

UCH-FC
Doc-BM
S 218
C1



**LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL RECEPTOR
PARA BDNF, TRKB, LUEGO DEL TRATAMIENTO
CON FLUOXETINA. CO-DISTRIBUCIÓN CON
SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE NMDA**

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular,

Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

por

MAURICIO SANDOVAL POZO

Septiembre, 2014

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ÚRSULA WYNEKEN H.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

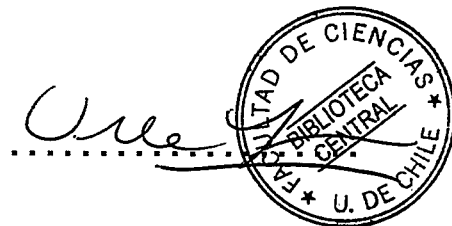
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

MAURICIO SANDOVAL POZO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 08 de Julio de 2014

Directora de Tesis

Dra. UrsulaWyneken



Comisión de evaluación de la Tesis

Dra. Francisca Bronfman

Dr. Manuel Kukuljan

Dr. Bernardo Morales

Dr. Alejandro Roth (Presidente)

Three handwritten signatures are written over horizontal dotted lines, corresponding to the names of the thesis evaluation commission members listed to the left.

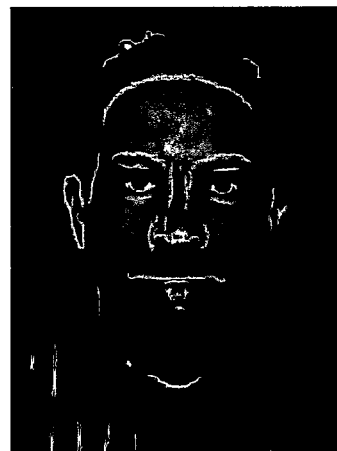
"La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica"

Aristóteles

*"No hay que confundir nunca el conocimiento con la sabiduría.
El primero nos sirve para ganarnos la vida; la sabiduría nos ayuda a vivir"*

Sorcha Carey

Biografía



Mauricio Sandoval Pozo nació en Santiago el 21 de Septiembre de 1975, cursó sus estudios escolares en el Liceo Experimental Manuel de Salas, para luego estudiar Bioquímica en la Universidad de Chile, terminando su tesis en el año 2004, la que desarrolló en el laboratorio de Neurociencias de la Universidad de los Andes, bajo la tutoría de la Dra. Wyneken. Siguió trabajando en el mismo laboratorio para luego realizar su Tesis de Doctorado, en estrecha colaboración con el LeibnizInstituteforNeurobiology, a cargo del Dr. Gundelfinger. Actualmente es Profesor Investigador en el laboratorio de Fisiología Integrativa y Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de los Andes.

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia, por el apoyo constante y sostenido en todas las instancias profesionales de mi vida. A mis padres, por inculcarme los valores y principios que rigen mis actos. A mi esposa Andrea, por no dejar de alentarme y apoyarme en todo momento. Y a mi hija Antonia, por darle sentido a todo este esfuerzo.

A la Dra. Wyneken, por ser mi tutora y guía en todo estos años. A mis compañeros y amigos de laboratorio, por estar siempre que los necesité, tanto profesional como personalmente. Especialmente a la Sole, que siempre estuvo dispuesta a tomar el primer turno y apoyarme en todos los experimentos.

A las instituciones que han apoyado la realización de este postgrado, CONICYT con su beca para estudios de Doctorado en Chile, su beca de apoyo a la realización de la Tesis doctoral y becas para la asistencia a congresos. A la International Society for Neurochemistry y al gobierno alemán, con sus instituciones DAAD y DFG, por financiar mis viajes al Leibniz Institute for Neurobiology, Magdeburg, Alemania. A la International Brain Research Organization, por financiar mi participación en el congreso de la Sociedad Internacional de Neurociencias

Finalmente, a mis amigos de toda la vida, quienes siempre estuvieron para escuchar mis problemas una y otra vez, tratando de encontrar una respuesta a las dificultades que surgían en el camino, en interminables noches de conversación.

Contenido

Dedicatoria	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de figuras, esquemas y tablas.....	vii
Resumen.....	ix
Abstract.....	xv
Introducción.....	1
I. BDNF.....	1
1. Durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC).....	1
2. En el SNC adulto.....	2
II. Localización subcelular del receptor TrkB.....	4
III. Señalización de BDNF mediada por su receptor TrkB.....	5
IV. Receptores para L-glutamato.....	9
V. Fármacos antidepresivos y la señalización mediada por BDNF.....	13
Hipótesis	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos.....	18
Métodos	19
I. Tratamiento con el fármaco antidepresivo fluoxetina	19
II. Purificación de P3 (fracción microsomal) y sus sub-fracciones	19
III. Purificación de sinaptosomas, membranas sinápticas y densidades postsinápticas	22
IV. Purificación de balsas lipídicas	25
V. Generación de un anticuerpo policlonal contra (TrkB _{ic}).....	25
VI. Anticuerpos.....	26

VII. Co-Inmunoprecipitación	28
VIII. Inmunoprecipitación magnética de vesículas	29
IX. Western Blot	30
X. Espectrometría de masas	31
1. P3-1	31
2. Balsas lipídicas	33
XI. Inmunofluorescencia.....	36
XII. Microscopía electrónica	36
Resultados	38
I. TrkB y pTrkB se localizan en una fracción enriquecida en membranas intracelulares	38
II. Identificación, mediante espectrometría de masas, de las proteínas diferencialmente contenidas en P3-1 después de tratamiento con fluoxetina.....	43
III. Identificación, mediante espectrometría de masas, de las proteínas presentes en balsas lipídicas aisladas a partir de P3-1	54
IV. Niveles de la subunidades de los receptores tipo NMDA y AMPA en sinapsis excitatorias luego del tratamiento repetitivo con fluoxetina.....	67
V. TrkB co-distribuye con GluN2A y no con GluN2B en inmunoprecipitaciones	70
VI. Co-distribución de TrkB y GluN2A en inmunofluorescencia y microscopía electrónica	75
Discusión.....	81
I. Localización intracelular de TrkB	83
II. Identificación de proteínas en P3-1.....	85
III. Identificación de proteínas en balsas lipídicas	88
IV. Efecto del tratamiento con fluoxetina en la composición del R-NMDA sináptico	92
Abreviaciones.....	ix

Bibliografía	95
Anexos	116
I. Carta de aprobación de protocolos por el comité de ética.....	116
II. Total proteínas espectrometría de masas de balsas lipídicas	117
III. ANEXO Sandoval v/s Suzuki 2011	143
IV. ANEXO Sandoval v/s Foster 2003.....	144

Índice de figuras, esquemas y tablas

Fig. 1 Purificación de la fracción microsomal (P3) y su fraccionamiento en un gradiente de velocidad	21
Fig. 2 - Purificación de sinaptosomas, membranas sinápticas y densidades postsinápticas.....	24
Fig. 3 Preparación de muestras de balsas lipídicas para espectrometría de masas	35
Fig. 4 Caracterización del fraccionamiento subcelular	39
Fig. 5 Caracterización del fraccionamiento de P3 en gradiente de velocidad	41
Fig. 6 Espectrometría de masas (EM) de P3-1 luego del tratamiento repetitivo con fluoxetina por 2 semanas	44
Fig. 7 - Validación por WB de los resultados obtenidos por espectrometría de masas	49
Fig. 8 - Red de interacciones de las proteínas de P3-1 que cambiaron sus niveles luego del tratamiento con fluoxetina.....	51
Fig. 9 - Niveles de TrkB y TrkB fosforilado (Y817) en P3-1 luego del tratamiento con fluoxetina.....	53
Fig. 10 - Caracterización de balsas lipídicas obtenidas a partir de P3-1	55
Fig. 11 - Análisis de las proteínas obtenidas por espectrometría de masas de las balsas lipídicas de P3-1.....	58
Fig. 12 - Comparación entre las proteínas obtenidas desde balsas lipídicas de P3-1 y proteínas que componen la densidad postsináptica (DPS).....	61
Fig. 13 - Modelo propuesto de interacciones entre TrkB y receptores para L-glutamato	63
Fig. 14 - Análisis de las proteínas presentes en fracciones de homogenizado y P3 de muestras control y tratadas con fluoxetina.....	65
Fig. 15 - Análisis de las proteínas presentes en fracciones de balsas lipídicas de muestras control y tratadas con fluoxetina.....	66
Fig. 16 - Localización sináptica de subunidades del receptor NMDA y AMPA	68
Fig. 17 - Generación de un anticuerpo policlonal contra el dominio intracelular de TrkB (TrkBic).....	71

Fig. 18 - Inmunoprecipitación magnética de vesículas portadoras de TrkB a partir de P3-1 obtenido de animales control.....	73
Fig. 19 - Inmunoprecipitación magnética de vesículas portadoras de TrkB a partir de P3-1 obtenido de animales control y tratados con fluoxetina.....	74
Fig. 20 - Inmunofluorescencia en neuronas hipocampales: TrkB-GluN1 en dendritas y soma	77
Fig. 21 - Inmunofluorescencia en neuronas hipocampales: TrkB-GluN2A.....	78
Fig. 22 - Inmunofluorescencia en neuronas hipocampales: TrkB-GluN2B.....	79
Fig. 23 - Inmuno-microscopía electrónica: optimización de la técnica.....	80
Fig. 24 - Esquema de posibles interacciones funcionales entre TrkB y receptores de NMDA compuestos por GluN1/GluN2A.....	82

Esquema 1- Regulación en una neurona glutamatérgica de la expresión de BDNF por el tratamiento repetitivo con antidepresivos.....	15
---	----

Tabla 1- Anticuerpos utilizados.....	27
Tabla 2 - Proteínas reguladas en la fracción P3-1 luego del tratamiento repetitivo con flx por dos semanas.....	48

Abreviaciones

- AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- AMPA:** ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
- BCA:** Ácido bicinconfínico
- BDNF:** Factor neurotrófico derivado de cerebro
- BSA:** Albúmina de suero bovino
- c-fos:** Factor de transcripción
- CREB:** Proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc
- DAG:** Diacilglicerol
- DPS:** Densidad postsináptica
- DTT:** Ditioneitol
- EGTA:** Ácido tetra acético etilenglicol
- E-LTP:** LTP temprano
- EM:** Espectrometría de masas
- Fluoxetina:** Antidepresivo que inhibe selectivamente la recaptación de serotonina
- Fyn:** Proteína tirosina quinasa proto-oncogen
- GTPasa:** Enzima que hidroliza GTP
- IF:** Inmunofluorescencia
- IP:** Inmunoprecipitación
- IP₃:** Inositol trifosfato

Lipid Raft: Balsas lipídicas

LTP: Potenciación de larga duración

L-LTP: LTP tardío

MBP: Proteína de unión a maltosa

ME: Microscopía electrónica

MS: Membranas sinápticas

Nav1.9: Canal de sodio dependiente de voltaje

NGF: Factor de crecimiento neural

NMDA: N-metil-D-aspartato

P3: Fracción microsomal

PBS: Tampón fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

PI3K/Akt: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato 3 quinasa/Proteína quinasa B, con actividad específica serina/treonina

PKC: Proteína quinasa C

PLC γ : Fosfolipasa C gama

pTrkB: Receptor TrkB fosforilado (activado)

R-AMPA: Receptor para L-glutamato de tipo AMPA

R-KA: Receptor para L-glutamato de tipo Kainato

R-NMDA: Receptor para L-glutamato de tipo NMDA

Ras/MAPK/Erk: GTPasa/Proteína quinasa activada por mitógeno/Quinasa regulada por señalización extracelular

Shc/FRS2: Proteína adaptadora/Sustrato del factor de crecimiento de fibroblastos

SCN: Sistema nervioso central

SDS-PAGE: Electroforesis en condiciones denaturates

Sin: Sinaptosomas

SSRI: Inhibidores específicos de la recaptación de serotonina

TrkA: Tirosina quinasa transmembrana A, receptor para NGF

TrkB: Tirosina quinasa transmembrana B, receptor para BDNF

TrpC: Canal catiónico de potencial transitorio

WB: Western blot

Resumen

La neurotrofina factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF) es ampliamente expresada en el cerebro adulto donde regula las propiedades estructurales y funcionales de las sinapsis, afectando la plasticidad y la cognición. BDNF ha sido relacionado con la fisiopatología de trastornos neuropsiquiátricos como depresión y con los mecanismos de acción de fármacos usados en su tratamiento. La unión de BDNF a su receptor TrkB induce su fosforilación y la activación de vías de señalización río abajo. Después de su activación, el receptor TrkB es endocitado para activar su señalización, reciclamiento o degradación. En dendritas y espinas dendríticas, TrkB está localizado en vesículas intracelulares que están enriquecidas en balsas lipídicas, y su inserción así como también su endocitosis están reguladas por la actividad sináptica glutamatérgica.

