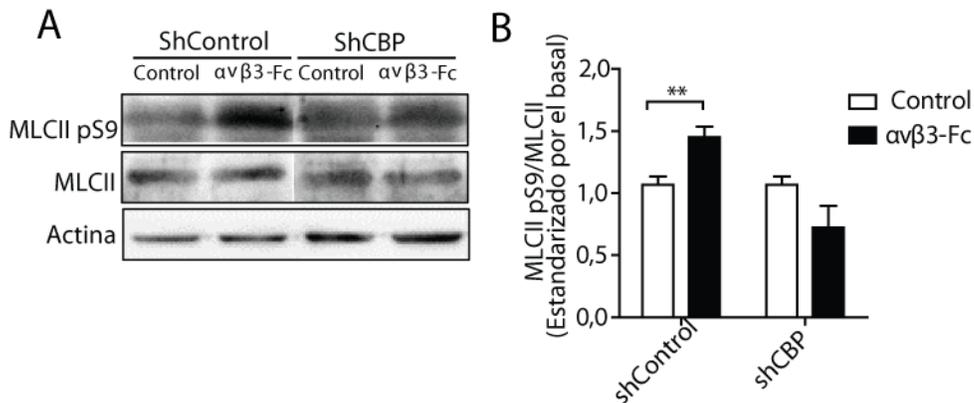


Figura 22: El silenciamiento de CBP previene el aumento en la fosforilación de MLCII causado por Integrina.

Células CAD se transfectaron en forma estable con plasmidio que contenía una secuencia de shRNA para CBP (shCBP) o bien con un control vacío (shControl). Las células transfectadas se diferenciaron durante 24 horas, luego de lo cual se les adicionó o no integrina $\alpha\beta3$ por 20 minutos. A- WB representativo contra MLCII pS9, MLCII y Actina de células shCBP o shControl estimuladas o no con Integrina. B- Cuantificación de MLCII pS9/MLCII estandarizados por el tiempo inicial. Datos expresados como promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se utilizó Mann Whitney U comparando control con $\alpha\beta3$ -Fc de cada condición. $**p < 0,01$.

5.3- Resultados objetivo específico número 3: “Evaluar la inhibición de Src y activación de las vías RhoA/ROCK/LIMK/Cofilina y RhoA/ROCK/MLCII, y requerimiento de proteína adaptadora en la retracción neurítica e inhibición del crecimiento mediada por integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1 en cultivos neuronales primarios”.

En el desarrollo de los objetivos específicos 1 y 2 pudimos describir la vía de señalización río abajo de Thy-1 que lleva a la retracción de neuritas, inducida por Integrina $\alpha\beta3$, en células CAD. Encontramos que Thy-1 requiere de la proteína adaptadora transmembrana CBP para inhibir a Src y además que la adición de Integrina causa un aumento en la activación de RhoA y ROCK. Para validar nuestros hallazgos en otro modelo celular y obtener datos que nos permitiesen proponer un mecanismo molecular, utilizamos neuronas corticales obtenidas de ratas embrionarias (E18), mantenidas 14 días en cultivo. En este objetivo específico, evaluamos tanto la formación del complejo de membrana Thy-1/CBP/Src como la fosforilación de Src y efectores río abajo de RhoA/ROCK.

5.3.1- Estudio de la retracción de procesos neuronales y formación de clusters de Thy-1 en neuronas corticales de rata.

Neuronas corticales de rata se estimularon o no con integrina $\alpha\beta3$ durante 24 horas, luego de lo cual las células se fijaron y se realizó inmunofluorescencia contra MAP2. El largo de los procesos neuronales se midió bajo el mismo criterio utilizado

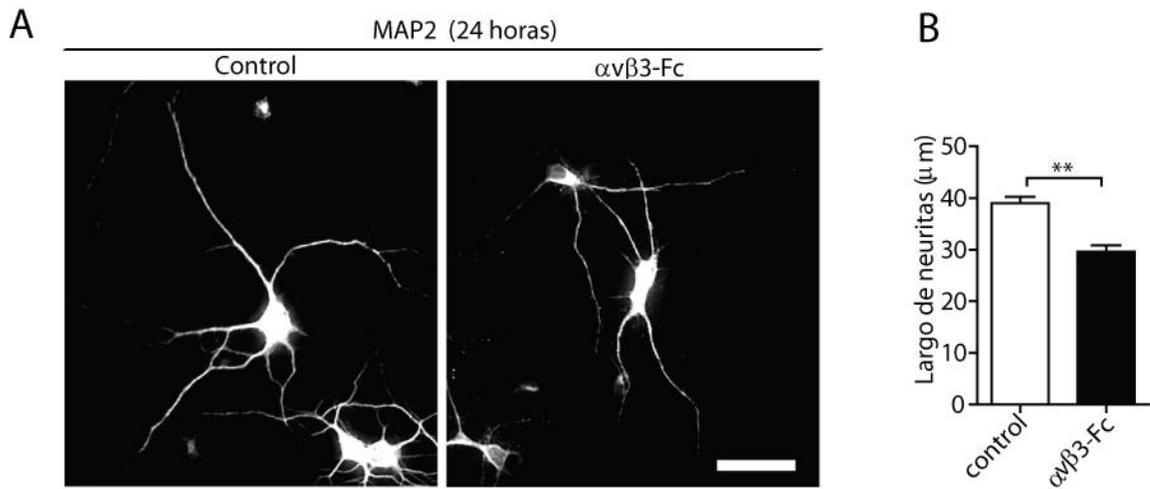


Figura 23: Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ causa inhibición de crecimiento de procesos neuronales.

Neuronas corticales de rata de 14 días en cultivo se estimularon o no con integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. A- Inmunofluorescencia indirecta para MAP2 luego de 24 horas de estimulación con integrina. B- Cuantificación de largo de neuritas a las 24 horas de estimulación con integrina. Datos mostrados en el gráfico son el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con T-student. $**p < 0,01$.

en células CAD. Como previamente describimos, las neuritas de las células estimuladas con integrina fueron significativamente menores comparadas con el control (Fig. 23 A y 23 B). Se ha descrito que las proteínas GPI pueden agruparse en la membrana plasmática, evento que puede ser relevante en la señalización celular (Stefanova, Horejsi et al. 1991; Kasahara and Sanai 2000). Además, particularmente para Thy-1 previamente describimos que la interacción entre Thy-1 e Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ causa redistribución y/o agrupamiento de Thy-1 y Src (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). Por estas razones ensayamos como la adición de Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ afectaba el agrupamiento y la distribución de Thy-1, utilizando microscopía de super resolución STED. Encontramos

que la adición de Integrina por 20 minutos aumentaba el área de las agrupaciones de Thy-1 en aproximadamente $0,05 \mu\text{m}^2$ (Fig. 24 A y 24 B). Además, la intensidad de fluorescencia de la señal de Thy-1 también se encontró aumentada a los 20 minutos de estimulación con Integrina (Fig. 24 A y 24 C). Estos resultados en su conjunto sugieren que la unión de Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ a Thy-1 promueve el agrupamiento de Thy-1 en la membrana plasmática.

5.3.2- Análisis del grado de fosforilación inhibitoria de Src y su distribución con Thy-1.

A continuación corroboramos si la adición de Integrina incrementaba la fosforilación inhibitoria de Src por Western blot. Coincidente con la temporalidad observada en la formación del agrupamiento de Thy-1 y lo observado en células CAD, la adición de Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ incrementó la fosforilación inhibitoria de Src luego de 15-20 minutos (Fig. 25 A y 25 B). Este incremento en el nivel de fosforilación de Src fue también observado en el análisis de intensidad de fluorescencia de procesos neuronales usando microscopía STED (Fig. 26 A y 26 B). Interesantemente, la co-localización entre Thy-1 y Src fosforilado en Y527 y área de los spots de Src-pY527 se encontraron incrementados también a los 20 minutos de estimulación con Integrina (Fig. 26 A, 26 C y 26 D). Además, analizamos la distribución de la fluorescencia de las marcas de Thy-1 y Src fosforilado en Y527 y área de los spots de Src-pY527 se encontraron incrementados también a los 20 minutos de estimulación con Integrina (Fig. 26 A, 26 C

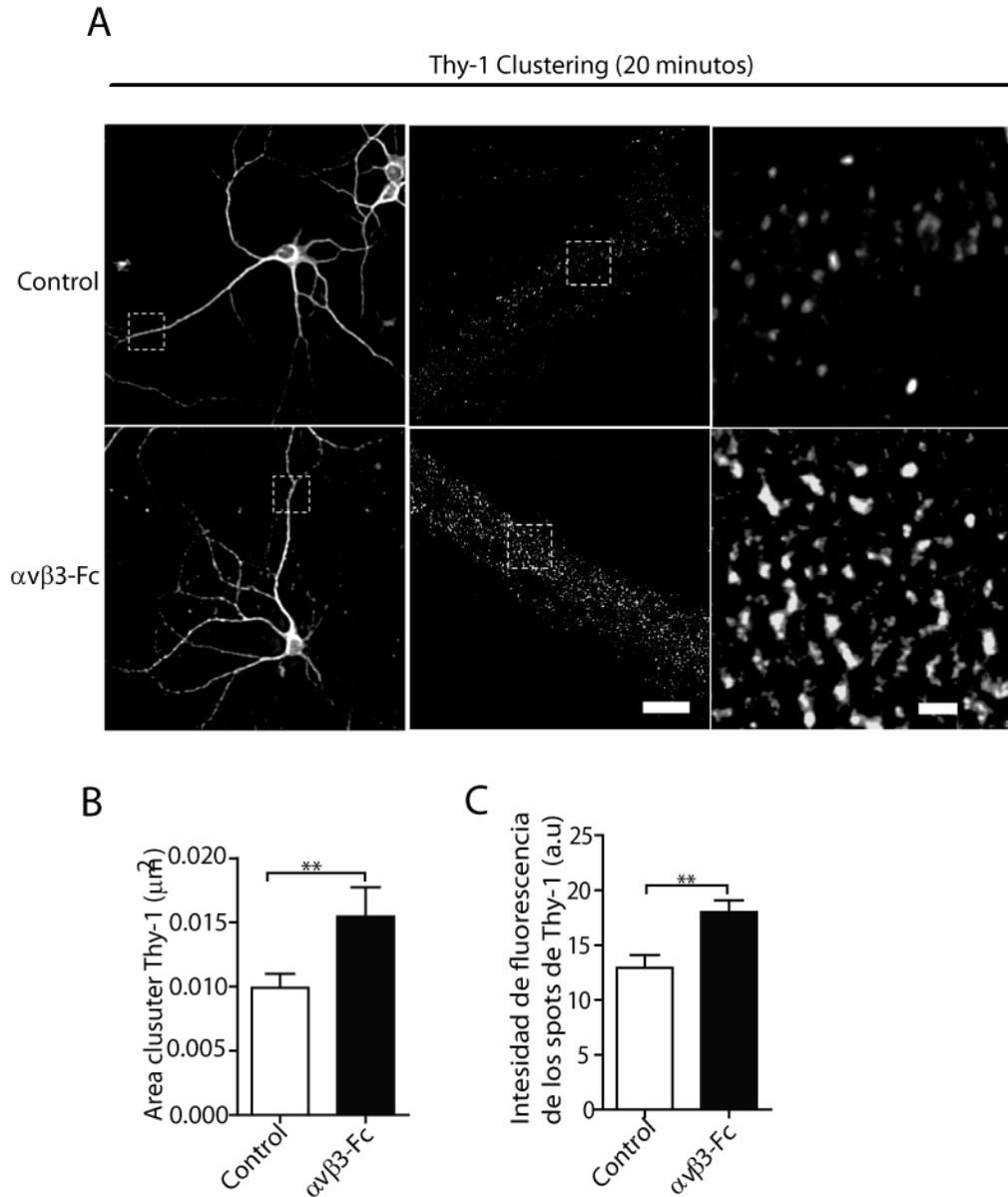


Figura 24: Integrina $\alpha v \beta 3$ promueve el agrupamiento de Thy-1 en neuronas corticales.

