

# 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.....	13
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 lapso de tiempo <i>in situ</i> y evaluación de velocidad de crecimiento de neuritas. ....	32
4.8- Ensayos de inmunoprecipitación con proteína A-sefaraosa. ....	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 plásmidos. ....	39
4.14- Inmunoprecipitación y análisis por Maldi-Tof. ....	39
4.15- Análisis estadísticos. ....	40
<b>5-Resultados. ....</b>	<b>42</b>
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" ....	53
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 rto 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- Análisis 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..	83
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.....	63
Figura 21: El silenciamiento de CBP previene el aumento en la fosforilación de Cofilina causado por Integrina.....	63
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 vía 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