En las sinapsis excitadoras, el neurotransmisor L-glutamato interactúa con receptores postsinápticos como el receptor tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y el tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA). Los receptores de NMDA son heterotetrámeros compuestos por dos subunidades GluN1 y dos GluN2, las que a su vez son codificadas por 4 genes (GluN2A-D). La presencia de subunidades específicas en la sinapsis tiene consecuencias estructurales y funcionales. De esa manera, sinapsis maduras y estables están preferentemente compuestas por receptores de NMDA ricos en GluN2A. Los

mecanismos de tráfico y de inserción de GluN2A a la membrana se desconocen. Aunque TrkB está localizado en vesículas intracelulares en sinapsis excitadoras, su relación funcional con los componentes moleculares de éstas no ha sido abordada. En el laboratorio de Neurociencias se encontró que el tratamiento repetitivo de ratas adultas con el fármaco antidepresivo fluoxetina activa al receptor TrkB en sinapsis excitadoras e induce su internalización. Esto está acompañado de cambios morfológicos compatibles con mayor expresión de componentes proteicos propios de sinapsis maduras. Así, la hipótesis de este trabajo fue “La activación de TrkB en respuesta al tratamiento con fluoxetina induce su localización en balsas lipídicas intracelulares y vesículas que contienen componentes proteicos de sinapsis excitadoras”. Para obtener información respecto de la composición proteica de las vesículas que contienen TrkB activado, ratas adultas fueron tratadas por 15 días con fluoxetina 0,7 mg/kg o con salino como control. Se separaron vesículas intracelulares de telencéfalo mediante centrifugaciones diferenciales para obtener una sub-fracción de la fracción microsomal (P3), llamada P3-1. Las balsas lipídicas se prepararon desde P3-1. Se utilizaron dos estrategias proteómicas para identificar los componentes de ambos tipos de muestras: P3-1 fue analizado por electroforesis en dos dimensiones seguido por una espectrometría de masas en tándem de tipo MALDI TOF/TOF; mientras que las balsas lipídicas fueron analizadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución asociada a espectrometría de masas. En P3-1 encontramos 11 proteínas que cambiaron su contenido luego del tratamiento con

fluoxetina, y dentro de éstas, la enzima glicolítica/gluconeogénica fructosa bifosfatasa aldolasa C estaba aumentada en 7,6 veces. El proteoma de las balsas lipídicas mostró 995 proteínas, incluyendo subunidades de receptores para L-glutamato y proteínas presentes en sinapsis excitadoras, como proteínas de andamio, motores moleculares y proteínas de transducción de señales. Las balsas lipídicas contenían TrkB y TrkB fosforilado, además de la subunidad GluN2A del receptor de NMDA. Interesantemente, la subunidad GluN2B no fue identificada, indicando una regulación diferencial para estas subunidades, lo que fue comprobado por Western Blot. Resultados similares fueron obtenidos cuando inmunopurificamos TrkB desde la fracción P3-1, donde encontramos interacción con GluN2A pero no con GluN2B. En cultivos neuronales observamos co-distribución de TrkB y GluN2A. Finalmente, estamos realizando experimentos de microscopía electrónica en vesículas inmunopurificadas, para confirmar la localización TrkB y GluN2A en la misma estructura membranosa. Nuestros resultados revelan que el tratamiento con fluoxetina induce la re-localización intracelular de proteínas asociadas a sinapsis excitadoras. Pudimos mostrar por primera vez que la subunidad GluN2A del receptor de NMDA co-localiza con TrkB activado en balsas lipídicas y en vesículas intracelulares inmunopurificadas que contienen TrkB, sugiriendo que el tráfico intracelular y/o la inserción en la membrana de ambas proteínas es regulado de manera coordinada, lo que abre nuevas líneas de investigación para aclarar los mecanismos celulares involucrados en el remodelamiento sináptico dependiente de BDNF.

Abstract

The neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is highly expressed in the adult brain where it regulates the structural and functional properties of synapses, thereby affecting plasticity and cognition. BDNF has been linked to the pathophysiology of neuropsychiatric disorders such as depression and to the mechanisms of action of drugs used for its treatment. Binding of BDNF to its receptor TrkB leads to its phosphorylation and activation of the downstream pathways. Following activation, the TrkB receptor undergoes endocytosis followed by intracellular signaling, recycling or degradation. In dendrites and in dendritic spines, TrkB is localized in intracellular vesicles that are rich in lipid rafts, and its insertion as well as endocytosis is tightly regulated by L-glutamate-mediated synaptic activity.

In excitatory synapses, L-glutamate interacts with postsynaptic receptors, such as the N-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) types. NMDA receptors are heterotetramers composed by two GluN1 and two GluN2 subunits that in turn are encoded by 4 genes (NR2A-D). The presence of specific subunits in the synapse has structural and functional consequences. Thus, stable and mature synapses are preferentially composed by GluN2A-rich NMDA receptors, while specific trafficking and membrane insertion mechanisms for this subunit are mostly unknown.

Although TrkB is localized to intracellular vesicles, its functional relationship with the molecular components of excitatory synapses has not been addressed. In the laboratory of Neuroscience it was found that repetitive treatments of adult rats with the antidepressant drug fluoxetine activates the TrkB receptor at excitatory synapses and induces its internalization. This is accompanied by morphological changes compatible with higher expression levels of mature synapse-specific protein components. Therefore, the hypothesis of the present work was: "The activation of TrkB in response to fluoxetine treatment induces its localization in intracellular lipid rafts and vesicles that contain molecular components of excitatory synapses". To gain insight into the protein composition of TrkB-containing vesicles, adult rats were injected for 15 days with either saline or 0.7 mg/kg fluoxetine. Intracellular forebrain vesicles were collected by differential centrifugation to get a microsomal (P3) sub-fraction called P3-1, and lipid rafts were prepared from P3-1. Two proteomic strategies were applied to identify the components of both types of samples: P3-1 was analyzed by 2D gel electrophoresis followed by MALDI TOF/TOF tandem mass spectrometry, while lipid rafts were analyzed by High Performance Liquid Chromatography followed by Mass Spectrometry. We found in P3-1 that 11 proteins changed its levels after fluoxetine treatment, among them, the glycolytic/gluconeogenic enzyme fructose biphosphatase aldolase C was up-regulated by 7.6-fold. The lipid raft proteome showed 995 proteins, including subunits of L-glutamate receptors, and proteins known to be present in excitatory synapses such as scaffolding proteins,

molecular motors, and signal transduction proteins. Lipid rafts contained TrkB and phosphorylated TrkB in addition to the GluN2A subunit of NMDA receptor. Interestingly, the GluN2B subunit was not identified, indicating a differential regulation for these subunits, as confirmed by Western Blot. Similar results were obtained when immunopurified TrkB from P3-1, in which interaction with GluN2A but not with GluN2B was found. In cultured neurons we observed co-distribution of TrkB and GluN2A. Finally, we are performing electron microscopy experiments in immunopurified vesicles to confirm the localization of TrkB and GluN2A in the same membranous structure. Our results reveal that fluoxetine treatment induces the intracellular re-localization of excitatory synapse-associated proteins. We could show for the first time that the GluN2A subunit of NMDA receptor co-distributes with activated TrkB in lipid rafts and in immunopurified TrkB-containing intracellular vesicles suggesting that the intracellular trafficking and/or membrane insertion of both proteins is regulated in a coordinated manner, opening new avenues of research able to clarify cellular mechanisms involved in BDNF-dependent synaptic remodeling.

Introducción

I. BDNF

El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por brain-derived neurotrophic factor) es una neurotrofina que se expresa en altos niveles en el sistema nervioso central adulto donde regula una gran variedad de funciones neuronales (Reichardt, 2006). En el cerebro anterior, es sintetizado tanto en el cuerpo celular como en la base de la espina dendrítica de neuronas excitadoras (Schuman et al., 2006, Jakawich et al., 2010, Kaneko et al., 2012, Orefice et al., 2013), así como también en astrocitos (Schwartz and Nishiyama, 1994, Miklic et al., 2004). Cuando es sintetizado en el soma neuronal, es transportado hacia las dendritas y los axones mediante gránulos secretorios, denominados vesículas de núcleo denso por su alto contenido proteico (Wu et al., 2004), desde donde es liberado en respuesta a activación sináptica (Kuczewski et al., 2010, Edelmann et al., 2014).

Entre las funciones reguladas por BDNF a través de su receptor TrkB cabe destacar:

1. Durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC)

- Participa en la diferenciación de precursores neuronales hacia neuronas (Ahmed et al., 1995, Shetty and Turner, 1998), crecimiento de neuritas y su

diferenciación a axón (Shelly et al., 2007, Park and Poo, 2013), regulación de la migración neuronal (Behar et al., 1997, Fukumitsu et al., 2006) y en la selección, por actividad sináptica, de las conexiones que se mantendrán en el adulto (Tyler and Pozzo-Miller, 2003).

2. En el SNC adulto

- Regula la plasticidad de las sinapsis excitadoras e inhibitoras (Huang and Reichardt, 2001, Carvalho et al., 2008, Martinowich and Lu, 2008, Shinoda et al., 2011), y la maduración y morfología neuronal (Bramham and Messaoudi, 2005, Sairanen et al., 2005).
- Tiene un importante papel neuroprotector en daño por isquemia (Beck et al., 1994, Zhang and Pardridge, 2001, Yao et al., 2012, Li et al., 2014), meningitis (Bifrare et al., 2005) y por excitotoxicidad (Almeida et al., 2005, Melo et al., 2013). Este efecto neuroprotector se puede deber a efectos positivos sobre regeneración axonal, crecimiento dendrítico o a inhibición de la apoptosis (Han et al., 2000).
- BDNF está implicado tanto en la formación como en la consolidación de memoria, y en fenómenos de aprendizaje (Bekinschtein et al., 2008a, Cowansage et al., 2010, Schulz-Klaus et al., 2013, Bekinschtein et al., 2014).
- BDNF y su receptor TrkB juegan un papel importante tanto en la generación de LTP (E-LTP por LTP temprano) como en la mantención de este paradigma (L-LTP por LTP tardío) (Korte et al., 1995, Lu et al., 2008, Minichiello, 2009, Edelman et al., 2014). Además, se ha observado una recuperación de la

potenciación de larga duración (LTP) dependiente de BDNF luego de daño por isquemia, que indica un papel regenerativo para esta neurotrofina en este tipo de daño (Kiprianova et al., 1999).

- Por otra parte, BDNF y su receptor TrkB están implicados en trastornos psiquiátricos, donde, a modo de ejemplo, en depresión se ha observado que ambos están disminuidos en el hipocampo y en la corteza prefrontal, tanto en pacientes depresivos como en modelos animales de depresión (Neto et al., 2011, Yu and Chen, 2011), y que el tratamiento con fármacos antidepresivos estimula su síntesis (Castren, 2004, Autry and Monteggia, 2012), siendo la señalización mediada por BDNF/TrkB necesaria para la recuperación después de estrategias terapéuticas que tienen efectos antidepresivos (Li et al., 2008, Jiang and Salton, 2013).

La importancia fisiológica de BDNF en el SNC se ha demostrado mediante una variante genética de BDNF, que contiene un polimorfismo en un nucleótido. Éste determina que el aminoácido valina en la posición 66 del pro-péptido sea sustituido por metionina (val66/met). Este cambio de aminoácido afecta la secreción regulada de BDNF (Egan et al., 2003, Chen et al., 2006). Como consecuencia, se observan defectos en plasticidad sináptica (Pattwell et al., 2012), memoria (van Wingen et al., 2010, Baj et al., 2013), y asociación con diversos trastornos psiquiátricos (Hong et al., 2011, Hosang et al., 2014).

II. Localización subcelular del receptor TrkB

TrkB presenta una amplia distribución en el SNC (Yan et al., 1997). Principalmente, se encuentra en una localización intracelular en neuronas, donde se ha observado en los segmentos axónicos proximales y en la base de las espinas dendríticas, asociado a distintos organelos de tipo vesicular que no han sido claramente identificados (Okazawa et al., 1993, Drake et al., 1999). Si bien su localización es preferentemente intracelular, en las sinapsis excitadoras TrkB se localiza tanto en la terminación presináptica como en el elemento post-sináptico, la espina dendrítica y la densidad postsináptica (DPS) (Wu et al., 1996, Ziff, 1997, Aoki et al., 2000, Husi et al., 2000, Wyneken et al., 2001, Gomes et al., 2006); a diferencia de las sinapsis inhibitorias, donde presenta una localización extrasináptica (Drake et al., 1999, Swanwick et al., 2004). Además, se ha observado también la presencia de TrkB en zonas ricas en balsas lipídicas (lipid raft), plataformas donde este receptor es posicionado y retirado de la membrana plasmática de manera dependiente de activación (Wu et al., 1997, Suzuki et al., 2004, Pereira and Chao, 2007, Assaife-Lopes et al., 2013).