Neuronas corticales se estimularon o no con Integrina $\alpha v \beta 3$ por 20 minutos. Luego las células se fijaron y se tiñeron utilizando un anticuerpo contra Thy-1. A- Microfotografías obtenidas por microscopía de súper resolución STED. Panel izquierdo muestra imagen representativa de neuronas corticales con objetivo 100x. Panel central muestra un zoom óptico de 6x de las regiones demarcadas con líneas entrecortadas en el panel izquierdo. Barra blanca 4 μm . Panel derecho es un zoom digital de 6x de la región entre líneas del panel central. Barra blanca denota 0,5 μm . B- Cuantificación del área de la marca de Thy-1 calculada a partir de las fotografías obtenidas por STED. C- Cuantificación de intensidad de fluorescencia de los spots de Thy-1. Datos expresados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. En cada experimento se midió al menos 10 imágenes por condición.

y 26 D). Además, analizamos la distribución de la fluorescencia de las marcas de Thy-1 y Src-pY527 en una distancia de 0,400 μm , luego de la adición de Integrina. Estos análisis revelaron que el diámetro mayor de una agrupación de Thy-1 variaba entre 0,300-0,400 μm y que el diámetro de las marcas de Src-pY527 fueron aproximadamente 0,300 μm (Fig. 26 A y 26 E, Tabla 5). Interesantemente, la sobreposición de ambas marcas fue 0,2 μm hacia la periferia de la agrupación de Thy-1.

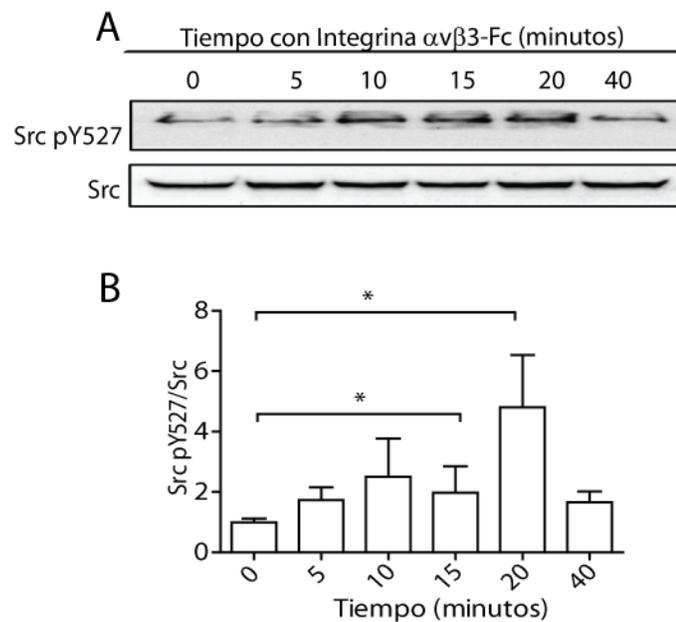


Figura 25: La adición de Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ aumenta la fosforilación inhibitoria de Src en neuronas corticales.

Neuronas corticales se estimularon con integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, a distintos tiempos, y se analizó los niveles de su fosforilación inhibitoria en la Y527. A- WB contra pSrc Y527 y Src total. B- Gráfico muestra la razón entre pSrcY527/Src estandarizado por el valor basal, obtenida del análisis densitométrico de los WB. Datos expresados como promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando Mann Whitney U. * $p < 0,05$.

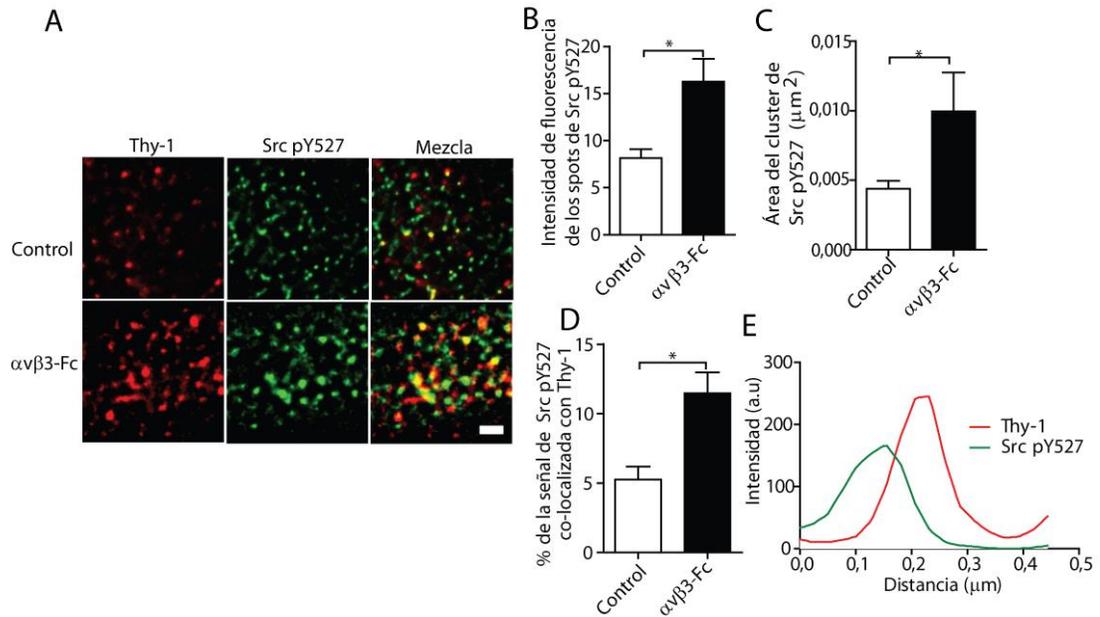


Figura 26: Integrina $\alpha v\beta 3$ aumenta la co-localización entre Thy-1 y Src inactivo en neuronas corticales.

Neuronas corticales se estimularon o no con Integrina $\alpha v\beta 3$ por 20 minutos. Luego las células se fijaron y se tiñeron utilizando un anticuerpo contra Thy-1(Rojo) y Src pY527 (verde). A- Microfotografías obtenidas por microscopía STED de neuritas de neuronas corticales. Co-localización se muestra en amarillo. Barra blanca corresponde a 0,5 μm . B- Cuantificación de intensidad de fluorescencia de los spots de Src pY527. C- Cuantificación del área de los spots de Src pY527. D- Porcentaje de Co-localización de Src pY527 con Thy-1. E- Gráfica representativa de Intensidad de marcas de Thy-1 y Src pY527 en función de la distancia en μm . Se cuantificó una distancia equivalente a 0,4 μm correspondientes al diámetro máximo de un cluster de Thy-1 luego de la adición de Integrina. Datos expresados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. En cada experimento se cuantificaron las imágenes de 10 neuritas por condición. El análisis estadístico utilizado fue Mann Whitney U. * $p < 0,05$.

5.3.3- Estudio de co-precipitación de Thy-1, CBP, Src y Csk en neuronas corticales.

En el objetivo específico 2 mostramos que Thy-1, CBP y Src co-precipitaban en células CAD, por esta razón estudiamos si este complejo también precipitaba en neuronas corticales. Encontramos que cuando inmunoprecipitamos Thy-1, también precipitaba CBP y Src (Fig. 27 A). Por otra parte, al precipitar CBP tanto Thy-1 como Src

co-precipitan (Fig. 27 B). En este último caso encontramos que Csk, la quinasa que puede inactivar Src por fosforilación, también co-precipita junto a CBP (Fig. 27 B). Sin embargo, al adicionar Integrina $\alpha\beta3$ durante 20 minutos, no se observó ningún cambio en la composición del complejo de membrana (Fig. 27 A y 27 B). Una posible explicación para estas observaciones es que los cambios en la composición del complejo ocurran a nivel local en los procesos neuronales.

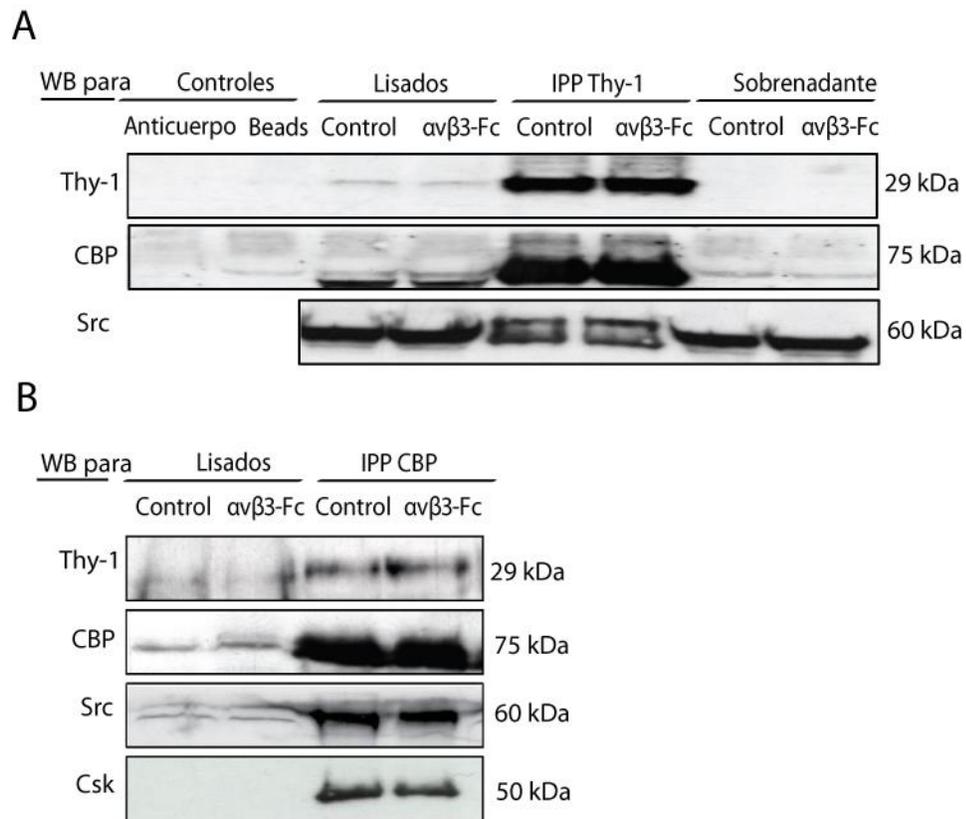


Figura 27: Thy-1, CBP, Src y Csk co-precipitan en neuronas corticales.

Neuronas corticales se estimularon o no con integrina $\alpha\beta3$ durante 20 minutos, luego de lo cual se lisaron. A partir de los lisados se realizó inmunoprecipitación para Thy-1 o CBP y se realizó análisis de los co-precipitados por Western blot. A-Western blot contra Thy-1, CBP y Src de las muestras de inmunoprecipitados de Thy-1; además, se analizó los lisados, el sobrenadante luego de la precipitación y los controles con un anticuerpo no relacionado o sólo con las esferas de proteína A-sefarosa (beads). B-WB contra Thy-1, CBP, Src y Csk de las muestras de inmunoprecipitados de CBP. Además se cargaron los lisados obtenidos antes y después de estimular con Integrina por 20 minutos.

5.3.4- Análisis de la co-localización de Thy-1, CBP, Src y Csk por microscopía STED.