La presencia e inserción de TrkB en la membrana sináptica es dependiente de actividad neuronal. Así, se ha descrito su inserción en respuesta a influxos de Ca^{2+} por activación de receptores para L-glutamato (Nagappan and Lu, 2005), además de una rápida inserción mediada por BDNF (Haapasalo et al., 2002). TrkB está contenido en vesículas en la vecindad de la membrana plasmática, desde donde se insertaría en respuesta a actividad (Meyer-Franke et

al., 1998). En el fenómeno de potenciación de larga duración (LTP), esta inserción de TrkB dependiente de actividad es necesaria para la generación de LTP tardía (L-LTP), que involucra síntesis de proteínas dependiente de BDNF (Bekinschtein et al., 2007, Bekinschtein et al., 2008b, Minichiello, 2009), postulándose que BDNF/TrkB constituyen una de las “marcas” (“tag”) esenciales que permiten una potenciación sináptica específica (Lu et al., 2011). Una vez posicionado en la membrana, TrkB sería endocitado y entraría en la vía de reciclaje, lo que permitiría la mantención de la señalización de BDNF en LTP, al liberarse de su unión al receptor y ser liberado nuevamente al espacio sináptico (Santi et al., 2006).

III. Señalización de BDNF mediada por su receptor TrkB.

TrkB es un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca. La unión de BDNF a TrkB resulta en la dimerización y trans-autofosforilación del receptor en varios residuos de tirosina, de los cuales dos (Y515 y Y816) son esenciales para su señalización río abajo. La fosforilación de TrkB en Y515 recluta la proteína adaptadora Shc/FRS2, activando la vía de señalización Ras/MAPK/Erk, que induce diferenciación y crecimiento neuronal (Liu and Meakin, 2002) y/o la vía de señalización PI3K/Akt, que induce supervivencia y crecimiento neuronal (Numakawa et al., 2010). La fosforilación en Y816 a su vez recluta la fosfolipasa C γ (PLC γ), generando Inositol trifosfato (IP $_3$) y Diacilglicerol (DAG), que activan la liberación de Ca $^{2+}$ desde depósitos

intracelulares y a la proteína quinasa C (PKC), respectivamente (Kaplan and Miller, 2000, Chao, 2003, Huang and Reichardt, 2003).

Por otra parte, la unión de BDNF a TrkB produce la modulación rápida de distintos tipos de canales iónicos (Kovalchuk et al., 2004). Así, TrkB activa en milisegundos corrientes de Na⁺ mediadas por el canal Nav1.9 (Blum and Konnerth, 2005). A su vez, la fosforilación en Y515 induce la activación de la proteína Fyn quinasa, la que fosforila al receptor de NMDA aumentando su permeabilidad al ión Ca²⁺; mientras que la fosforilación de Y816 activa canales catiónicos de la familia TrpC, que a su vez inducen entrada de Ca²⁺ extracelular.

Una vez que ha sido activado, TrkB puede ser endocitado, y de hecho se ha descrito que algunos efectos del receptor dependen precisamente de su internalización: por ejemplo el crecimiento dendrítico dependiente de la vía PI3K/Akt depende de endocitosis de TrkB mediada por clatrina (Zheng et al., 2008), señalización que ocurriría en la vecindad de la membrana plasmática, ya que la internalización por clatrina está asociada generalmente a degradación o reciclaje de vesículas (Zheng et al., 2008). Además, TrkB podría señalizar y endocitarse desde una zona de la membrana plasmática enriquecida en balsas lipídicas, en las cuales se recluta TrkB fosforilado (pTrkB) en respuesta a la estimulación con BDNF (Suzuki et al., 2004, Pereira and Chao, 2007, Sebastiao et al., 2011). Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana plasmática ricos en esfingolípidos y colesterol, y cumplen un importante papel en señalización celular (Tsui-Pierchala et al., 2002). En estos microdominios se

reclutan receptores para activar su vía de señalización (Simons and Toomre, 2000) y en algunos casos su posterior endocitosis, y existe consenso de que es un proceso principalmente dependiente de caveolina (Parton and Richards, 2003). Sin embargo, más recientemente también se ha descrito su endocitosis directa (Rajendran and Simons, 2005) y mediada por clatrina (Puri et al., 2005, Sarnataro et al., 2009).

Es posible que los endosomas que contienen TrkB entren a una vía de transporte retrógrado, como ha sido demostrado para TrkA (Howe and Mobley, 2005, Yano and Chao, 2005). Se ha postulado que el transporte de TrkB desde la sinapsis hacia el soma celular sería necesario para modular la expresión génica e inducir cambios plásticos neuronales. Los efectos nucleares de TrkB están mediados por la activación de factores de transcripción como CREB y por la expresión de genes tempranos como c-Fos (Pizzorusso et al., 2000, Gokce et al., 2009, Fisar and Hroudova, 2010), y son compatibles con su presencia en endosomas que transportan el mensaje de BDNF hacia el núcleo (Cohen et al., 2011). Por otra parte, los endosomas de reciclaje en dendritas y espinas dendríticas cumplirían, localmente, una importante función en la arborización dendrítica y el desplazamiento de TrkB a la DPS, ambos procesos dependientes de la GTPasa monomérica Rab11 (Huang et al., 2013, Lazo et al., 2013).

En resumen, los organelos intracelulares reportados hasta ahora que contienen TrkB, podrían potencialmente corresponder a endosomas tempranos, tardíos, de reciclaje o de señalización, como a cuerpos multivesiculares. Entre

los componentes proteicos de estos organelos podemos encontrar: motores moleculares como dineínas y su proteína asociada dinactina (Mitchell et al., 2012, Zhou et al., 2012, Moughamian et al., 2013), miosina V (a y b) (Hammer and Wagner, 2013); GTPasas tales como Rab5, Rab7 y Rab11, entre otras (D'Adamo et al., 2014); proteínas asociadas a balsas lipídicas como Thy-1 (Wilson et al., 2004), Fyn quinasa (Pereira and Chao, 2007, Vacaresse et al., 2008) y flotilina 1 y 2 (Persaud-Sawin et al., 2009, Swanwick et al., 2009).

Si bien existen datos parciales de la composición de organelos intracelulares que contienen TrkB y hay estudios que sugieren que su localización en balsas lipídicas en sinapsis excitadoras son un elemento clave que determina la especificidad de su señalización (Zonta and Minichiello, 2013), carecemos de una visión más completa sobre la composición proteica de estos organelos y su relación funcional con sinapsis excitadoras. Parece plausible que existan mecanismos celulares específicos relacionados con sinapsis excitadoras. Por esto, la presente tesis se orientó hacia la caracterización de organelos intracelulares portadores de TrkB y su relación con componentes de sinapsis excitadoras. Los componentes moleculares de estas sinapsis han sido identificados en los últimos años, mayoritariamente por técnicas proteómicas, y están enriquecidas o específicamente localizadas en la espina dendrítica y la DPS.

IV. Receptores para L-glutamato

Los receptores para L-glutamato son de tipo metabotrópico o ionotrópico. Los receptores metabotrópicos están acoplados a proteína G y su activación induce una respuesta dependiente de segundos mensajeros. Existen 8 receptores metabotrópicos, los que han sido clasificados en 3 grupos funcionales según su homología y la cascada de señalización que activan: Grupo I, que consta de mGluR1 y 5, y activan señalización dependiente de fosfolipasa C, es decir liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares por IP3 (inositol trifosfato), y activación de PKC (proteína quinasa C por diacilglicerol); Grupo II compuesto por mGluR2 y 3, y Grupo III compuesto por mGluR4, 6, 7 y 8, que están acoplados a proteína G inhibitoria, por lo que su activación disminuye los niveles de cAMP (adenosín monosofato cíclico) (Conn and Pin, 1997).

Al activarse los receptores ionotrópicos, éstos sufren un cambio conformacional en el canal iónico, desencadenando su apertura y el influjo de iones, principalmente Na^+ y Ca^{2+} (Niciu et al., 2012). Los receptores ionotrópicos están clasificados en tres subtipos, nombrados según su selectividad a agonistas farmacológicos: receptores para ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (R-AMPA), receptores para ácido kaínico (R-KA) y receptores para N-metil-D-aspartato (R-NMDA) (Niciu et al., 2012).

Para el R-NMDA se han descrito tres familias de subunidades: GluN1, GluN2A-D y GluN3A-B. La composición del R-NMDA varía entre cerebro anterior

y cerebelo, donde en el primero está compuesto por dos subunidades GluN1 y dos GluN2 que pueden ser del tipo A o B, mientras que en el segundo está compuesto por dos subunidades GluN1 y dos GluN2C o D. Además, GluN3 ha sido descrito tanto en cerebro anterior (GluN3A) como en cerebelo (GluN3B) (Furukawa et al., 2005, Niciu et al., 2012). Las subunidades GluN1 unen, en el sitio de glicina, al co-agonista endógeno del receptor, D-serina. Las subunidades GluN2 presentan el dominio de unión para L-glutamato (Cull-Candy et al., 2001). Es necesaria la presencia de ambos agonistas para lograr la apertura del canal iónico.

El R-NMDA es un canal catiónico no selectivo permeable a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} que, en condiciones de potencial de membrana de reposo, presenta un bloqueo por Mg^{2+} en el poro del canal. Su apertura es dependiente de voltaje, se requiere depolarización de la membrana postsináptica, lo que desplaza al Mg^{2+} y permite el paso de iones a través del canal. La activación de este receptor promueve el ingreso de Ca^{2+} a la célula, lo que a su vez induce la activación de vías de señalización intracelulares calcio-dependientes, que incluyen el tráfico vesicular, crecimiento y diferenciación neuronal, cambios en la excitabilidad de la membrana y plasticidad sináptica, entre otras (Wang et al., 2006).

Los niveles de cada una de las subunidades de los receptores glutamatérgicos son regulados por la actividad neuronal. Así, las subunidades pueden ser selectivamente endocitadas o insertadas a la membrana perisináptica. Para el R-NMDA está descrito un cambio en las subunidades que lo

componen que es dependiente del desarrollo del SNC. En etapas tempranas de desarrollo, el R-NMDA en corteza e hipocampo está principalmente compuesto por subunidades GluN1 y GluN2B (GluN1/GluN2B), aunque también están descritos los receptores compuestos por dos subunidades GluN1, una subunidad GluN2B y una subunidad que puede ser GluN3A o GluN2D (GluN1/GluN2B/GluN3A o GluN2D)(Sanz-Clemente et al., 2013). A medida que avanza el desarrollo, estos receptores son reemplazados por R-NMDA compuestos por subunidades GluN1 y subunidades GluN2A (GluN1/GluN2A), aunque también están descritos receptores compuestos por dos subunidades GluN1, una subunidad GluN2A y una subunidad GluN2B o GluN2C (GluN1/GluN2A/GluN2B o GluN2C) (Citri and Malenka, 2008, Rauner and Kohr, 2011, Sanz-Clemente et al., 2013). La activación de los R-NMDA de tipo GluN1/GluN2B permite un ingreso mayor de Ca^{2+} comparado con los de tipo GluN1/GluN2A, factor que está relacionado con la formación de nuevas sinapsis en el desarrollo y plasticidad aumentada cuando se compara con sinapsis ricas en GluN2A, mientras que las sinapsis en su forma madura contienen R-NMDA de tipo GluN1/GluN2A (Sanz-Clemente et al., 2013). En el fenómeno de LTP se obtiene un efecto similar al observado en el desarrollo del SNC, donde una inducción de LTP induce inserción de R-NMDA de tipo GluN1/GluN2A en la membrana (Citri and Malenka, 2008, Rubio et al., 2013). La presencia de subtipos de subunidades GluN2 tiene efectos estructurales, afectando tanto la morfología dendrítica como sináptica. Así, una mayor presencia de GluN2B se relaciona con mayor longitud y complejidad del árbol dendrítico y con espinas dendríticas más

pequeñas e inmaduras (tipo “filopodio” y “delgadas”), el cambio hacia receptores con niveles aumentados de GluN2A induce retracción del árbol dendrítico y espinas dendríticas de mayor tamaño (tipo “callampa” o “herradura”) (Sepulveda et al., 2010). Por lo tanto, existe una correlación entre los cambios en la composición de los R-NMDA presentes en la membrana que involucran un tráfico diferencial de subunidades, tráfico que involucra mecanismos de endocitosis y exocitosis, además de movimientos laterales en la membrana, ya que estos receptores son removidos o insertados en localizaciones peri-sinápticas, para luego posicionarse en la DPS (Yashiro and Philpot, 2008). Los determinantes moleculares implicados en el tráfico de subunidades específicas han sido dilucidados en algunos casos. Por ejemplo, para las subunidades de los R-AMPA (Wang et al., 2008, van der Sluijs and Hoogenraad, 2011, Seeböhm et al., 2012, Bassani et al., 2013), se ha visto implicado a BDNF favoreciendo la interacción con proteínas implicadas en el tráfico de sus subunidades (GluA1-SAP97 y GluA2-GRIP1) (Jourdi and Kabbaj, 2013). Para las subunidades de los R-NMDA se ha descrito el motor molecular KIF17 (de la familia de las proteínas tipo kinesina) para la subunidad GluN2B (Setou et al., 2000, Guillaud et al., 2003, Bard and Groc, 2011), pero no hay antecedentes al respecto para la subunidad GluN2A.