Para probar la idea de que en neuronas corticales los cambios en la composición del complejo formado por Thy-1, CBP y Src, luego de la adición de Integrina $\alpha\beta 3$, ocurren localizados en los procesos neuronales, y para entender el mecanismo molecular por el cual la formación de este complejo lleva a la retracción de neuritas, realizamos estudios de co-localización y distribución entre estas moléculas por microscopía STED. La adición de Integrina aumentó la co-localización entre Thy-1 y CBP a los 20 minutos de estimulación (Fig. 28 A y 28 B), al igual que lo observado en células CAD. El análisis de la señal de CBP reveló que la adición de Integrina aumentó la intensidad de fluorescencia de los spots, pero no el área de estos (Fig. 28 C y 28 D). Interesantemente, CBP se localizó en el centro del cluster de Thy-1 luego de la adición de Integrina (Fig. 28A y 28E). Estos resultados indican que el agrupamiento de Thy-1 recluta a moléculas de CBP en el centro del cluster de Thy-1 luego de la adición de Integrina. Por otra parte, el análisis de co-localización entre CBP y Src mostró que luego de la adición de Integrina la co-localización entre ambas moléculas disminuyó (Fig. 29A y 29B) y Src se ubicaba hacia la periferia de la marca de Thy-1 (Fig. 29 C) a una distancia menor a 0,4 μm . Estos resultados sugieren que luego de la fosforilación de Src, Src inactivo se localiza hacia la periferia de la agrupación de Thy-1, pudiendo co-distribuir con moléculas de Thy-1 que no interaccionan con CBP. En acuerdo con estas observaciones, el análisis de micro-distancias entre los centros de masas de los spots Thy-1 y CBP co-

localizados mostró que la distancia entre ambos centros de masas es de 0,118 μm (Tabla 5). En cambio, la distancia entre los centros de masas de Thy-1 y Src pY527 es de 0,160 μm encontrándose la señal de CBP sobrepuesta más cercana al centro del cluster de Thy-1 que la señal de Src inactivo.

Considerando que observamos que Csk, quinasa que puede inactivar Src, se une a CBP co-precipita con CBP, analizamos si la Integrina afectaba la co-localización entre CBP y Csk. Encontramos que luego de la adición de Integrina, la co-localización entre CBP y Csk también aumentó (Fig. 30 A y 30 B). Además, el análisis de distribución de las señales de CBP y Csk fue similar (Fig. 30 C). Estos hallazgos podrían implicar el reclutamiento de Csk desde el citoplasma a la membrana plasmática por parte de CBP.

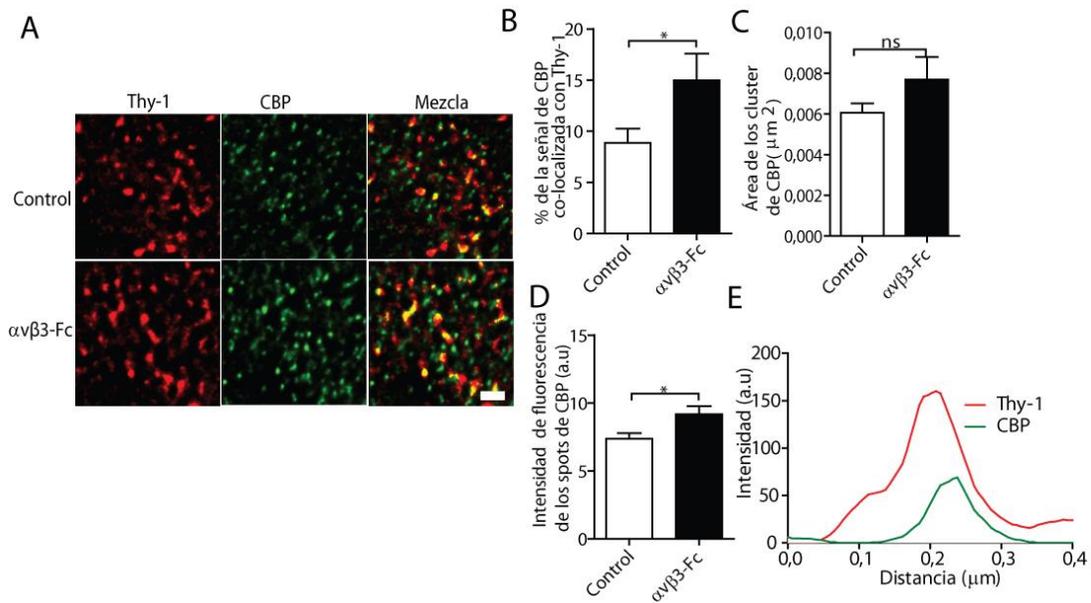


Figura 28: Integrina $\alpha\beta 3$ aumenta la co-localización entre Thy-1 y CBP en neuronas corticales.

Neuronas corticales se estimularon o no con Integrina $\alpha\beta 3$ por 20 minutos. Luego las células se fijaron y se tiñeron utilizando un anticuerpo contra Thy-1(Rojo) y CBP (verde). A- Microfotografías obtenidas por

microscopía STED de neuritas de neuronas corticales. Co-localización se muestra en amarillo. Barra blanca corresponde a 0,5 μm . B- Porcentaje de Co-localización de CBP con Thy-1. C- Cuantificación del área de los spots de CBP. D- Cuantificación de intensidad de fluorescencia de los spots de CBP. E- Gráfica representativa de intensidad de marcas de Thy-1 y CBP en función de la distancia en μm . Se cuantificó una distancia equivalente a 0,4 μm correspondientes al diámetro máximo de un cluster de Thy-1 luego de la adición de Integrina. Datos expresados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. En cada experimento se cuantificaron las imágenes de 10 neuritas por condición. El análisis estadístico utilizado fue Mann Whitney U. * $p < 0,05$.

Tabla 5: Distancia entre centros de masa de señales co-localizadas de Thy-1, CBP y Src pY527.

Tabla resumen del análisis de micro-distancias entre Thy-1, CBP y Src pY527. Las distancias se calcularon a partir de microfotografías obtenidas por microscopía STED de neuritas de neuronas corticales. Se muestra señales co-localizadas, largo de cada spot (diámetro mayor) y distancia entre centros de masas (CM). Datos expresados como promedio \pm SEM.

Señales co-localizadas (Luego de adición de Integrina)	Largo del spot 1 (μm)	Largo del spot 2 (μm)	Distancia de CM1 a CM2 (μm)
Thy-1/CBP	0,358 \pm 0,002	0,201 \pm 0,001	0,118 \pm 0,001
Thy-1/Src pY527	0,358 \pm 0,002	0,308 \pm 0,001	0,160 \pm 0,003

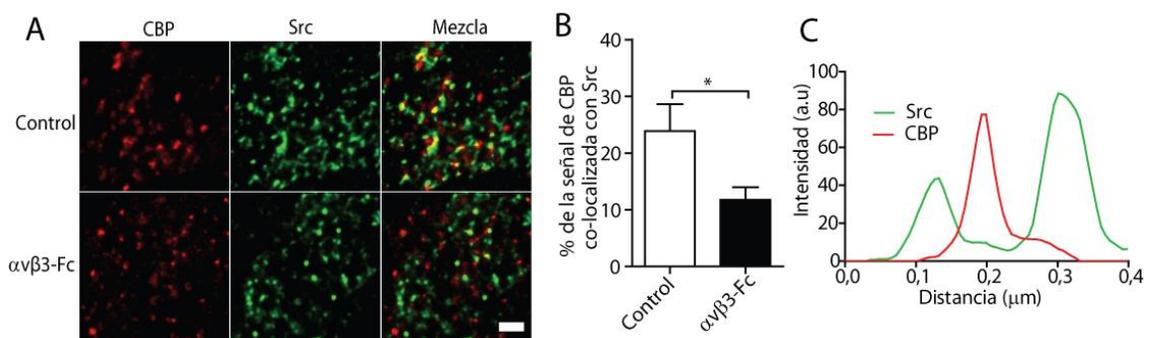


Figura 29: Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ disminuye la co-localización entre CBP y Src en neuronas corticales.

Neuronas corticales se estimularon o no con Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ por 20 minutos. Luego las células se fijaron y se tiñeron utilizando un anticuerpo contra CBP (Rojo) y Src total (verde). A- Microfotografías obtenidas por microscopía STED de neuritas de neuronas corticales. Co-localización se muestra en amarillo. Barra blanca corresponde a 0,5 μm . B- Porcentaje de co-localización de CBP con Src. C- Gráfica representativa

de intensidad de marcas de CBP y Src en función de la distancia en μm . Se cuantificó una distancia equivalente a $0,4 \mu\text{m}$ correspondientes al diámetro máximo de un cluster de Thy-1 luego de la adición de Integrina. Datos expresados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. En cada experimento se cuantificaron las imágenes de 10 neuritas por condición. El análisis estadístico utilizado fue Mann Whitney U. * $p < 0,05$.

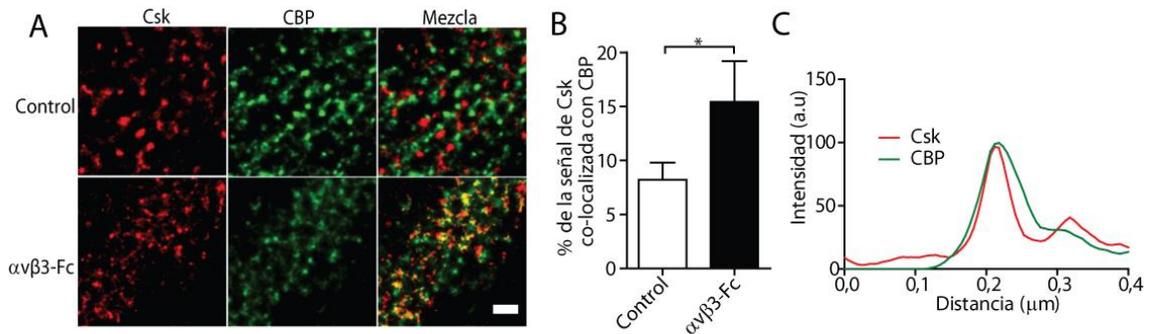


Figura 30: Integrina $\alpha v \beta 3$ aumenta la co-localización entre CBP y Csk en neuronas corticales.

Neuronas corticales se estimularon o no con Integrina $\alpha v \beta 3$ por 20 minutos. Luego las células se fijaron y se tiñeron utilizando un anticuerpo contra Csk (Rojo) y CBP (verde). A- Microfotografías obtenidas por microscopía STED de neuritas de neuronas corticales. Co-localización se muestra en amarillo. Barra blanca corresponde a $0,5 \mu\text{m}$. B- Porcentaje de co-localización de Csk con CBP. C- Gráfica representativa de Intensidad de marcas de Csk y CBP en función de la distancia en μm . Se cuantificó una distancia equivalente a $0,4 \mu\text{m}$ correspondientes al diámetro máximo de un cluster de Thy-1 luego de la adición de Integrina. Datos expresados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. En cada experimento se cuantificaron las imágenes de 10 neuritas por condición. El análisis estadístico utilizado fue Mann Whitney U. * $p < 0,05$.

5.3.5- Analisis del grado de fosforilación de p190RhoGAP.

En el objetivo específico 1 mostramos que Integrina $\alpha v \beta 3$ incrementa la activación de RhoA y que este evento es necesario para la retracción de neuritas. Considerando estos hallazgos nos preguntamos cómo la inhibición de Src podría llevar al aumento en la actividad de RhoA. Como mencionamos en la introducción RhoA puede ser regulado negativamente por proteínas GAP (Koh 2006). Interesantemente, p190RhoGAP es el

sustrato más importante de Src en el cerebro adulto y disminuciones en la fosforilación de p190RhoGAP han sido relacionadas con incrementos en la actividad de RhoA (Janiak, Zemskov et al. 2006). Por estas razones estudiamos si la adición de Integrina cambia el estado de fosforilación de p190RhoGAP. Para ello inmunoprecipitamos p190RhoGAP y luego visualizamos su grado de fosforilación en Y, utilizando un anticuerpo contra fosfo-Y. Encontramos que la incubación con Integrina durante 20 minutos disminuyó el grado de fosforilación en Y de p190RhoGAP (Fig. 31A y 31B). Este resultado sugiere que la inhibición de Src lleva a una disminución en la fosforilación de p190RhoGAP, evento que disminuye la actividad de ROCK, y aumenta la activación de RhoA.

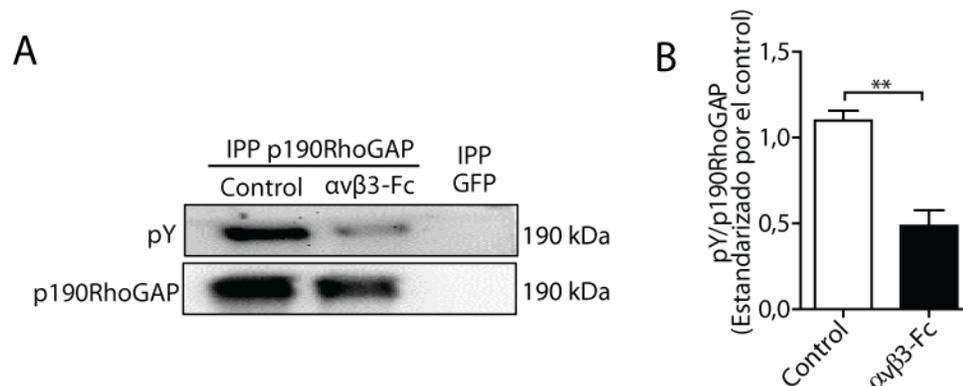


Figura 31: La adición de Integrina $\alpha\beta 3$ disminuye la fosforilación en tirosina de p190RhoGAP.

Neuronas corticales se estimularon o no con Integrina $\alpha\beta 3$ durante 20 minutos, luego de lo cual p190RhoGAP se precipitó a partir de los lisados de las neuronas. A- WB contra pY y p190RhoGAP de inmunoprecipitados de p190RhoGAP, como control negativo de precipitación se utilizó un anticuerpo comercial contra GFP. B- Cuantificación de pY/p190RhoGAP estandarizado por el control. Datos expresados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó Mann Whitney U. ****p<0,01.**

5.3.6- Análisis de la fosforilación de efectores río abajo de ROCK (MLCII, Cofilina y LimK)

Con la idea de corroborar si efectores río abajo de ROCK se encontraban fosforilados en neuronas corticales estimuladas con integrina, al igual que en células CAD, realizamos el análisis de fosforilación por WB de Cofilina pS3, MLCII pS9 y Limk pT508 a distintos tiempos de estimulación (Fig. 32 A, 32 C y 32 E). Observamos que todas estas fosforilaciones se encontraban significativamente aumentadas a los 15-20 minutos de estimulación (Fig. 32 B, 32 D y 32 F). Este resultado indica que Integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ aumenta la actividad de ROCK en neuronas corticales.

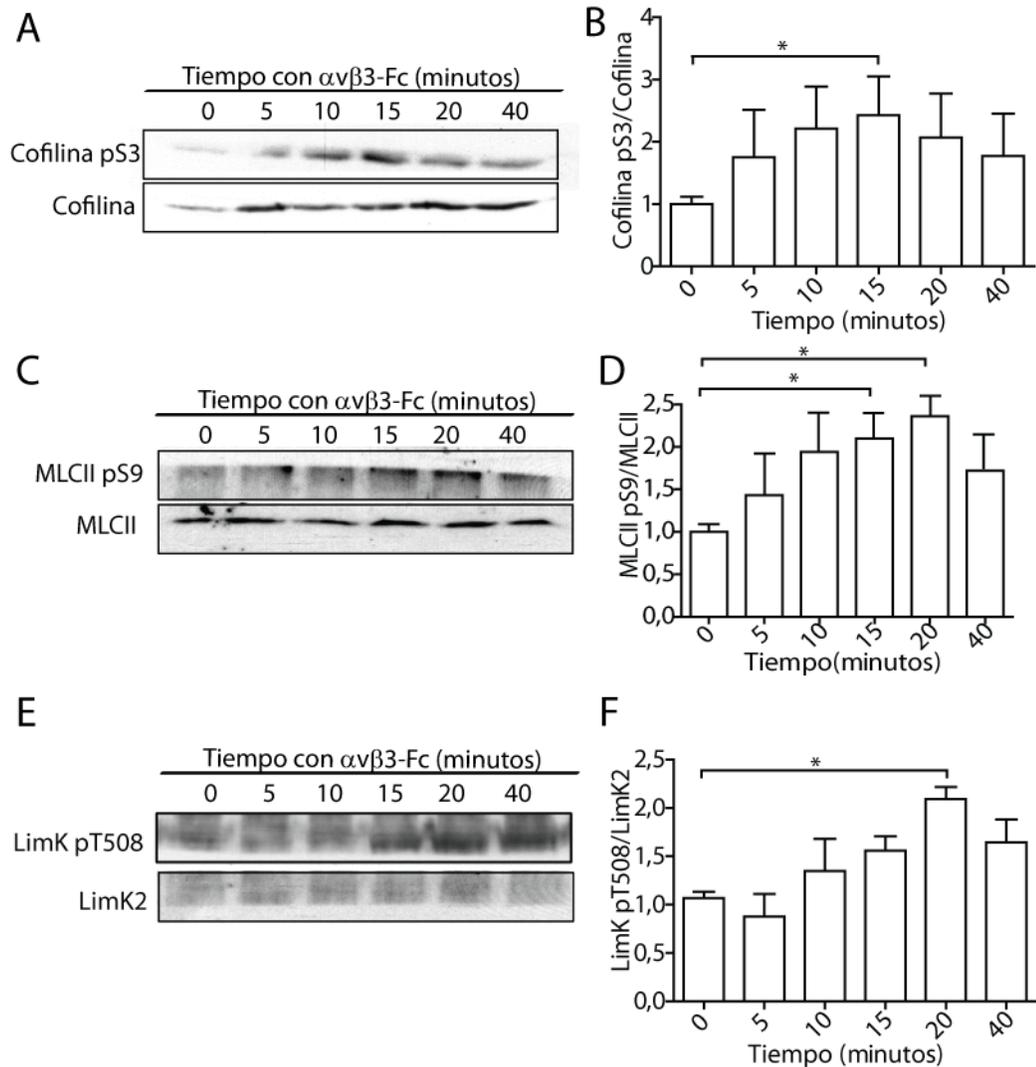


Figura 32: La adición de Integrina $\alpha v\beta 3$ incrementa las fosforilaciones de Cofilina, MLCII y LimK en neuronas corticales.

Neuronas corticales se estimularon con integrina $\alpha v\beta 3$ a distintos tiempos, luego se midieron los niveles de fosforilación de efectores río abajo de ROCK. A- WB para la fosforilación en S3 de Cofilina y Cofilina total. B- Gráfico de la razón entre pCofilina S3/Cofilina estandarizado por el basal, obtenida del análisis densitométrico de los WB. C-Western Blot para la fosforilación en S9 de MLCII y MLCII total. D- Gráfico de la razón entre pMLCII S9/MLCII estandarizado por el basal, obtenida de la medición densitométrica de los Western blots. E- WB para la fosforilación de en T508 de Limk y Limk total. F- Gráfico de la razón entre MLCII pS9/MLCII estandarizado por el basal, obtenida de la medición densitométrica de los Western blots. Datos expresados como promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se consideró significativo un valor $*p < 0,05$ con el análisis no-paramétrico Mann Withney U.

6-Discusión.

Previamente describimos que la interacción entre Thy-1 neuronal y la Integrina $\alpha\beta3$, presente en astrocitos, causa inhibición del crecimiento de neuritas y la retracción de los procesos neuronales existentes (Herrera-Molina, Frischknecht et al. 2012). En este trabajo, nos centramos en dilucidar, parte de las vías de señalización río abajo de Thy-1, responsables de la retracción mediada por Integrina, en las neuronas. Particularmente, nos interesamos en dos aspectos: cómo Thy-1, una molécula anclada a la cara externa de la membrana plasmática, es capaz de transducir la señal de Integrina al espacio intracelular. Encontramos que Thy-1 estaría formando un complejo funcional en la membrana plasmática con CBP y Src, el cual mediaría la inactivación de Src causando retracción de procesos neuronales. Además, nos interesó estudiar cómo la adición de Integrina $\alpha\beta3$ afecta a algunos reguladores del citoesqueleto de actina. Nuestros estudios demuestran que Integrina $\alpha\beta3$ aumenta la activación de los ejes RhoA/ROCK/Cofilina y RhoA/ROCK/MLCII en neuronas. En su conjunto estos hallazgos nos permitieron el proponer un mecanismo molecular por el cual Integrina $\alpha\beta3$ promueve retracción de neuritas a través de su interacción con Thy-1.

6.1- Relación entre Thy-1 y Src en la retracción de neuritas.

En este trabajo demostramos que tanto en células CAD como en neuronas corticales de rata, la adición de Integrina $\alpha\beta3$ causa un aumento en la fosforilación inhibitoria de Src; evento que es temporalmente coincidente con el aumento observado en la agrupación de Thy-1 en los procesos neuronales. Además, mostramos que el uso de una

construcción de Src constitutivamente activa previene la retracción de procesos en nuestro modelo, indicando que Src se encontraría implicada en la retracción de procesos neuronales mediada por Integrina. Concluimos que la inactivación de Src no solo es consecuencia de la adición de Integrina, sino más bien esta inhibición es necesaria para la retracción de procesos neuronales mediada por Integrina y Thy-1. En la literatura, se ha reportado que la presencia de Thy-1, ya sea endógena o transfectada en fibroblastos, ha sido asociada a la regulación de la actividad de quinasas de la familia de Src (Barker, Grenett et al. 2004; Rege, Pallero et al. 2006). Sin embargo, esta es la primera vez que este fenómeno es asociado a la activación de Thy-1 como receptor en neuronas y la regulación del largo de procesos neuronales, evento desencadenado por un ligando presente en astrocitos. Interesantemente, Src se asocia a la hoja interna de la bicapa lipídica y Thy-1 no posee un dominio transmembrana que permita la transducción de señal en forma directa al espacio intracelular, pues se encuentra unida a la cara externa de la membrana plasmática a través de su tallo GPI (Herrera-Molina, Valdivia et al. 2013). Por otra parte, Src es una proteína que posee una miristoilación que le permite asociarse a la membrana plasmática (Bradshaw 2010; Patwardhan and Resh 2010). Este hecho causa que Src preferentemente se distribuya en regiones que no son tipo balsas lipídicas cuando no se encuentra unida a alguna proteína andamio, a diferencia de Thy-1 que es un reconocido marcador de dominios ricos en colesterol en las neuronas (Tsui-Pierchala, Encinas et al. 2002; Wilson, Steinberg et al. 2004; Wong, Lieser et al. 2005; Saitou, Kajiwara et al. 2014). No obstante, tanto en nuestro modelo celular como en variados reportes en la literatura Thy-1 y Src co-precipitan y co-localizan en varios tipos

celulares, incluyendo fibroblastos y neuronas (Draberova and Draber 1993; Durrheim, Garnett et al. 2001; Rege, Pallero et al. 2006).

La adición de Integrina indujo tanto una redistribución de Src como de Thy-1, aumentando la co-localización entre la forma inactiva de Src y Thy-1 en los procesos neuronales. Estos hallazgos sugieren que la interacción y/o co-distribución entre ambas moléculas aumenta por la adición de Integrina. Por tanto, la distribución de Src en los dominios ricos en colesterol tipo balsas lipídicas también debería verse aumentada. Esta afirmación implica que para el reclutamiento de Src y su posterior inactivación, Thy-1 debiese interactuar con alguna proteína que posea un dominio intracelular que permita el reclutamiento de Src a través de su dominio SH2 a regiones ricas en colesterol, y además que esta molécula adaptadora debiera unir algún inactivador y/o poseer la capacidad de modificar el estado de fosforilación de Src. Con estas ideas en mente estudiamos si Thy-1 requeriría de una molécula adaptadora transmembrana para regular la actividad y localización sub-celular de Src. Inicialmente planteamos 2 posibles proteínas adaptadoras para Thy-1; las proteínas p75 y CBP. Mediante inmunoprecipitación encontramos que solo CBP co-precipita con Thy-1 pero no p75 en células CAD. Por lo cual, descartamos a p75 como una proteína candidata para transducir la señal de Integrina y nos centramos en el estudio de CBP.