La DPS es el lugar de anclaje de los receptores para L-glutamato en la sinapsis excitadora (Genoux and Montgomery, 2007). Esta especialización de la membrana plasmática está compuesta por un gran número de proteínas, donde

destacan proteínas de andamio o anclaje, como PSD-95, SAP-102, Homer y Shank (Iasevoli et al., 2013); proteínas de citoesqueleto de actina (Sheng and Kim, 2011); enzimas como CaM quinasa II (CKII), caseína quinasa y PKC gama (Soto et al., 2004, Boeckers, 2006, Okabe, 2007); proteínas de tráfico de membranas, como clatrina, SNAP-25 y sinapsina (Sheng and Hoogenraad, 2007); y motores moleculares como dineína y miosina (Osterweil et al., 2005, Cheng et al., 2006).

En el laboratorio se mostró que TrkB, localizado en sinapsis excitadoras, es activado y endocitado después de tratamiento repetitivo con los fármacos antidepresivos fluoxetina o reboxetina (Wyneken et al., 2006). Por ello, una estrategia posible para activar masivamente la señalización de BDNF/TrkB en sinapsis excitadoras es la administración de uno de estos fármacos, estrategia que fue utilizada en la presente tesis. Ello permitiría estudiar la composición de organelos intracelulares portadores de TrkB en situación basal y de estimulación.

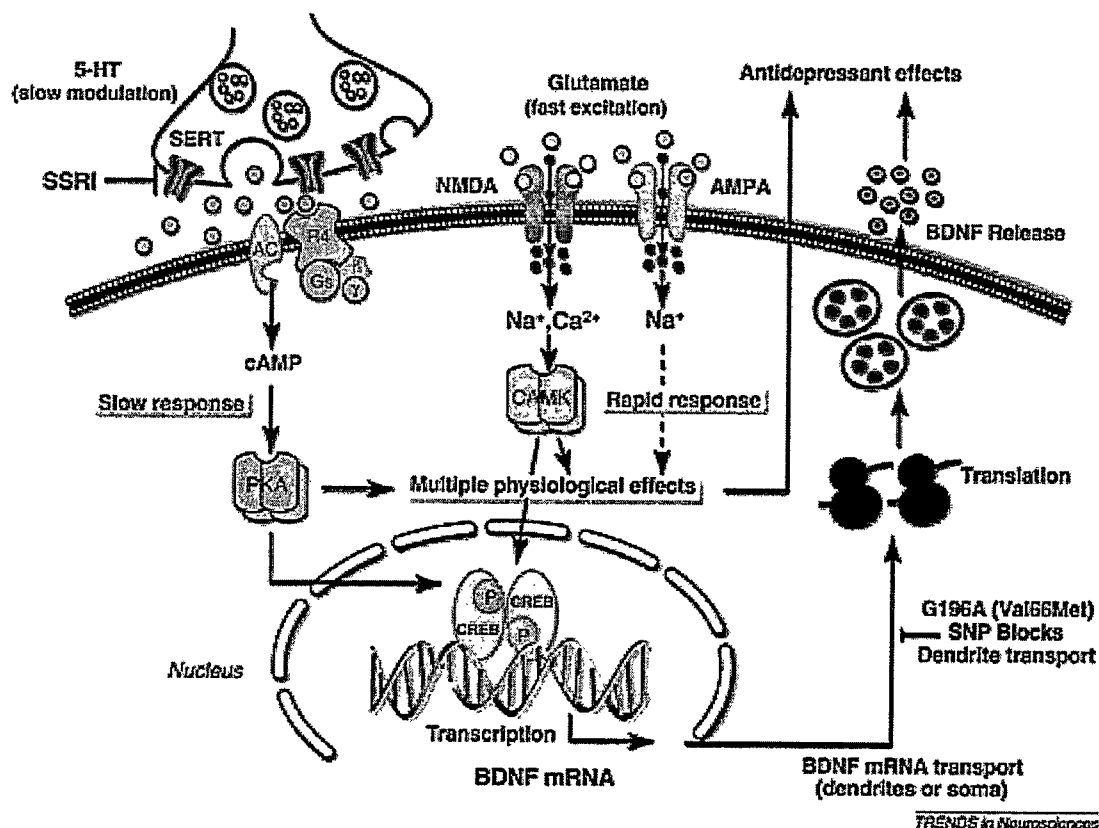
V. Fármacos antidepresivos y la señalización mediada por BDNF

Los fármacos antidepresivos actúan elevando los niveles de los neurotransmisores serotonina y/o noradrenalina en las sinapsis del sistema nervioso central ya que sus blancos primarios son: a) los transportadores de serotonina y/o noradrenalina sinápticos, encargados de recaptar el neurotransmisor desde el espacio sináptico hacia la terminación presináptica. Al



ser bloqueados, aumenta la concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico o b) La enzima encargada de la degradación de estos neurotransmisores, la monoamino oxidasa (Wong and Licinio, 2001, Krishnan and Nestler, 2008). Este mecanismo de acción originó la hipótesis de que la depresión mayor se debía a una deficiencia de estos neurotransmisores, teoría que no se sostiene actualmente (Lanni et al., 2009, Massart et al., 2012). En cambio, evidencias sólidas apoyan actualmente la idea que el efecto terapéutico de los fármacos antidepresivos está mediado por mecanismos adaptativos inducidos por factores tróficos, como BDNF, que se sintetizan en respuesta al tratamiento repetitivo con estos fármacos (Balu et al., 2008, Castren and Rantamaki, 2010), surgiendo así la hipótesis de que la neurobiología subyacente a la depresión involucra deficiencia trófica. Los factores tróficos, como BDNF, activarían mecanismos celulares subyacentes a la mejoría terapéutica que podrían constituir nuevos blancos para fármacos más efectivos y rápidos (Lee et al., 2010). Así, se ha visto que la administración repetitiva de fluoxetina, induce activación y señalización mediada por BDNF/TrkB (Rantamaki et al., 2007, Rantamaki et al., 2011, Di Lieto et al., 2012). Además, induce la endocitosis del receptor TrkB fosforilado (Wyneken et al., 2006). En el siguiente esquema se muestra cómo los antidepresivos del tipo SSRI (inhibidores específicos de la recaptación de serotonina), inducirían síntesis y liberación de BDNF en neuronas glutamatérgicas a través de su efecto positivo sobre la transcripción y traducción de BDNF, mediado por receptores de membrana para serotonina (Duman and Voleti, 2012).

Esquema 1- Regulación en una neurona glutamatérgica de la expresión de BDNF por el tratamiento repetitivo con antidepresivos



Esquema 1. Los fármacos de tipo SSRI (inhibidores específicos de la recaptación de serotonina) producen un aumento en los niveles de serotonina disponibles en el espacio sináptico. En este esquema se observa la activación de proteína quinasa A (PKA) vía AMP cíclico (cAMP), producto de la activación de un receptor para serotonina acoplado a proteína G_s. Esto lleva a la activación del factor de transcripción CREB, induciendo finalmente expresión de BDNF. Esta síntesis de BDNF es producto de una respuesta lenta, que requiere de tratamiento repetitivo con los SSRI. Por el contrario, se compara con una síntesis rápida de BDNF que depende de activación de los R-NMDA, lo que induce la activación de la proteína quinasa dependiente de Ca²⁺ y calmodulina (CAMK). Finalmente la proteína BDNF o su mRNA son transportados hacia las dendritas para ser liberado en sinapsis excitadoras. Se muestra también el efecto de la mutación Val66Met, que como se discutió antes afecta el transporte y secreción de BDNF (Duman and Voleti, 2012).

Además del antecedente de que TrkB se endocita desde sinapsis excitadoras después del tratamiento con fluoxetina, en el laboratorio se mostró que ocurren cambios en los niveles de expresión de subunidades de receptores NMDA (GluN1 y GluN2A) y AMPA (GluA1 y GluA2) en el telencéfalo, lo que se correlaciona con aumento en la densidad de espinas maduras (de tipo “callampa”) por sobre las espinas delgadas. Como los cambios en la estructura sináptica se asocian con la presencia de subunidades GluA2 y GluN2A en receptores AMPA y NMDA, respectivamente (Alvarez et al., 2007, Medvedev et al., 2008), pensamos que este recambio de subunidades implica su tráfico selectivo hacia la membrana dendrítica, lo que podría estar regulado por BDNF/TrkB por ser ésta una de las vías de señalización celular esenciales capaces de inducir los efectos plásticos asociados a eficacia antidepressiva. En ese sentido, Caldeira y cols. describieron un aumento en los niveles de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B del receptor de NMDA, y un aumento de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA, en la membrana de neuronas hipocámpales en cultivo al ser incubadas con BDNF (Caldeira et al., 2007a, Caldeira et al., 2007b), efecto que se bloqueó al utilizar antagonistas de TrkB.

Considerando que TrkB activado se localiza en organelos membranosos intracelulares después del tratamiento repetitivo con fluoxetina, y que parte de TrkB intracelular debería tener su origen en sinapsis excitadoras, lo que además tiene un efecto sobre la morfología de espinas dendríticas, se propone la siguiente hipótesis:

Hipótesis

“La activación del receptor TrkB en respuesta al tratamiento con fluoxetina induce su localización en balsas lipídicas y en vesículas intracelulares que contienen componentes proteicos de sinapsis glutamatérgicas”

Objetivo general

Determinar la composición proteica de organelos intracelulares portadores de TrkB después de tratamiento repetitivo con fluoxetina y la co-localización de TrkB en estos organelos, con componentes de sinapsis para L-glutamato.

Objetivos específicos

- 1.** Caracterizar, utilizando proteínas marcadoras de compartimientos subcelulares, una fracción de membranas intracelulares enriquecida en TrkB y TrkB fosforilado, a partir de preparaciones de telencéfalo de rata.
- 2.** Identificar, por espectrometría de masas, proteínas diferencialmente presentes en la fracción de membranas intracelulares enriquecida en TrkB y TrkB fosforilado, luego del tratamiento repetitivo con fluoxetina.
- 3.** Aislar balsas lipídicas a partir de la fracción de membranas intracelulares enriquecida en TrkB y TrkB fosforilado para identificar, mediante espectrometría de masas, las proteínas presentes.
- 4.** Seleccionar en base a resultados obtenidos en 2 y 3, componentes de sinapsis glutamatérgicas, preferentemente subunidades de receptores, para realizar estudios de co-distribución en vesículas intracelulares y en cultivos neuronales.

Métodos

I. Tratamiento con el fármaco antidepresivo fluoxetina

Ratas Sprague-Dawley de 12 semanas (200-300 gramos) fueron tratadas por vía intraperitoneal con fluoxetina (flx) disuelta en NaCl 0,9% (Fluoxetine hydrochloride, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), por 2 semanas, con una dosis diaria de 0,7 mg por kilogramo de peso. Las ratas controles fueron inyectadas con NaCl 0,9%. Todos los protocolos fueron previamente validados (Wyneken et al., 2006, Rantamaki et al., 2007, Ampuero et al., 2010) y aprobados por el comité de ética de la Universidad de los Andes (Anexo 1).

II. Purificación de P3 (fracción microsomal) y sus sub-fracciones

A fin de obtener una fracción rica en membranas intracelulares se usó como punto de partida la fracción microsomal P3 que contiene membranas de retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas sinápticas y vesículas endocíticas (Whittaker, 1965). Para obtener P3 se modificó el protocolo de Carlin (Carlin et al., 1980). Brevemente, se aislaron los telencéfalos de 12 ratas y se colocaron en 12 ml/g.t.h. (gramo tejido húmedo) de tampón de homogenización (sacarosa 0,32 M, EGTA 0,5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 7,4), suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Boehringer Mannheim). Toda la preparación se realizó en frío, entre 0 y 4°C. Los telencéfalos se seccionaron con tijeras de acero inoxidable y se homogenizaron en un homogenizador vidrio-teflón (doce veces). Del

homogenizado (H) se guardaron alícuotas para su análisis posterior. El homogenizado restante fue centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos, se lavó el sedimento (P1) en tampón de homogenización y se volvió a centrifugar a 1.000 x g por 5 minutos. Se recuperó los sobrenadantes (S1), los que fueron centrifugados a 12.000 x g por 20 minutos. El precipitado P2, correspondiente a la fracción cruda de membranas, fue almacenado para la posterior obtención de fracciones sinápticas. Se recuperó el sobrenadante (S2) y se centrifugó a 100.000 x g por 60 minutos. Se recuperó el precipitado (P3, fracción microsomal), el cual se resuspendió en sacarosa 0,32 M, EGTA 0,5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1, DTT 1 mM, y se guardó en fracciones de 500 µl a -80°C.