6.2- CBP y su requerimiento como proteína adaptadora de Thy-1.

CBP es una proteína andamio para la familia de Src y ha sido vinculada a regulación de esta familia de quinasas durante la maduración del sistema nervioso central (Chen,

Veracini et al. 2009; Lindquist, Karitkina et al. 2011). Además, el uso de dominantes negativos de CBP drásticamente disminuye la agrupación de Thy-1 en la membrana, sugiriendo a CBP como un mediador de la señalización inducida por Thy-1 (Chen, Veracini et al. 2009). CBP posee tirosinas fosforilables que pueden unir dominios tipo SH2. Además, CBP se ancla a regiones ricas en colesterol a través de palmitoilaciones, localizándose en condiciones fisiológicas exclusivamente en balsas lipídicas (Saitou, Kajiwara et al. 2014). Estas características nos llevaron a proponer a CBP como transductor de Thy-1.

Para estudiar si CBP es requerida en la retracción de neuritas inducida por Integrina, utilizamos shRNA contra el mensajero de CBP con el que transfectamos células CAD en forma estable. Hallamos que el silenciamiento de CBP previene la retracción de neuritas causada por integrina $\alpha\beta3$. En acuerdo con esto, la señalización que describimos río abajo de Thy-1 mediada por Src, ROCK, MLCII y Cofilina, también se vio afectada. En su conjunto estos datos nos permiten concluir que CBP se encuentra involucrada en la retracción neuritas causada por la adición de integrina $\alpha\beta3$ y que CBP media la señalización inducida por las interacciones Integrina/Thy-1 en neuronas. La relación entre Thy-1 y CBP ha sido previamente descrita en fibroblastos (Chen, Veracini et al. 2009). Sin embargo, estos estudios sólo mostraron que la transfección de fibroblastos pulmonares con Thy-1 (presencia o ausencia de Thy-1) disminuía la actividad de Src y podía regular la actividad de RhoA. Esta tesis es el primer reporte en neuronas respecto a esta interacción y su señalización, y la primera vez que eventos de señalización celular se asocian a la unión de un ligando a Thy-1.

6.3- Estudio de la formación del complejo de membrana compuesto por Thy-1, CBP y Src.

Como primera aproximación, analizamos qué ocurría con la co-precipitación de Thy-1 y CBP cuando estimulábamos con Integrina, y en células CAD encontramos que la co-localización aumentaba significativamente a los 20 minutos de estímulo. Sin embargo, al realizar el mismo ensayo en neuronas corticales no observamos ningún cambio en la co-precipitación por adición del estímulo. Esto podría indicar la presencia de un complejo pre-formado o bien de un cambio local en los terminales de los procesos neuronales en las neuronas corticales. Esta inconsistencia en ambos modelos podríamos explicarla, considerando que las células CAD son una línea celular “tipo neuronal” (Qi, Wang et al. 1997), en donde la menor especialización de los procesos, comparado con las neuronas, nos permiten ver un efecto global en toda la célula y poco localizado. En cambio en las neuronas corticales la mayor definición de estructuras y compartimentalización causa que el efecto de integrina sea local en los procesos neuronales lo que impide, utilizando el lisado total neuronal, visualizar diferencias entre el grupo estimulado y el no estimulado. Para comprobar esta teoría realizamos ensayos de co-localización en los procesos neuronales de células CAD y de neuronas primarias. Encontramos que la co-localización de Thy-1 y CBP aumenta significativamente al estimular con Integrina, resultado consistente con la inmunoprecipitación en ambos modelos celulares. Además, es interesante notar que el porcentaje de co-localización que encontramos en células CAD es mayor y más evidente que en neuronas, lo que apoya la

idea de una célula menos especializada, pero un buen modelo para estudio que permite evidenciar con mayor facilidad cambios proteicos en ensayos bioquímicos.

El estudio de las imágenes obtenidas por microscopía STED nos permitió realizar análisis topográficos de la composición y tamaño de los clusters de Thy-1. Encontramos que el tamaño aproximado luego de la adición de Integrina de la agrupación de Thy-1 varía entre 200-400 nm de diámetro. En la literatura encontramos que el tamaño de estas agrupaciones puede variar entre 20 nm-600 nm en condiciones fisiológicas, dependiendo del método por el cual estos datos fueron obtenidos (Brugger, Graham et al. 2004). La señal de los spots de Thy-1 mostró un aumento en área e intensidad luego de la adición de Integrina. Estos hechos sugieren que Integrina $\alpha\beta 3$ promueve el agrupamiento de Thy-1 y un aumento en el número de moléculas que forman estos clusters. Además, se observó un aparente aumento en el número de spots de Thy-1, lo que podría encontrarse asociado a un aumento aparente en masa. Esto podría ser explicado debido a que Thy-1 puede formar agregados de membrana entre 5-20 moléculas (observado por microscopía electrónica, no detectables por microscopía STED) y con un diámetro de aproximadamente 20 nm (Brugger, Graham et al. 2004), los que luego de la adición de Integrina podrían formar agregados de mayor tamaño que sin son detectables por microscopía STED. Además, resultados no publicados en el marco de la tesis del Dr. Rodrigo Herrera, muestran mediante el uso de quantum dots, que la movilidad lateral de Thy-1 se ve reducida al agregar Integrina, y además que el movimiento de estas moléculas se encuentra confinado en áreas específicas de mayor tamaño (Herrera-Molina 2009). En su conjunto estos datos nos permiten concluir que la Integrina

promueve el agrupamiento de Thy-1. Interesantemente, al analizar el solapamiento entre las señales de CBP y Thy-1 luego de la adición de integrina, encontramos que CBP se distribuye preferentemente hacia el centro del cluster de Thy-1, sugiriendo que Thy-1 recluta a CBP fusionando micro-clusters pre-existentes en la membrana plasmática. Apoyando esta idea, los spots de CBP no mostraron tener un tamaño superior a los 200 nm (menor al tamaño de cluster de Thy-1), de lo cual podemos deducir que existe una población de moléculas de Thy-1 que puede co-distribuir con CBP y otra población de moléculas de Thy-1 (hacia la periferia del cluster) que pueden encontrarse sin co-distribuir en el mismo cluster. Estos datos nos dan una idea clara del mecanismo molecular por el cual CBP es reclutada.

De igual forma analizamos qué ocurría con la co-localización de Src y CBP en células CAD y en neuronas corticales. Observamos que la co-localización de CBP con Src se encuentra significativamente disminuida a los 20 minutos de estimulación con integrina (proceso que es coincidente con la formación del cluster de Thy-1), consistentemente en ambos modelos. Esta observación puede ser explicada si consideramos nuestros resultados respecto a Src, que muestran que su fosforilación inhibitoria se encuentra aumentada al estimular con Integrina. Src es una quinasa que se une a CBP a través de su dominio SH2, dominio que se encuentra disponible solamente cuando Src está activada y no fosforilada en Y527 (Fig. 33) (Okada 2012). Apoyando esta propuesta, cuando analizamos qué ocurría con Csk (quinasa de la familia de Src que fosforila a Src en Y527 y que puede unirse a CBP), observamos que Csk co-precipita con CBP y que en los ensayos de co-localización la adición de Integrina aumentaba significativamente la

co-localización de CBP con Csk; lo que podría estar dando cuenta de que el reclutamiento de Csk lleva a la inactivación de Src y al alejamiento de Src inactivo de CBP (Fig. 33). Esta propuesta abre la interrogante de cómo CBP reclutaría a Csk. Para que CBP reclute a Csk, CBP debe ser fosforilada por una quinasa de la familia de Src en Y314 (Ingleby 2008). En nuestro modelo esto podría estar ocurriendo por el reclutamiento de CBP al cluster de Thy-1 con Src activo (causado por la señal de Integrina) que llevaría a que Src fosforile a otras moléculas de CBP a las que no se encuentra unido (trans-fosforilación) o bien que Src fosforile a la misma molécula de CBP a la que está unida (cis-fosforilación). Alternativamente, CBP podría ser fosforilada por otra quinasa de la familia de Src como Fyn o Lyn. Estas fosforilaciones podrían verse favorecidas debido al efecto del aumento de concentración de estas quinasas en un espacio compacto, favoreciendo su preferencia por sustratos presentes en esta balsa lipídica (Tsui-Pierchala, Encinas et al. 2002; Zhou 2009).

Además, decidimos ensayar qué ocurría con la co-localización de la forma inactiva de Src (pSrcY527) y Thy-1. Observamos que hay un aumento significativo de la co-localización de Thy-1/pY527Src por la estimulación con Integrina. Este resultado abre 2 posibilidades. La primera es que Src inactivo salga del cluster de Thy-1 con CBP y se acerque a otras moléculas de Thy-1 en donde CBP no se encuentra en sus cercanías. Respecto a esto varios autores incluso señalan que la inactivación de Src vía CBP podría excluir a Src del microdominio de membrana en que se encontraba presente (Okada 2012). Por otra parte, artículos recientes han propuesto mediante análisis de la distribución espacial de c-Src y modelamiento matemático, que la localización en las

balsas lipídicas de CBP es crucial para la supresión de la función de c-Src (Saitou, Kajiwara et al. 2014). Estos estudios predicen que el reclutamiento de CBP a la balsa lipídica causa la inactivación de SFKs y su secuestro en dicho microdominio de membrana; desfavoreciendo su interacción con sustratos excluidos de estos microdominios, contradiciendo la idea de exclusión del microdominio de las SFKs una vez inactivas. Contrastando este último modelo con nuestros datos experimentales, y si consideramos que Thy-1 es la proteína de membrana más abundante en neuronas, la estimulación con Integrina podría estar causando clustering de Thy-1 que lleva al reclutamiento de CBP al microdominio de membrana en el centro del cluster. Luego, Src inactivo podría alejarse de CBP hacia el centro del cluster de Thy-1 manteniendolo secuestrado (Fig. 34 A y 34 B). Soportando esta idea, el análisis del solapamiento de las señales de Src inactivo y Thy-1 luego de la adición de Integrina mostró que las señal de Src se ubicaba hacia la periferia del cluster, en cambio la señal de CBP mostro co-distribuir en el centro con Thy-1.

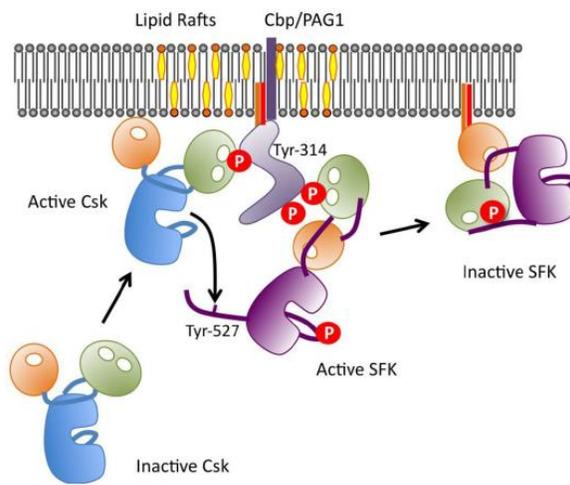


Figura 33: Regulación de Csk via CBP en lipid rafts.

Modelo esquemático de los roles de CBP/Csk en la regulación de las quinasas de la familia de Src (SFKs). Cuando CBP es fosforilada por SFKs activas, CSK es reclutada al lipid rafts y fosforila la Y reguladora negativa de SFKs en Y527 inactivándola. Luego la quinasa inactivada se relocaliza y separa de CBP (Okada 2012).