Para obtener las sub-fracciones de P3, 6 mg de proteínas de la fracción microsomal (P3) control y de animales tratados con fluoxetina, se cargaron sobre una gradiente continua de 2%-18% ficoll/sacarosa 0,32 M en HEPES-Na 50 mM, pH 7,4 (4 ml de cada uno) para separar vesículas de diferentes tamaños en una gradiente de velocidad (Figura 1) a 100.000 g por 30 minutos. Se obtuvieron 21 fracciones de 500 µl cada una y se determinó la concentración de proteínas en cada fracción mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith et al., 1985) y el perfil de distribución de las proteínas se comprobó además en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie luego de una electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). En este perfil se separaron dos picos de proteínas (P3-1 y P3-2). P3-1, que contiene TrkB activado, fue posteriormente

utilizado en los experimentos de inmunoprecipitación (IP), western blot (WB) y purificación de vesículas, además de análisis por espectrometría de masas (EM).

Fig. 1 Purificación de la fracción microsomal (P3) y su fraccionamiento en un gradiente de velocidad

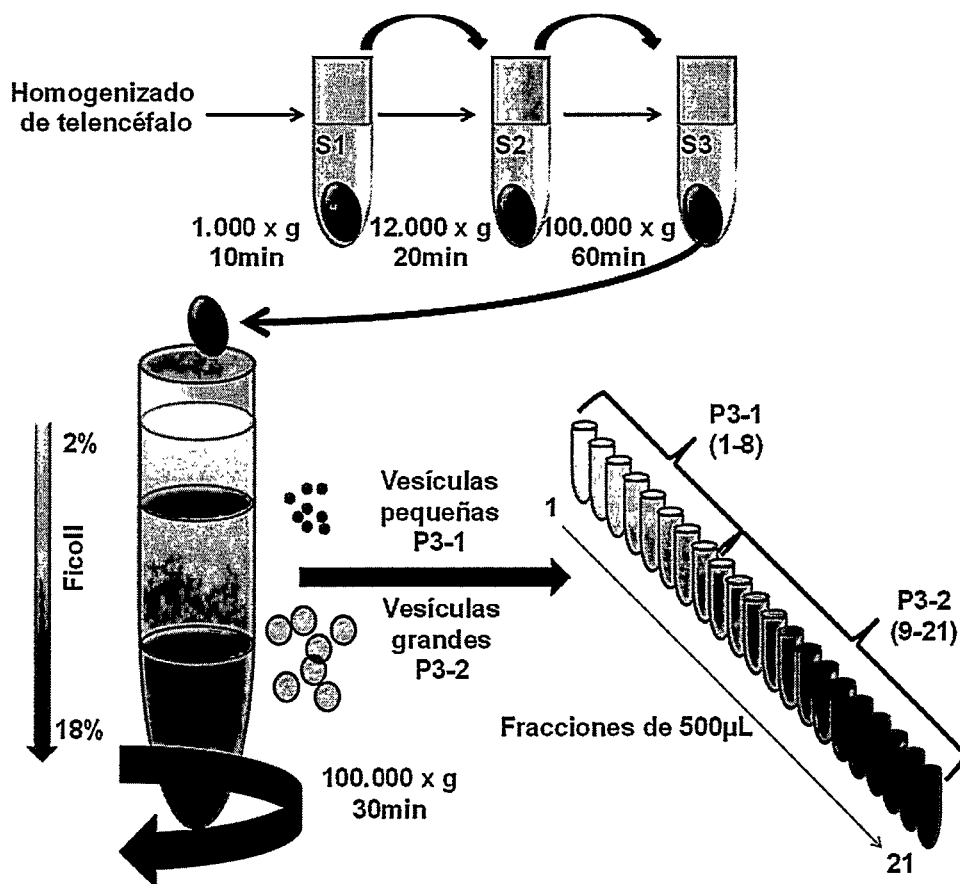


Figura 1. Obtención de P3 y su fraccionamiento en un gradiente de velocidad. Para la obtención de P3 los telencéfalos de 12 ratas fueron homogenizados y luego sometidos a centrifugaciones diferenciales como indica la figura. Para obtener las subfracciones de P3, éste se cargó sobre una gradiente continua de Ficoll (2-18%) y se centrifugó a 100.000 x g por 30 minutos, para separar vesículas según su tamaño. Se obtuvo 21 fracciones de 500 µl. que corresponden a P3-1 (fracciones 1 a 8) y P3-2 (fracciones 9-21).

III. Purificación de sinaptosomas, membranas sinápticas y densidades postsinápticas

La fracción cruda de membranas P2 se resuspendió en un volumen final de 1 ml/g.t.h. de sacarosa 0,32 M, EGTA 0,5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1, se homogenizó en un homogenizador vidrio-teflón y se cargó sobre una gradiente discontinua de sacarosa 1,0 M/1,2 M (4 ml por fase) que contiene Tris-Cl 5 mM pH 8,1. Esta gradiente se centrifugó a 200.000 x g por 60 minutos. Después de la centrifugación se descartó el sedimento, compuesto principalmente por mitocondrias, y la interfase 0,32 M/1,0 M sacarosa, compuesta principalmente por mielina (Rodriguez G, 1986), y se colectó la interfase 1,0 M/1,2 M sacarosa, que corresponde a los botones sinaptosomales resellados y unidos a membranas presinápticas (sinaptosomas) (Rodriguez G, 1986). Los sinaptosomas se sometieron a shock hipo-osmótico, agregando 10 volúmenes de EGTA 0,5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1, e incubándolos durante 30 minutos a 0°C con agitación suave. Posteriormente el material se centrifugó a 33.000 x g por 30 minutos, y el precipitado resultante (P4) se resuspendió nuevamente en un volumen final de 1 ml/g.t.h. de sacarosa 0,32 M, EGTA 0,5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1, se homogenizó en un homogenizador vidrio-teflón, y se cargó sobre una gradiente discontinua idéntica a la anterior. Se centrifugó a 200.000 x g por 60 minutos para luego recuperar el material presente en la interfase 1,0 M/1,2 M de sacarosa, que corresponde a membranas sinápticas reselladas (membranas sinápticas). Las membranas sinápticas se sometieron a delipidación, diluyendo la fracción hasta

6 ml/gth con sacarosa 0,32 M, Tris-Cl 5 mM pH 8,1, para luego agregar un volumen igual de sacarosa 0,32 M, CaCl₂ 0,025 mM, Tritón X-100^{M.R.} 1%, DTT 2 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1. Después de centrifugar a 33.000 x g por 30 minutos, el sedimento se lavó con Hepes-Na 50 mM pH 7,4 y se centrifugó a 250.000 x g por 10 minutos. El sedimento final (DPS) se resuspendió en 0,2 ml/gth de Hepes-Na 50 mM pH 7,4 (Figura 2). El material se alicuotó en fracciones de 100 µl y se congeló rápidamente en un baño de N₂ líquido. Las DPS y las demás fracciones recolectadas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Fig. 2 - Purificación de sinaptosomas, membranas sinápticas y densidades postsinápticas

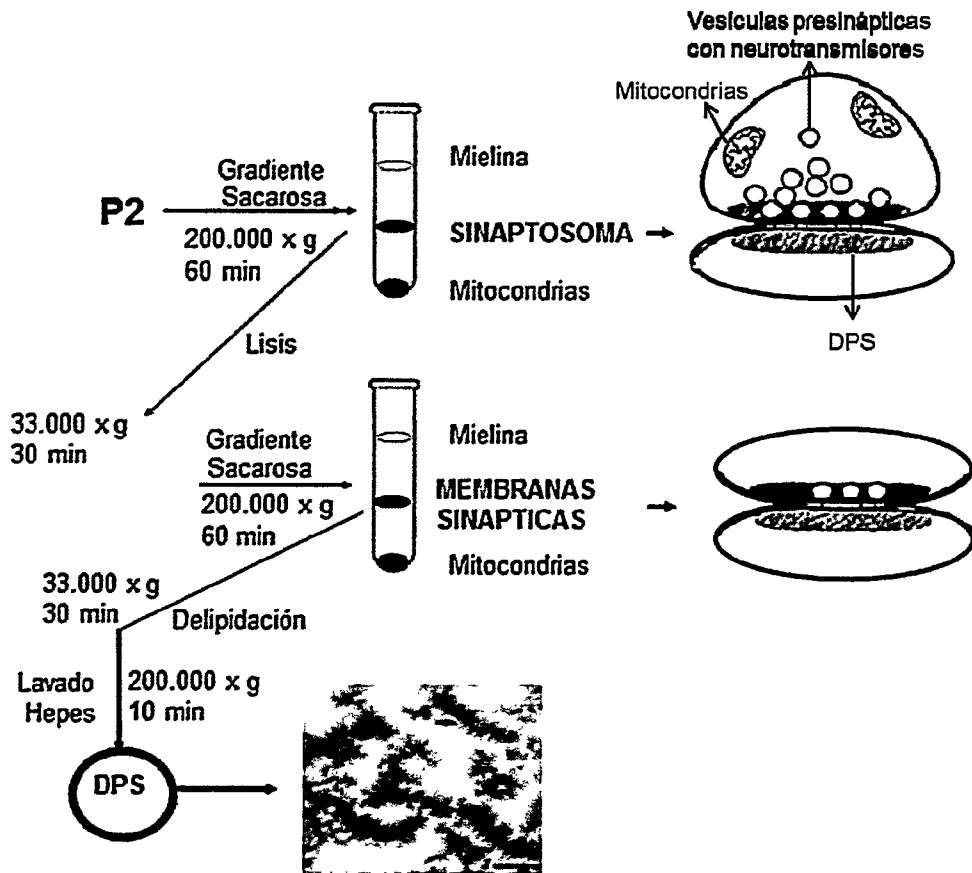


Figura 2. La fracción P2 se resuspendió en un tampón sacarosa 0,32 M y se cargó sobre una gradiente discontinua de sacarosa (1,0 M/1,2 M), se centrifugó y de la interfase entre sacarosa 1,0 M y 1,2 M se obtuvo los sinaptosomas, de los cuales se guardó una alícuota para analizar. Los sinaptosomas restantes se lisaron y se centrifugaron, para luego resuspender el material lisado en tampón sacarosa 0,32 M y cargarlo sobre una gradiente discontinua de sacarosa (1,0 M/1,2 M). Esta gradiente se centrifugó y de la interfase entre sacarosa 1,0 M y 1,2 M se obtuvo las membranas sinápticas, de las cuales se guardó una alícuota para analizar. Las membranas sinápticas restantes se delipidaron y se centrifugaron, para luego lavar y centrifugar el material delipidado para eliminar los detergentes. El precipitado que se obtuvo corresponde a la fracción de DPS, las cuales se guardaron para analizar. Barra 200 nm.

IV. Purificación de balsas lipídicas

Las balsas lipídicas se obtuvieron a partir de 1 mg de P3-1. Para ello se utilizaron 5 fracciones de 100 μ l de P3-1 con una concentración de 2 mg/ml y se centrifugaron a 40.000 x g por 10 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1,5 ml de tampón HN (Hepes 25mM, NaCl 100mM, pH 7,4) - 1% Triton X-100, suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas. Se incubó 30 minutos a 4°C en un agitador rotatorio y luego se mezcló con un volumen (1,5 ml) de sacarosa 80%, preparada en tampón HN. Esta mezcla (sacarosa 40% final) se transfirió a un tubo de centrifuga, donde se agregó 6 ml de sacarosa 30% en tampón HN y luego 3 ml de sacarosa 5% en tampón HN, formando un gradiente discontinuo en el tubo (Sacarosa 5, 30 y 40%). Se centrifugó a 200.000 x g por 20 horas a 4°C, y se recolectaron fracciones de 500 μ l desde la parte superior hasta el fondo del tubo. A cada fracción se le determinó la concentración de proteínas por el método del BCA, para luego cuantificar la abundancia relativa de proteínas en cada fracción mediante geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie, obteniéndose un perfil de distribución de las proteínas en el gradiente. Posteriormente se identificó por WB las fracciones en que están presentes TrkB, pTrkB Y817 y el marcador de balsas lipídicas Thy-1.

V. Generación de un anticuerpo policlonal contra (TrkB_{ic})

El anticuerpo contra TrkB_{ic} fue generado en el Leibniz Institute for Neurobiology, Magdeburgo, Alemania, usando como antígeno una proteína de

fusión del dominio intracelular de TrkB unido a MBP (proteína de unión a maltosa). Esta proteína se subclonó a partir de la secuencia completa de TrkB (TrkBfl, full length). Esto se realizó mediante experimentos de PCR usando los partidores adecuados, para obtener sólo el dominio intracelular del receptor (bp 2105 a 3127), correspondiendo a los aminoácidos 482 al 821. La secuencia obtenida se insertó en un plasmidio de expresión pMAL c2 (New England Biolabs, Ipswich, USA). Este plasmidio se transfectó en bacterias BL-21 (BL21 (DE3) Competent E. coli, New England BioLabs, Ipswich, USA.), en las cuales se indujo la síntesis de la proteína de fusión, TrkBic-MBP, la que luego se purificó en una matriz de amilosa por afinidad con Maltosa 10mM. Mediante SDS-PAGE y una posterior tinción con azul de Coomassie se comprobó una banda en el peso molecular esperado. También se realizaron WB de homogenizados celulares y de la proteína purificada. Esta proteína fue inyectada en conejos y se recogió los sueros una vez al mes por 3 meses.

VI. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en esta tesis están descritos en la siguiente tabla (Tabla 1), donde se indica: la proteína que detecta, la función o localización subcelular de esta proteína, la especie huésped del anticuerpo, el número de catálogo del anticuerpo, la compañía que lo produce, la técnica en que se utilizó y la dilución de trabajo.

Tabla 1- Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Función/Marcador	Especie	N° Catálogo	Compañía	Técnica	Dilución
EEA1	Vesícula endocítica temprana	Mouse	610457	BD Biosciences	WB	1:2000
Actina	Citoesqueleto	Mouse	A5441	Sigma	WB	1:1000
Aldolasa C	Enzima glicolítica	Goat	SC 12065	Santa Cruz	WB	1:200
GluA1	Subunidad R-AMPA	Mouse	PC 246	Millipore	WB	1:1000
GluA2	Subunidad R-AMPA	Rabbit	AB1768-I	Millipore	WB	1:1000
GluA2	Subunidad R-AMPA	Rabbit	AB1768-I	Millipore	IP	2 µg
GluN1	Subunidad R-NMDA	Mouse	556308	BD Biosciences	WB	1:1000
GluN1	Subunidad R-NMDA	Mouse	556308	BD Biosciences	IP	2 µg
GluN1	Subunidad R-NMDA	Rabbit	AB9864	Millipore	IF	1:1000
GluN2A	Subunidad R-NMDA/DPS	Mouse	MAB5216	Millipore	WB	1:1000
GluN2A	Subunidad R-NMDA/DPS	Rabbit	14596	Abcam	IF	1:100
GluN2B	Subunidad R-NMDA	Mouse	610417	BD Biosciences	WB	1:1000
GluN2B	Subunidad R-NMDA	Rabbit	AGC-003	Alomone	IF	1:200
GM130	Aparato de Golgi	Mouse	AB1299	Abcam	WB	1:2000
Na+K+ATPasa	Membrana Celular	Rabbit	07-674	Millipore	WB	1:1000
Rab5A	Endosoma temprano	Rabbit	SC 309	Santa Cruz	WB	1:500
Sinaptofisina	Vesícula sináptica	Mouse	611880	BD Biosciences	WB	1:2500
SNAP25	SNARE/Vesículas	Rabbit	AB5666	Abcam	WB	1:1000
Thy-1	Balsas lipídicas	Mouse	MAB1406	Millipore	WB	1:1000
TrkB	Receptor para BDNF	Mouse	610102	BD Biosciences	WB	1:1000
TrkB	Receptor para BDNF	Goat	SC-12-G	Santa Cruz	IF	1:100
pTrkB Y817	TrkB activado	Rabbit	2149-1	EPITOMICS	WB	1:1000
pTrkB Y817	TrkB activado	Rabbit	2149-1	EPITOMICS	IF	1:500
pTrkB Y817	TrkB activado	Rabbit	2149-1	EPITOMICS	ME	1:1000
TrkBic	Región intracelular de TrkB	Rabbit	-----	LIN-Magdeburg	WB	1:1000
TrkBic	Región intracelular de TrkB	Rabbit	-----	LIN-Magdeburg	IP	5 µg

Tabla 1. Resumen de los anticuerpos utilizados en esta tesis. Se describe la proteína que detecta el anticuerpo, su función y/o a que estructura subcelular está asociada dicha proteína. Además se indica la especie huésped, el número de catálogo, la compañía que produce el anticuerpo, la técnica en que se utilizó y la dilución de trabajo. WB: western blot, IP: inmunoprecipitación, IF: Inmunofluorescencia, ME: Microscopía electrónica. TrkBic fue generado en el transcurso de esta tesis, como se describe en el punto 5 de los métodos.

VII. Co-Inmunoprecipitación

Proteínas (250 mg por tubo) de las fracciones a precipitar se solubilizaron en 1 ml de tampón de solubilización (Tris-HCl 50 mM, Desoxicolato de Sodio 1%, pH 9,0) y se incubaron por 2 horas a 4°C con agitación constante. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10.000 x g por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se descartó el precipitado. Al sobrenadante se le agregó el anticuerpo correspondiente (TrkB, GluA1 o GluN1) y se incubó toda la noche a 4°C con agitación constante (tubo A). Como control negativo se utilizó suero normal de conejo para TrkB y GluA1, y de ratón para GluN1. Por otro lado, se centrifugó 200 µl de esferas de proteína G-Sefarosa (Amersham Buchler, Braunschweig, Alemania) a 500 x g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las esferas se lavaron 2 veces con 1 ml de tampón de solubilización, centrifugando cada vez a 500 x g por 5 minutos, descartando el sobrenadante después de cada centrifugación. Al último precipitado se agregó 1 ml de tampón de solubilización con BSA 1%, se incubó por toda la noche a 4°C con agitación constante. Al día siguiente, las esferas se lavaron 2 veces y luego se agregó 200 µl de tampón de solubilización y se homogenizó suavemente (tubo B). Se agregó el contenido del tubo B sobre el tubo A y se incubó por 1 hora a 4°C con agitación constante. La mezcla se centrifugó a 500 x g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó 3 veces con 1 ml de tampón de solubilización, centrifugando cada vez a 500 x g por 5 minutos. Finalmente las esferas se resuspendieron en 60 µl de tampón de carga de electroforesis en condiciones

denaturantes, se hirvieron por 5 minutos para luego someter la muestra a SDS-PAGE.

VIII. Inmunoprecipitación magnética de vesículas

Proteínas (250 mg por tubo) de las fracciones a precipitar se solubilizaron en 1 ml de tampón iso-osmótico (Sacarosa 0,32 M, Hepes 50 mM pH 7,4), se le agregó el anticuerpo correspondiente (TrkBic, generado en esta tesis), y se incubó toda la noche a 4°C con agitación constante (tubo A). Como control negativo se utilizó suero normal de conejo. En paralelo se precipitó 200 µl de esferas magnéticas Dynabeads M-280 Sheep anti Rabbit IgG (Life Technologies, Darmstadt, Alemania) colocándolas en un magneto por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las esferas magnéticas se lavaron 2 veces con 1 ml de tampón iso-osmótico, colocándolas en el magneto por 5 minutos cada vez y descartando el sobrenadante. Luego del último lavado se agregó 1 ml de tampón iso-osmótico con BSA 1% y se incubó por toda la noche a 4°C con agitación constante (tubo B). Al día siguiente, las esferas se lavaron 2 veces y se mezcló el contenido de ambos tubos (A y B), incubando por 1 hora a 4°C con agitación constante. Las esferas magnéticas se colocaron en el magneto por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se lavaron 3 veces con 1 ml de tampón iso-osmótico, colocando el tubo en el magneto por 5 minutos cada vez. Para los experimentos de WB, las esferas magnéticas se resuspendieron en 60 µl de tampón de carga de electroforesis en condiciones denaturantes y se hirvieron por 5 minutos, para

luego someter la muestra a SDS-PAGE. Para los experimentos de microscopía electrónica las esferas magnéticas se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 5%.

IX. Western Blot

Las distintas muestras obtenidas se sometieron a SDS-PAGE (Laemmli, 1970), en geles lineales al 10% acrilamida/bisacrilamida y la electroforesis se realizó a 70 V durante 45 minutos, aumentando luego a 120 V. Para las muestras obtenidas a partir de gradientes se cargaron volúmenes iguales por carril, para comparar la cantidad de proteínas en cada fracción. Para todo el resto de los experimentos cada carril fue cargado con igual cantidad de proteínas, lo que fue comprobado mediante geles teñidos con azul de Coomassie, los que fueron cuantificados por densitometría óptica utilizando el software Adobe Photoshop CS5 (Adobe Corporation), corrigiendo la carga de cada carril comparando con uno de ellos.

La transferencia de proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) se realizó a 350 mA durante 90 minutos. Luego de la transferencia, las membranas se bloquearon con PBS (Tampón fosfato salino) - 5% leche descremada por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Las membranas se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS para retirar el exceso de leche y se incubaron toda la noche con agitación constante con los distintos anticuerpos a utilizar. Al siguiente día, las membranas se lavaron 3 veces con PBS 0,1% Tween por 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo

secundario correspondiente al anticuerpo primario, en una dilución 1/5.000 en PBS 0,1% Tween - 5% leche descremada, por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 2 veces con PBS 0,1% Tween por 10 minutos y una vez con PBS. Para finalizar, las membranas se incuban 1 minuto con el reactivo quimioluminiscente (ECL, Amersham Bioscience) y luego se expone la película (Hyperfilm ECL, Amersham Bioscience).

X. Espectrometría de masas

1. P3-1

Las muestras de P3-1 se analizaron por electroforesis bidimensional, para lo cual las muestras se homogenizaron en tampón de lisis (Urea 9 M, Thiourea 2 M, CHAPS (3-[(3-colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato) 4%, Triton X-100 0,5%, Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), DTT (ditiotreitól) 64 mM), se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y se centrifugaron a 20.000 x g por 1 hora, descartando el sedimento no solubilizado. Se usaron 600 µg en un volumen de 400 µl para geles SDS-PAGE que posteriormente se tiñeron con tinción de plata, y se utilizó 1 mg en 400 µl para geles SDS-PAGE que se tiñeron con azul de Coomassie, agregando 2 µl de tampón IPG (Gradiente inmovilizada de pH) del 3-10 no lineal. Las muestras se cargaron en tiras IPG (Immobiline 18cm DryStrip 3-10NL; GE Healthcare, Freiburg, Alemania). Las tiras se rehidrataron a 30 Volts (V) por 12 horas. La focalización se logró incrementando el voltaje hasta 8.000 V. Después de la focalización las tiras se guardaron a -80°C. Para la segunda dimensión en geles SDS-PAGE, las tiras se equilibraron primero en urea 6M,

SDS 2%, DTT 1%, glicerol 30%, Tris-HCl 50mM, pH8,8; por 15 minutos, y luego por 15 minutos en el mismo tampón pero conteniendo iodoacetamida 2,5% en vez de DTT. El SDS-PAGE se corrió toda la noche a 20°C y a 80 V, en una cámara Hoefer DALT (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) usando geles al 12%. Para la cuantificación de los niveles relativos de proteínas se usó tinción de plata. Para recortar las manchas o proteínas cuyos niveles cambiaban entre ambas situaciones experimentales, se utilizaron los geles teñidos con azul de Coomassie. Para ello, se recortaron las manchas correspondientes y se analizaron en el espectrómetro de masas, utilizando la técnica de desionización por láser en matriz absorbida (MALDI) en un equipo Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer con óptica TOF/TOF™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). La identificación de los péptidos se realizó en base a su relación masa/carga (m/z) y el espectro de masas fue analizado utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science) en la base de datos UniProt (Li et al., 2004, Smalla et al., 2008, Sandoval et al., 2013). Para confirmar los resultados obtenidos, se seleccionaron las proteínas que obtuvieron un puntaje de probabilidad en MASCOT mayor a 95% y que cumplieran con que el peso molecular y punto isoeléctrico observado experimentalmente estuviese en concordancia respecto al teórico. Esto último nos permitió definir la identidad de las proteínas cuando la búsqueda en la base de datos nos entregó más de una posibilidad. La electroforesis bidimensional se realizó en el Laboratorio de Técnicas Especiales de Biología Molecular, del Leibniz Institute for Neurobiology, Magdeburgo, Alemania. La EM se realizó en el Departamento de Neurobiología

Molecular y Celular del Instituto de Investigación en Neurociencias, Facultad de Ciencias de la Tierra y la Vida, Universidad de Vrije, Ámsterdam, Holanda.

2. Balsas lipídicas

Las fracciones enriquecidas en balsas lipídicas, obtenidas desde P3-1, se analizaron directamente por EM (Figura 3), para lo cual se diluyó 4 veces en tampón MBS (NaCl 50 mM, ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato 25 mM, pH 6,5) y se centrifugó a $166.000 \times g$ por 2 horas a 4°C . El precipitado se resuspendió en 100 μl de Na_2CO_3 200 mM, pH 11 y se incubó 2 horas en hielo. Luego se agregó un agente reductor (DTT 5 mM), se incubó 1 hora a temperatura ambiente, y se agregó un agente alquilante (Iodoacetamida 15 mM) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Las muestras fueron digeridas con 2,5 μg de Tripsina (Trypsin Gold, Promega) a 37°C o con 5 μg de Glu-C (Promega) a temperatura ambiente, toda la noche.