6.4- Relación entre la activación de RhoA, ROCK y la inactivación de Src.

Varios autores han indicado que Src puede regular la activación de RhoA fosforilando a p190RhoGAP, proteína que promueve la forma inactiva de RhoA (GDP) (Barker, Grenett et al. 2004). RhoA es uno de los principales reguladores del citoesqueleto de actina en la célula, e incrementos en su activación han sido relacionados con contracción de los procesos neuronales (Seböck, Nusser et al. 1999; Koh 2006; Jeon, Kim et al. 2010) y cambios morfológicos en fibroblastos pulmonares (Rege, Pallero et al. 2006). A partir de los ensayos de precipitación por afinidad con GST-RBD, inmunofluorescencia indirecta y el uso de un dominante negativo de RhoA; pudimos establecer que RhoA se activa y es necesario para la retracción de neuritas causada por la adición de integrina $\alpha\beta3$ en células CAD. Además, los resultados obtenidos con RhoA en células CAD encontramos que la adición de integrina activa la vía de ROCK (uno de los principales efectores de RhoA) y que ROCK es necesario para la retracción de neuritas, causando un aumento significativo en las fosforilaciones de MLCII y Cofilina; tanto en células CAD como en cultivos de neuronas corticales de rata.

Interesantemente, la sobre expresión de Thy-1 ha sido relacionada con cambios en la actividad de RhoA. En fibroblastos pulmonares la sobreexpresión de Thy-1 incrementa la activación de RhoA (Rege, Pallero et al. 2006). De igual modo, la sobre-expresión de

Thy-1 en células CAD, induce una contracción de los procesos celulares sugiriendo también la activación de RhoA (datos no publicados). Por el contrario, la sobreexpresión de Thy-1 en células HUVEC causa inactivación de RhoA y disminución de la migración celular (Wen, Kao et al. 2013), sugiriendo que Thy-1 podría ser una molécula clave en la regulación de RhoA y el citoesqueleto de actina en distintos sistemas celulares, incluyendo el nuestro. En su conjunto podemos concluir que, para nuestro modelo de estudio, la adición de integrina $\alpha\beta3$ causa un incremento en la activación de las vías RhoA/ROCK/LIMK/Cofilina y RhoA/ROCK/MLCII, y que su activación está implicada en la retracción de procesos neuronales causada por integrina $\alpha\beta3$. Proponemos que la inactivación de Src podría llevar a un aumento en la activación de RhoA y sus efectores a través de ROCK, vía inhibición de p190RhoGAP (Fig. 34 C).

6.5-Mecanismo molecular propuesto.

Considerando todos los datos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis proponemos el siguiente modelo de mecanismo molecular. Inicialmente, Thy-1 se encuentra formando micro-agrupaciones en la membrana plasmática, de igual manera CBP se encuentra presente en las balsas lipídicas y esta proteína tiene la capacidad de reclutar a Src activo (no fosforilado en Y527) (Fig. 34 A). Src activo tiene la capacidad de fosforilar a p190RhoGAP, por lo que tanto la actividad de RhoA como de ROCK se encuentra disminuida. Una vez adicionada Integrina $\alpha\beta3$, el primer evento molecular es el agrupamiento de Thy-1, reflejado en el aumento de área de spots de Thy-1 observado por microscopía (Fig. 34 B). De igual manera esta fusión de micro-agrupaciones de

Thy-1 permite el reclutamiento de CBP que puede tener a Src unido. Luego de este confinamiento, el aumento en área permite que CBP sea fosforilada por alguna quinasa de la familia de Src en Y314, lo que lleva al reclutamiento desde el citoplasma de Csk (Fig 34 C). A continuación, Csk puede inactivar a Src fosforilándola en Y527. Este evento causa que Src, que ahora no posee disponible su dominio SH2, se disocie de CBP y se mueva hacia la periferia del mismo cluster en el cual se encontraba presente, pudiendo ahora Src inactivo co-distribuir con moléculas de Thy-1 que no están interaccionando con CBP (Fig. 34 D). Finalmente, Src inactivo no puede fosforilar a p190RhoGAP, por lo que la activación de RhoA y ROCK se incrementan con la consecuente fosforilación de Cofilina y MLCII. Estos eventos en su conjunto llevan a la retracción de los procesos neuronales existentes en un marco temporal de entre 15-20 minutos.

6.6- Relevancia y proyecciones del trabajo.

En conclusión durante el desarrollo de esta tesis describimos que la interacción entre Thy-1 neuronal y la integrina $\alpha\beta3$ causa retracción de procesos neuronales vía la inactivación de Src por el reclutamiento de CBP, y esta inactivación llevaría a un incremento en la activación del eje RhoA/ROCK; eventos que serían necesarios para

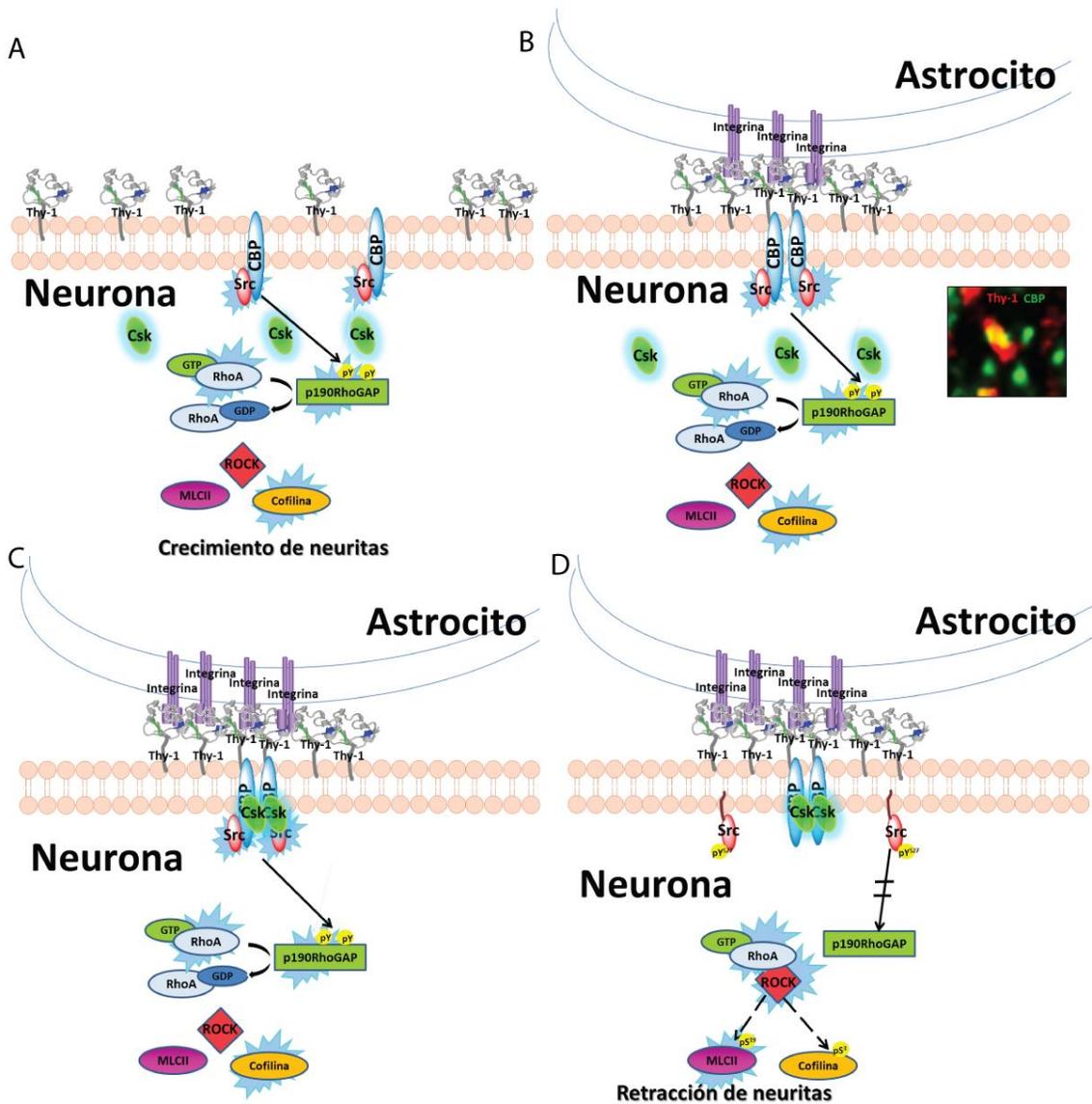


Figura 34: Mecanismo molecular propuesto.

A-Inicialmente Thy-1 forma pequeños agregados y CBP puede unir a Src activo. Src puede fosforilar a p190RhoGAP, en consecuencia RhoA se encuentra menos activo al igual que ROCK causando crecimiento de neuritas. B-Al adicionar Integrina $\alpha\beta 3$, Thy-1 se agrupa reclutando a CBP en el centro del cluster. C-La presencia de CBP en el cluster permite el reclutamiento de Csk a la membrana. D- Csk fosforila a Src causando su inactivación. Src pierde la disponibilidad del sitio de unión a CBP y co-distribuye con moléculas de Thy-1 que no interaccionan con CBP. Ahora Src inactivo no puede fosforilar a p190RhoGAP; la activación de RhoA y ROCK aumenta, causando la fosforilación de MLCII y Cofilina. A estos eventos gatillan la retracción de neuritas.

dicha retracción. Sin embargo, la pregunta que inmediatamente surge es qué repercusiones en neurociencia y biología celular puede tener la regulación de los actores moleculares descritos en el desarrollo de esta tesis.

Como anteriormente mencionamos, Thy-1 es una proteína anclada a la cara externa de la membrana plasmática, a dominios ricos en colesterol, a través de su tallo GPI (Rege and Hagood 2006). Son varias las proteínas GPI descritas que poseen importancia en la señalización celular en neuronas y otros tipos celulares; como por ejemplo la proteína Prion (Stefanova, Horejsi et al. 1991; Simons and Toomre 2000). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales este tipo de proteínas desencadenan señalización celular y respuestas biológicas no son del todo claro. En esta tesis dilucidamos el mecanismo molecular por el cual Thy-1 genera respuestas celulares en neuronas por la adición de su ligando endógeno Integrina $\alpha\beta3$, así como el requerimiento de la formación de un complejo de membrana que permita esta respuesta. La descripción de este mecanismo aporta al conocimiento general de cómo actúan estas proteínas tipo GPI y nos permiten entender en distintos sistemas, en una forma universal que aparentemente estas proteínas requieren de agrupamiento en la membrana plasmática para el reclutamiento de otras moléculas en sitios específicos de la membrana, donde se requiera su acción; por una parte localizando a sustratos y efectores, y por otra parte, aumentando el denominado efecto “Crowding de membrana”. El efecto Crowding ocurre debido a que en este ambiente, de alta agrupación de proteínas, se favorecen las repulsiones estéricas e interacciones electrostáticas, reduciendo el volumen efectivo que puede utilizar el solvente (en este caso los lípidos de membrana) (Zhou 2009). En términos

generales, afecta la termodinámica y cinética de: plegamiento, interacciones, agregación, estabilidad y difusión de proteínas y **muy importante la velocidad de formación de productos enzimáticos en la célula** (Minton 2001; Wieczorek and Zielenkiewicz 2008; Yuan, Chyan et al. 2008; Zhou 2008; Homouz, Stagg et al. 2009). Interesantemente, existen pocos trabajos que hayan desarrollado metodologías que permitan el estudio del efecto Crowding de proteínas de membrana (Simons and Vaz 2004). Nuestro modelo de trabajo podría ser utilizado para estudiar estos efectos, pues a partir de la agrupación de Thy-1 por presencia de un ligando, la concentración de proteínas en un espacio reducido se ve aumentada, desencadenándose un efecto celular medible. Además, el estudio de este efecto en nuestro modelo, podría dar cuenta del mecanismo por el cual quinasas de la familia de Src fosforilan a CBP y causando el reclutamiento de Csk. Estos estudios podrían ser desarrollados *in vitro* simplificando nuestro sistema. Para ello, podríamos sintetizar membranas con distintas concentraciones de las proteínas que conforman nuestro complejo de membrana CBP/Thy-1/Src y luego medir la actividad enzimática de Src en ensayos enzimáticos. Además, estos estudios podrían ser llevados a cabo en presencia y ausencia de Integrina. Y luego relacionar estos datos con el análisis de resultados obtenidos del complejo en la célula. Este conocimiento nos permitiría el comprender el mecanismo molecular por el cual Thy-1 y las proteínas GPI actúan y modelar matemáticamente estos eventos.

Respecto a la implicancia de que CBP sea el transductor de Thy-1 en neuronas, podemos señalar que la expresión diferencial CBP en el desarrollo del SNC y su regulación sobre quinasas de la familia de Src han mostrado tener un rol importante en la maduración

neuronal (Khanna, Roy et al. 2007; Lindquist, Karitkina et al. 2011). Por otra parte, recientemente estudios clínicos de pacientes con esquizofrenia en Japón mostraron que los niveles del mensajero de CBP se encuentran significativamente disminuidos respecto al grupo control (Balan, Iwayama et al. 2014). Aparentemente, CBP tendría un rol importante en este tipo de patología en la regulación de la actividad de quinasas de la familia de Src que fosforilan receptores sinápticos como el receptor de NMDA en el espacio postsináptico (Salter and Kalia 2004). Este receptor actúa como un canal del calcio cuya apertura puede ser regulada por su estado de fosforilación y por unión a ligando (Roche, Standley et al. 2001; Salter and Kalia 2004). Datos no publicados de nuestro laboratorio muestran que Thy-1 puede ubicarse en el espacio postsináptico. Además, que la adición de Integrina $\alpha v \beta 3$ a neuronas corticales incrementa la fosforilación en Y1472 de la subunidad NMDR2B, fosforilación que es regulada por quinasas de la familia de Src. Esta fosforilación ha sido asociada a la apertura y tráfico de este receptor (Roche, Standley et al. 2001). Además, estudios confirman que esta fosforilación puede estar aumentada en varias condiciones, incluyendo daño en nervios y administración de etanol (Yagi 1999; Abe, Matsumura et al. 2005). Estos datos sugieren que Thy-1 y CBP podrían regular al canal NMDA. Este hecho podría tener implicancias tanto en lo observado en pacientes con esquizofrenia como en el entendimiento del rol fisiológico de Thy-1 en neuronas, que hasta la fecha es desconocido. Para el estudio de estas proyecciones podemos proponer realizar tanto estudios *in situ* como *in vivo*. Por una parte la participación de Thy-1 en la regulación del tráfico, fosforilación y apertura del canal de MNDA podría ser estudiado tanto en células CAD con Thy-1 y/o CBP

silenciados, como en neuronas corticales de animales knockout para Thy-1. Así como el rol de Thy-1 y CBP en la formación de sinapsis efectivas *in vitro*, efecto que podría estar relacionado a comportamiento esquizoide. Además, nuestro laboratorio se encuentra estableciendo como modelo de estudio ratones knockout de Thy-1. Estos ratones presentan fallas del aprendizaje social que podrían relacionarse a comportamiento esquizoide o autista. Sin embargo, ningún estudio ha clasificado estas fallas de conducta en una patología particular hasta la fecha. La utilización de estos animales nos permitiría el evaluar si el silenciamiento de Thy-1, Integrina y/o CBP tiene repercusiones en el comportamiento de estos animales, así como si la re-expresión de estas moléculas bloquean estas fallas conductuales. Sin embargo, por ahora éstas son solo posibles proyecciones de este trabajo y requieren ser estudiadas.

La implicancia más evidente de este trabajo apunta a la regeneración neuronal. Thy-1 se expresa en el cerebro adulto en neuronas (Stohl and Gonatas 1977; Morris 1985). Sin embargo, Integrina $\alpha\beta3$ fisiológicamente se expresa durante el desarrollo del SNC en astrocitos; expresándose en la adultez bajo condiciones pro-inflamatorias, heridas o daño (Ellison, Velier et al. 1998; Kang, Choi et al. 2008). El mayor conocimiento de las vías de señalización que causan un microambiente no permisivo para la regeneración neuronal, en el contexto de la comunicación celular entre astrocitos y neuronas podría llegar a ser útiles en el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas que apunten al re-establecimiento de redes neuronales dañadas. Si bien en la actualidad existe el consenso de que para lograr regeneración de los procesos neuronales afectados, los tratamientos contra un blanco molecular específico no son efectivos (Okano, Yoshizaki

et al. 2003), el conocimiento generado en el desarrollo de las vías específicas que desencadenan retracción de procesos neuronales puede aportar en el desarrollo de terapias que apuntaran a múltiples blancos. Además, en los últimos años se ha ido desarrollando algunas terapias contra blancos moleculares convergentes río abajo de las distintas vías de señalización descritas que pueden causar este fenómeno, estas muestran tener mayor efectividad en el re-establecimiento de redes neuronales; tal es el caso del uso de inhibidores de ROCK (Riento and Ridley 2003; Fujita and Yamashita 2014; Joshi, Bobilev et al. 2015), quinasa que encontramos se encuentra involucrada en la retracción de neuritas mediadas por Integrina $\alpha\beta3$ /Thy-1.

7-Bibliografía

- Abe, T., S. Matsumura, et al. (2005). "Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain." Eur J Neurosci **22**(6): 1445-1454.
- Aizawa, H., S. Wakatsuki, et al. (2001). "Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse." Nat Neurosci **4**(4): 367-373.
- Avalos, A. M., W. T. Arthur, et al. (2004). "Aggregation of integrins and RhoA activation are required for Thy-1-induced morphological changes in astrocytes." J Biol Chem **279**(37): 39139-39145.
- Avalos, A. M., A. D. Valdivia, et al. (2009). "Neuronal Thy-1 induces astrocyte adhesion by engaging syndecan-4 in a cooperative interaction with $\alpha\beta$ 3 integrin that activates PKC α and RhoA." J Cell Sci **122**(19): 3462-3471.
- Balan, S., Y. Iwayama, et al. (2014). "Sequencing and expression analyses of the synaptic lipid raft adapter gene PAG1 in schizophrenia." J Neural Transm.
- Barker, T. H., H. E. Grenett, et al. (2004). "Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity." Exp Cell Res **295**(2): 488-496.
- Barker, T. H. and J. S. Hagood (2009). "Getting a grip on Thy-1 signaling." Biochim Biophys Acta **1793**(5): 921-923.
- Barker, T. H., M. A. Pallero, et al. (2004). "Thrombospondin-1-induced focal adhesion disassembly in fibroblasts requires Thy-1 surface expression, lipid raft integrity, and Src activation." J Biol Chem **279**(22): 23510-23516.
- Ben-Zvi, A., L. Ben-Gigi, et al. (2007). "Modulation of semaphorin3A activity by p75 neurotrophin receptor influences peripheral axon patterning." J Neurosci **27**(47): 13000-13011.
- Bradshaw, J. M. (2010). "The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches." Cell Signal **22**(8): 1175-1184.
- Brdicka, T., D. Pavlistova, et al. (2000). "Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase Csk and is involved in regulation of T cell activation." J Exp Med **191**(9): 1591-1604.
- Brugger, B., C. Graham, et al. (2004). "The membrane domains occupied by glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein and Thy-1 differ in lipid composition." J Biol Chem **279**(9): 7530-7536.
- Chen, C. H., Y. J. Chen, et al. (2007). "Role of PKA in the anti-Thy-1 antibody-induced neurite outgrowth of dorsal root ganglionic neurons." J Cell Biochem **101**(3): 566-575.
- Chen, C. H., S. M. Wang, et al. (2005). "Role of Thy-1 in in vivo and in vitro neural development and regeneration of dorsal root ganglionic neurons." J Cell Biochem **94**(4): 684-694.
- Chen, Y., L. Veracini, et al. (2009). "The transmembrane protein CBP plays a role in transiently anchoring small clusters of Thy-1, a GPI-anchored protein, to the cytoskeleton." J Cell Sci **122**(21): 3966-3972.
- Choi, J., L. Leyton, et al. (2005). "Characterization of α X I-domain binding to Thy-1." Biochem Biophys Res Commun **331**(2): 557-561.

- Doherty, P., A. Singh, et al. (1993). "Thy-1 antibody-triggered neurite outgrowth requires an influx of calcium into neurons via N- and L-type calcium channels." *J Cell Biol* **122**(1): 181-189.
- Draberova, L. and P. Draber (1993). "Cross-linking of Thy-1 glycoproteins or high-affinity IgE receptors induces mast cell activation via different mechanisms." *Immunology* **80**(1): 103-109.
- Draberova, L. and P. Draber (1993). "Thy-1 glycoprotein and src-like protein-tyrosine kinase p53/p56lyn are associated in large detergent-resistant complexes in rat basophilic leukemia cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3611-3615.
- Dreyer, E. B., D. Leifer, et al. (1995). "An astrocytic binding site for neuronal Thy-1 and its effect on neurite outgrowth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11195-11199.
- Durrheim, G. A., D. Garnett, et al. (2001). "Thy-1 associated pp85--90 is a potential docking site for SH2 domain-containing signal transduction molecules." *Cell Biol Int* **25**(1): 33-42.
- Ellison, J. A., J. J. Velier, et al. (1998). "Osteopontin and its integrin receptor alpha(v)beta3 are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke." *Stroke* **29**(8): 1698-1706; discussion 1707.
- Fiore, V. F., L. Ju, et al. (2014). "Dynamic catch of a Thy-1- α 5 β 1+syndecan-4 trimolecular complex." *Nat Commun* **5**: 4886.
- Fujita, Y. and T. Yamashita (2014). "Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system." *Front Neurosci* **8**: 338.
- Gordon-Weeks, P. R. (2004). "Microtubules and growth cone function." *J Neurobiol* **58**(1): 70-83.
- Hermosilla, T., D. Muñoz, et al. (2008). "Direct Thy-1/ α V β 3 integrin interaction mediates neuron to astrocyte communication." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1783**(6): 1111-1120.
- Herrera-Molina, R. (2009). La interacción molecular integrina α V β 3/Thy-1 en el contacto célula-célula entre astrocitos y neuronas participa en la inhibición del crecimiento de neuritas y la retracción de procesos neuronales a través de una vía de señalización que involucra a SRC. Doctor en Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile.
- Herrera-Molina, R., R. Frischknecht, et al. (2012). "Astrocytic α V β 3 integrin inhibits neurite outgrowth and promotes retraction of neuronal processes by clustering Thy-1." *PLoS One* **7**(3): e34295.
- Herrera-Molina, R., A. Valdivia, et al. (2013). "Thy-1-interacting molecules and cellular signaling in cis and trans." *Int Rev Cell Mol Biol* **305**: 163-216.
- Homouz, D., L. Stagg, et al. (2009). "Macromolecular crowding modulates folding mechanism of alpha/beta protein apoflavodoxin." *Biophys J* **96**(2): 671-680.
- Hueber, A. O., A. M. Bernard, et al. (1997). "Thymocytes in Thy-1-/- mice show augmented TCR signaling and impaired differentiation." *Curr Biol* **7**(9): 705-708.
- Hunter, T. (1987). "A tail of two src's: mutatis mutandis." *Cell* **49**(1): 1-4.
- Ingle, E. (2008). "Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways." *Biochim Biophys Acta* **1784**(1): 56-65.
- Ishizaki, T., M. Maekawa, et al. (1996). "The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase." *EMBO J* **15**(8): 1885-1893.