Posteriormente, las muestras se sometieron a un isoelectroenfoque que permitió separar los péptidos digeridos según su carga. Para esto se utilizó tiras de gel de 24 cm y de un rango de pH del 3 al 11. El protocolo de isoelectroenfoque es: 12 horas a 500 volt (V), 3 horas a 1.000 V, 3 horas a 2.000 V, 3 horas a 3.000 V, 10 horas a voltaje creciente (3.000 a 5.000 V), 10 horas a voltaje creciente (5.000 a 8.000 V) y 40 horas a 8.000 V. Las tiras de gel se cortaron en 8 partes iguales y se extrajeron los péptidos con 200 μl de NH_4HCO_3 25 mM, se sonicó 3 veces en hielo y los luego las muestras fueron deshidratadas en Speed Vac

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Las muestras se resuspendieron en 20 µl de ácido trifluoroacético 0,1%, y se purificaron utilizando puntas ZIP-TIP-C₁₈, para luego ser inyectadas en el HPLC (Ultimate 3000 nano-HPLC, Dionex, Alemania), y a través de una interface nano-spray ser analizadas en el espectrómetro de masas, configurado para el análisis de péptidos trípticos (Esquire HCTultra ETDII-Iontrap mass spectrometer, Bruker, Alemania)(Kahne et al., 2012).

El espectro de masas obtenido fue analizado utilizando el motor de búsqueda MASCOT en la base de datos UniProt (Li et al., 2004). La lista de proteínas obtenidas se filtró en base al criterio de probabilidad del motor de búsqueda MASCOT (>95%), y luego se compararon las proteínas presentes en ambas condiciones experimentales. La EM se realizó en el Centro de Medicina Interna, Instituto para Medicina Interna Experimental, Universidad Otto von Guericke, Magdeburgo, Alemania.

Fig. 3 Preparación de muestras de balsas lipídicas para espectrometría de masas

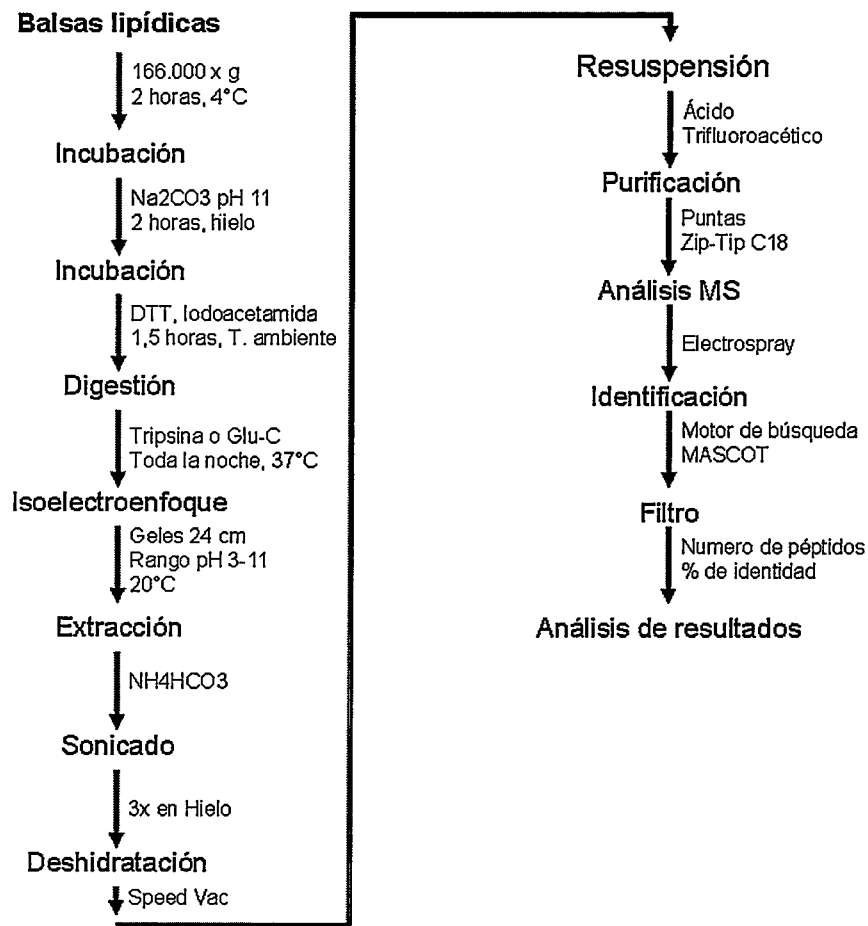


Figura 3. Esquema de preparación de balsas lipídicas para EM. Las muestras de balsas lipídicas obtenidas de ratas control y tratadas con fluoxetina se analizaron directamente en el espectrómetro de masas. Para esto, las muestras se alcalinizaron y redujeron antes de digerir las proteínas, para optimizar el corte proteolítico realizado con las enzimas tripsina y/o Glu-C. Los péptidos obtenidos se separaron en gel según su punto isoeléctrico, para analizar los péptidos de manera fraccionada y obtener mayor información de las proteínas presentes en la muestra. La identificación de las proteínas se realizó utilizando el motor de búsqueda MASCOT, para finalmente filtrar los resultados en base al número de péptidos obtenidos para cada proteína, y el porcentaje de cobertura de estos péptidos en la secuencia de las proteínas identificadas.

XI. Inmunofluorescencia.

Se utilizaron neuronas corticales de 14 días *in vitro* (DIV), las que fueron preparadas en el Instituto Leibniz para Neurobiología. Las células se fijaron en PFA al 4% por 15 minutos, se lavó tres veces por 5 minutos con PBS y luego se incubaron por 30 minutos en solución de bloqueo que contenía 5% albumina de suero bovino (BSA) y 0,1% Triton X-100. Luego de lavar tres veces con PBS, se incubaron las células con los anticuerpos primarios correspondientes por 2 horas, para luego lavar tres veces con PBS e incubar por 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes. Las imágenes fueron obtenidas usando un objetivo de inmersión en aceite (HCXAPO 63X/1.40 NA) acoplado a un microscopio confocal Leica TCS SP5. Las fotos fueron deconvulsionadas utilizando el programa ImageJ (National Institute of Health, MA, USA) para luego analizar la co-distribución de las proteínas utilizando el programa IMaris (Bitplane AG, Zurich, Suiza) para calcular los coeficientes de Manders (Manders et al., 1993).

XII. Microscopía electrónica

Se utilizó las vesículas inmunoprecipitadas magnéticamente y fijadas en PFA al 5%. Una fracción de estas vesículas fue primero incubada para inmunogold y luego observada en el microscopio, mientras que la otra fracción fue observada directamente en el microscopio electrónico.

La incubación para inmunogold consistió en incubar por toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente, para luego lavar tres veces con tampón sacarosa 0,32 M, Hepes 50 mM pH 7,4. Luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, unido a partículas de oro, para luego lavar tres veces con el mismo tampón.

Ambas fracciones fueron post-fijadas en OsO₄ al 1%, deshidratadas en etanol y embebidas en resina Lowicryl HM20 por 48 horas, para luego ser cortadas en secciones ultradelgadas y examinadas bajo el microscopio electrónico (912; Carl Zeiss, Inc.) equipado con filtro espectroscópico (Omega Optical) y con una cámara asociada (2K; Gatan), operado 80 kV.

Resultados

I. TrkB y pTrkB se localizan en una fracción enriquecida en membranas intracelulares

Para identificar la fracción subcelular enriquecida en TrkB y pTrkB, se realizó un fraccionamiento subcelular a partir de telencéfalo (es decir, corteza e hipocampo) de rata. Las fracciones que se obtuvieron fueron las siguientes: Homogenizado celular (H), Fracción cruda de membranas (P2), Fracción de membranas solubles (S3), Fracción microsomal (P3), Fracción sinaptosomal (Sin), Fracción de membranas sinápticas (MS), y Densidades postsinápticas (DPS).

Las fracciones subcelulares obtenidas fueron caracterizadas por WB utilizando una batería de anticuerpos primarios que se consideran marcadores de compartimentos subcelulares (Tabla 1 en los métodos, Figura 4) y se eligió la fracción P3 para continuar con los estudios, dado que se encuentran en ella marcadores de membranas intracelulares como EEA1 (marcador de vesícula endocítica temprana), SNAP-25 (proteína de fusión de membranas de la familia SNARE), Rab5A (marcador de vesícula endocítica temprana), GM130 (marcador de aparato de Golgi) y el receptor TrkB y pTrkB.

Fig. 4 Caracterización del fraccionamiento subcelular

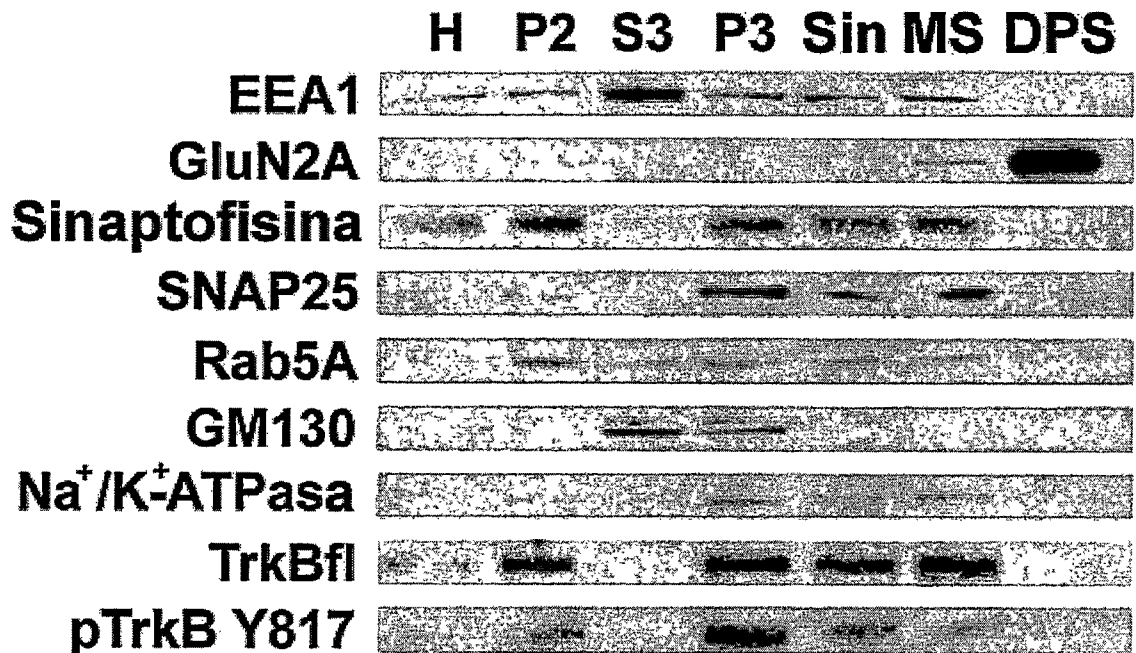


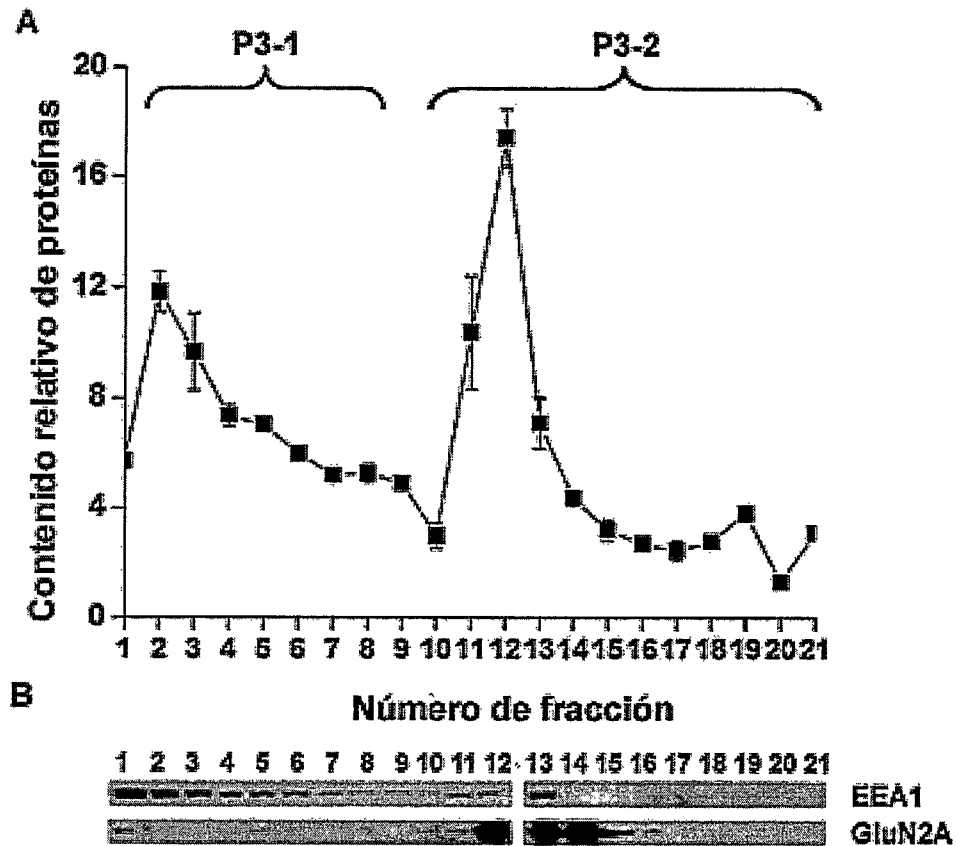
Figura 4. La fracción microsomal P3 contiene marcadores de membranas intracelulares. Western blots representativos muestran la abundancia relativa de EEA1 (marcador de vesícula endocítica temprana), GluN2A (subunidad del receptor de NMDA, marcador de DPS), sinaptofisina (marcador de vesículas sinápticas), SNAP25 (proteína de fusión de membranas de la familia SNARE), Rab5A (marcador de vesícula endocítica temprana), GM130 (marcador de aparato de Golgi), Na⁺/K⁺-ATPasa (marcador de membrana celular), TrkBfl (receptor para la neurotrofina BDNF, de largo completo), pTrkB Y817 (receptor para la neurotrofina BDNF, fosforilado en la tirosina 817). Las fracciones subcelulares son: H: homogenizado, P2: fracción cruda de membranas, S3: fracción soluble, P3: fracción microsomal, Sin: sinaptosomas, MS: membranas sinápticas, DPS: densidad postsináptica. Cada carril fue cargado con 20 µg de proteína.