- Janiak, A., E. A. Zemskov, et al. (2006). "Cell surface transglutaminase promotes RhoA activation via integrin clustering and suppression of the Src-p190RhoGAP signaling pathway." *Mol Biol Cell* **17**(4): 1606-1619.
- Jeon, C.-Y., H.-J. Kim, et al. (2010). "Neurite outgrowth from PC12 cells by basic fibroblast growth factor (bFGF) is mediated by RhoA inactivation through p190RhoGAP and ARAP3." *Journal of Cellular Physiology* **224**(3): 786-794.
- Joshi, A. R., I. Bobylev, et al. (2015). "Inhibition of Rho-kinase differentially affects axon regeneration of peripheral motor and sensory nerves." *Exp Neurol* **263**: 28-38.
- Kang, W. S., J. S. Choi, et al. (2008). "Differential regulation of osteopontin receptors, CD44 and the alpha(v) and beta(3) integrin subunits, in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia." *Brain Res* **1228**: 208-216.
- Kasahara, K. and Y. Sanai (2000). "Functional roles of glycosphingolipids in signal transduction via lipid rafts." *Glycoconj J* **17**(3-4): 153-162.
- Kemshead, J. T., M. A. Ritter, et al. (1982). "Human Thy-1: expression on the cell surface of neuronal and glial cells." *Brain Res* **236**(2): 451-461.
- Khanna, S., S. Roy, et al. (2007). "Regulation of c-Src activity in glutamate-induced neurodegeneration." *J Biol Chem* **282**(32): 23482-23490.
- Koh, C. G. (2006). "Rho GTPases and Their Regulators in Neuronal Functions and Development." *Neurosignals* **15**(5): 228-237.
- Kuroiwa, K., Y. Torikai, et al. (2012). "Epitope determination of anti rat thy-1 monoclonal antibody that regulates neurite outgrowth." *Hybridoma (Larchmt)* **31**(4): 225-232.
- Leyton, L. and J. S. Hagood (2014). "Thy-1 modulates neurological cell-cell and cell-matrix interactions through multiple molecular interactions." *Adv Neurobiol* **8**: 3-20.
- Leyton, L., P. Schneider, et al. (2001). "Thy-1 binds to integrin β 3 on astrocytes and triggers formation of focal contact sites." *Curr Biol* **11**(13): 1028-1038.
- Lim, Y. S., T. McLaughlin, et al. (2008). "p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping." *Neuron* **59**(5): 746-758.
- Lindquist, S., D. Karitkina, et al. (2011). "Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid-Enriched Microdomains Differentially Modulates Src Kinase Activity in Brain Maturation." *PLoS One* **6**(9): e23978.
- Luo, L. (2002). "Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity." *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 601-635.
- Maciver, S. K. and P. J. Hussey (2002). "The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins." *Genome Biol* **3**(5): reviews3007.
- Mayeux-Portas, V., S. E. File, et al. (2000). "Mice lacking the cell adhesion molecule Thy-1 fail to use socially transmitted cues to direct their choice of food." *Curr Biol* **10**(2): 68-75.
- McDonald, C. L., C. Bandtlow, et al. (2011). "Targeting the Nogo receptor complex in diseases of the central nervous system." *Curr Med Chem* **18**(2): 234-244.
- Minton, A. P. (2001). "The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media." *J Biol Chem* **276**(14): 10577-10580.
- Miyagawa-Yamaguchi, A., N. Kotani, et al. (2014). "Expressed glycosylphosphatidylinositol-anchored horseradish peroxidase identifies co-clustering molecules in individual lipid raft domains." *PLoS One* **9**(3): e93054.

- Morita, H., K. Isobe, et al. (1996). "Thy-1 antigen mediates apoptosis of rat glomerular cells in vitro and in vivo." *Nephron* **73**(2): 293-298.
- Morris, R. (1985). "Thy-1 in developing nervous tissue." *Dev Neurosci* **7**(3): 133-160.
- Narisawa-Saito, M., Y. Yamanashi, et al. (1996). "Thy-1 molecule associates with protein tyrosine kinase(s) in rat mesangial cells." *Clin Exp Immunol* **106**(1): 86-90.
- Okada, M. (2012). "Regulation of the SRC family kinases by Csk." *Int J Biol Sci* **8**(10): 1385-1397.
- Okano, H., T. Yoshizaki, et al. (2003). "[Regeneration of central nervous system: its concept and strategy]." *Rinsho Shinkeigaku* **43**(11): 824-826.
- Oneyama, C., T. Iino, et al. (2009). "Transforming potential of Src family kinases is limited by the cholesterol-enriched membrane microdomain." *Mol Cell Biol* **29**(24): 6462-6472.
- Patwardhan, P. and M. D. Resh (2010). "Myristoylation and membrane binding regulate c-Src stability and kinase activity." *Mol Cell Biol* **30**(17): 4094-4107.
- Qi, Y., J. K. Wang, et al. (1997). "Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation." *J Neurosci* **17**(4): 1217-1225.
- Raff, M. C., K. L. Fields, et al. (1979). "Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture." *Brain Res* **174**(2): 283-308.
- Rege, T. A. and J. S. Hagood (2006). "Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis." *FASEB J* **20**(8): 1045-1054.
- Rege, T. A. and J. S. Hagood (2006). "Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses." *Biochim Biophys Acta* **1763**(10): 991-999.
- Rege, T. A., M. A. Pallero, et al. (2006). "Thy-1, via its GPI anchor, modulates Src family kinase and focal adhesion kinase phosphorylation and subcellular localization, and fibroblast migration, in response to thrombospondin-1/hep I." *Exp Cell Res* **312**(19): 3752-3767.
- Riento, K. and A. J. Ridley (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6): 446-456.
- Roche, K. W., S. Standley, et al. (2001). "Molecular determinants of NMDA receptor internalization." *Nat Neurosci* **4**(8): 794-802.
- Saalbach, A., A. Wetzel, et al. (2005). "Interaction of human Thy-1 (CD 90) with the integrin α v β 3 (CD51/CD61): an important mechanism mediating melanoma cell adhesion to activated endothelium." *Oncogene* **24**(29): 4710-4720.
- Saitou, T., K. Kajiwara, et al. (2014). "Roles of Raft-Anchored Adaptor Cbp/PAG1 in Spatial Regulation of c-Src Kinase." *PLoS One* **9**(3): e93470.
- Salter, M. W. and L. V. Kalia (2004). "Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation." *Nat Rev Neurosci* **5**(4): 317-328.
- Schecterson, L. C. and M. Bothwell (2010). "Neurotrophin receptors: Old friends with new partners." *Developmental Neurobiology* **70**(5): 332-338.
- Schlamp, C. L., E. C. Johnson, et al. (2001). "Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells." *Mol Vis* **7**: 192-201.
- Sebok, A., N. Nusser, et al. (1999). "Different roles for RhoA during neurite initiation, elongation, and regeneration in PC12 cells." *J Neurochem* **73**(3): 949-960.
- Sebö, Á., N. Nusser, et al. (1999). "Different Roles for RhoA During Neurite Initiation, Elongation, and Regeneration in PC12 Cells." *Journal of Neurochemistry* **73**(3): 949-960.

- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-39.
- Simons, K. and W. L. Vaz (2004). "Model systems, lipid rafts, and cell membranes." Annu Rev Biophys Biomol Struct **33**: 269-295.
- Stefanova, I., V. Horejsi, et al. (1991). "GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases." Science **254**(5034): 1016-1019.
- Stohl, W. and N. K. Gonatas (1977). "Distribution of the thy-1 antigen in cellular and subcellular fractions of adult mouse brain." J Immunol **119**(2): 422-427.
- Takeuchi, S. (2006). "Expression and purification of human PAG, a transmembrane adapter protein using an insect cell expression system and its structure basis." Protein J **25**(4): 295-299.
- Thomas, P. M. and L. E. Samelson (1992). "The glycoposphatidylinositol-anchored Thy-1 molecule interacts with the p60fyn protein tyrosine kinase in T cells." J Biol Chem **267**(17): 12317-12322.
- Tiveron, M. C., E. Barboni, et al. (1992). "Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein." Nature **355**(6362): 745-748.
- Tripathi, B. K. and P. S. Zelenka (2009). "Cdk5-dependent regulation of Rho activity, cytoskeletal contraction, and epithelial cell migration via suppression of Src and p190RhoGAP." Mol Cell Biol **29**(24): 6488-6499.
- Tsui-Pierchala, B. A., M. Encinas, et al. (2002). "Lipid rafts in neuronal signaling and function." Trends Neurosci **25**(8): 412-417.
- Wandel, E., A. Saalbach, et al. (2012). "Thy-1 (CD90) Is an Interacting Partner for CD97 on Activated Endothelial Cells." The Journal of Immunology **188**(3): 1442-1450.
- Wen, H. C., C. Kao, et al. (2013). "Thy-1-induced migration inhibition in vascular endothelial cells through reducing the RhoA activity." PLoS One **8**(4): e61506.
- Wetzel, A., T. Chavakis, et al. (2004). "Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)." J Immunol **172**(6): 3850-3859.
- Wieczorek, G. and P. Zielenkiewicz (2008). "Influence of macromolecular crowding on protein-protein association rates--a Brownian dynamics study." Biophys J **95**(11): 5030-5036.
- Wilson, B. S., S. L. Steinberg, et al. (2004). "Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes." Mol Biol Cell **15**(6): 2580-2592.
- Wong, L., S. A. Lieser, et al. (2005). "Coupled motions in the SH2 and kinase domains of Csk control Src phosphorylation." J Mol Biol **351**(1): 131-143.
- Worthylake, R. A., S. Lemoine, et al. (2001). "RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration." J Cell Biol **154**(1): 147-160.
- Wylie, S. R., P. J. Wu, et al. (1998). "A conventional myosin motor drives neurite outgrowth." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 12967-12972.
- Xue, G. P., R. A. Calvert, et al. (1990). "Expression of the neuronal surface glycoprotein Thy-1 is under post-transcriptional control, and is spatially regulated, in the developing olfactory system." Development **109**(4): 851-864.
- Xue, G. P. and R. J. Morris (1990). "Evidence for cell-type differences in the regulation of neuronal expression of Thy-1." Biochem Soc Trans **18**(3): 441-442.
- Yagi, T. (1999). "Molecular mechanisms of Fyn-tyrosine kinase for regulating mammalian behaviors and ethanol sensitivity." Biochem Pharmacol **57**(8): 845-850.

- Yang, S. H., Y. J. Chen, et al. (2008). "Anti-Thy-1 antibody-induced neurite outgrowth in cultured dorsal root ganglionic neurons is mediated by the c-Src-MEK signaling pathway." J Cell Biochem **103**(1): 67-77.
- Yuan, J. M., C. L. Chyan, et al. (2008). "The effects of macromolecular crowding on the mechanical stability of protein molecules." Protein Sci **17**(12): 2156-2166.
- Zhai, J., H. Lin, et al. (2003). "Direct Interaction of Focal Adhesion Kinase with p190RhoGEF." Journal of Biological Chemistry **278**(27): 24865-24873.
- Zhang, Z., A. K. Ottens, et al. (2006). "Direct Rho-associated kinase inhibition [correction of inhibiton] induces cofilin dephosphorylation and neurite outgrowth in PC-12 cells." Cell Mol Biol Lett **11**(1): 12-29.
- Zhou, H. X. (2008). "Protein folding in confined and crowded environments." Arch Biochem Biophys **469**(1): 76-82.
- Zhou, H. X. (2009). "Crowding effects of membrane proteins." J Phys Chem B **113**(23): 7995-8005.
- Zhou, Y., J. S. Hagood, et al. (2010). "Thy-1-Integrin $\alpha\beta 5$ Interactions Inhibit Lung Fibroblast Contraction-induced Latent Transforming Growth Factor- $\beta 1$ Activation and Myfibroblast Differentiation." Journal of Biological Chemistry **285**(29): 22382-22393.