Si bien la fracción P3 está enriquecida en membranas intracelulares, se trata de una población heterogénea que además sigue presentando proteínas marcadoras para membrana celular, como Na^+/K^+ -ATPasa y GluN2A. Para mejorar la separación de los componentes, sub-fraccionamos P3 mediante un gradiente de velocidad, agregando así el criterio de separar vesículas por tamaño, aparte del ya usado en las centrifugaciones diferenciales en que se separa por densidad. La propuesta es que las vesículas de tráfico intracelulares son en promedio de menor tamaño comparadas con vesículas reselladas de membranas celulares (Taupin et al., 1994, Takei et al., 1996, Gylys et al., 2004). Como se observa en la Figura 5A, se obtuvieron dos picos de proteínas: P3-1 con vesículas de menor tamaño y P3-2 con vesículas de mayor tamaño. Estas fracciones fueron caracterizadas con el marcador de vesículas EEA1 y el marcador para membrana celular GluN2A (Figura 5B). Luego se procedió a juntar las fracciones que correspondían al primer (1-8) y segundo (9-21) pico de proteínas, y se utilizó los mismos marcadores proteicos mediante los cuales se caracterizó P3 en la Figura 4 (Figura 5C), distinguiéndose claramente que P3-1 se enriquecía en marcadores asociados a membranas intracelulares y en TrkB y pTrkB, lo que se cuantificó para luego graficar la razón de cambio P3-2 / P3-1 (n=3, Figura 5D).

Así, P3-1 está enriquecido en EEA1 y GM130 además de TrkB y su forma activada pTrkB. En cambio, P3-2 está enriquecido en la subunidad GluN2A del receptor de NMDA, proteína asociada principalmente a la membrana celular.

Finalmente, la proteína SNAP-25, que habíamos utilizado como marcador de membranas intracelulares, presenta un menor contenido relativo en la fracción P3-1, lo que se puede explicar por su función en la fusión de membranas.

Fig. 5 Caracterización del fraccionamiento de P3 en gradiente de velocidad



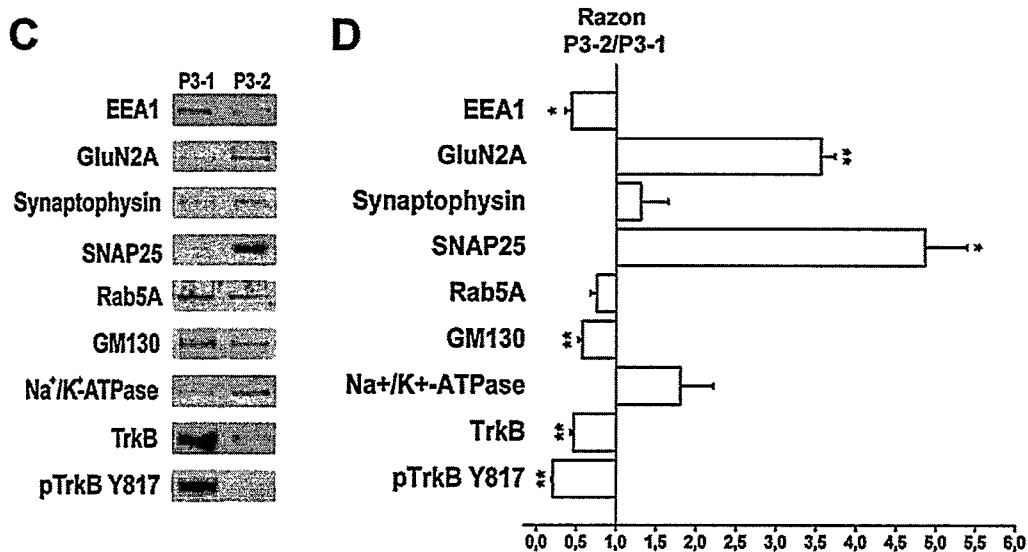


Figura 5. La fracción microsomal P3 puede ser separada en dos picos de proteínas, P3-1 y P3-2, mediante una gradiente de velocidad. A) Contenido relativo de proteínas totales en las fracciones 1 a 21 obtenidas de la gradiente (n=3). B) Las fracciones fueron caracterizadas con marcadores de proteínas subcelulares. Western blot representativos para EEA1 y GluN2A obtenidos al cargar volúmenes iguales de las fracciones recolectadas. C) Las fracciones 1 a 8 y 9 a 21 se juntaron para formar P3-1 y P3-2, y se caracterizaron con marcadores de compartimientos subcelulares. En este caso, cada carril fue cargado con 20 µg de proteína. D) Gráfico de la razón de cambio para cada marcador de compartimientos subcelulares en la fracción P3-2 v/s P3-1. * p<0,05, ** p<0,01, n=3.

Una vez que se determinó que la fracción P3-1 contiene gran proporción del TrkB y TrkB activado intracelular, se quiso evaluar si el contenido o las proteínas de señalización asociadas a esta fracción cambiaban con el tratamiento repetitivo con fluoxetina. Para realizar este análisis global, se recurrió a técnicas proteómicas.

II. Identificación, mediante espectrometría de masas, de las proteínas diferencialmente contenidas en P3-1 después de tratamiento con fluoxetina

Al comparar los niveles de proteínas en P3-1 luego del tratamiento con fluoxetina o salino, podríamos obtener información respecto a proteínas reguladas por el tratamiento, potencialmente asociadas a activación de vías intracelulares dependientes de TrkB o a mecanismos implicados en su endocitosis.

Para esto, se separó las proteínas contenidas en P3-1 mediante electroforesis bidimensional (n=6 por condición) seguido de tinción de plata, para luego evaluar los cambios en densidad óptica de cada mancha, lo que refleja los niveles relativos de una proteína en la muestra, cargada en cantidades iguales por gel. Se obtuvo así un gel maestro con un patrón de proteínas característico, en que cada mancha puede ser identificada. Las manchas/proteínas que presentaron cambios significativos luego del tratamiento fueron cortadas (Figura 6A) y analizadas por EM, como se describe en los métodos.

En la Figura 6B se presenta un gráfico con las proteínas identificadas por EM, ordenadas según su razón de cambio con respecto a la situación control, desde el mayor aumento a la mayor disminución. Se observa en este gráfico que la proteína que más cambió fue la fructosa bifosfatasa aldolasa C (ALDOC), que cambió más de 7 veces su contenido luego del tratamiento. Esta proteína, expresada principalmente en astrocitos del cerebro anterior (Ahn et al., 1994) y células de Purkinje en el cerebelo (Kumanishi et al., 1985), es una enzima de la

vía glicolítica que cataliza la reacción de fructosa-1,6-bisfosfato a dos triosas, dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. Este resultado generó nuevas líneas de investigación en el laboratorio y es parte de un manuscrito recientemente publicado (Sandoval et al., 2013), que fue completado por otro integrante del laboratorio, ya que se alejaba de los objetivos de esta tesis.

Fig. 6 Espectrometría de masas (EM) de P3-1 luego del tratamiento repetitivo con fluoxetina por 2 semanas

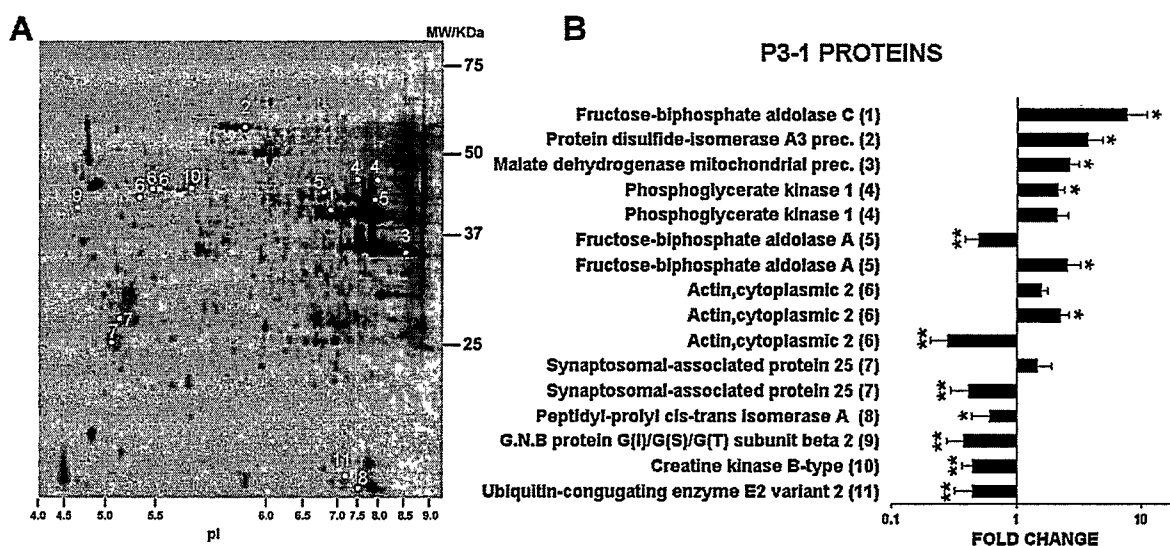


Figura 6. A) Gel bidimensional teñido con azul de Coomassie donde se cargó 1 mg de proteínas de la fracción P3-1. Cada mancha corresponde a una proteína focalizada según su peso molecular y punto isoeléctrico, y se detectaron alrededor de 360 manchas por gel. Se cuantificó los cambios utilizando el programa PDQuest en n=6 geles por condición, cargados con muestras de preparaciones independientes. Se encontró 37 manchas que cambiaron, las que fueron cortadas del gel e identificadas por EM. Sólo 16 puntos, que corresponden a 11 proteínas distintas fueron correctamente identificadas (Peso molecular y Punto isoeléctrico) B) Las proteínas que cambiaron su contenido luego del tratamiento con fluoxetina fueron numeradas y ordenadas desde el mayor aumento a la mayor disminución con respecto a la condición control. Las proteínas que aparecen repetidas corresponden a distintas isoformas o a distintas modificaciones post-traduccionales de la misma proteína. * p<0,05, ** p<0,01.

De las demás proteínas encontradas, 5 correspondieron a proteínas involucradas en el metabolismo celular, 3 proteínas involucradas en vías de señalización celular, 2 proteínas con participación en el plegamiento de proteínas y otra proteína con función estructural en citoesqueleto (Tabla2). A continuación se describe la función de cada una de las proteínas encontradas:

Metabolismo

- Creatina quinasa tipo B (CKB): Cataliza la reacción de fosforilación de creatina a fosfocreatina, utilizando una molécula de ATP (Dzeja and Terzic, 2003).

Glicólisis

- Fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1): Cataliza la transferencia de un grupo fosforilo del 1,3-difosfoglicerato al ADP, para formar 3-fosfoglicerato y ATP (Varga et al., 2009).
- Fructosa bifosfatasa aldolasa A (ALDOA): Cataliza la reacción de fructosa-1,6-bisfosfato a dos triosas, dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, principalmente en neuronas (Lorentzen et al., 2005).
- Fructosa bifosfatasa aldolasa C (ALDOC): Cataliza la reacción de fructosa-1,6-bisfosfato a dos triosas, dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato, principalmente en astrocitos y neuronas de Purkinje. Además se han descrito funciones no canónicas para esta enzima, dentro de las que

se encuentran regular la morfología celular al interactuar con el citoesqueleto (Kusakabe et al., 1997, Volker and Knull, 1997, Kao et al., 1999); modificar la distribución de vesículas ácidas dentro de la célula (Merkulova et al., 2011) o regular los niveles de calcio intracelulares por su capacidad de unión a inositol trifosfato (I(1,4,5)P3) (Baron et al., 1998). Por otro lado, se descubrió que ALDOC es una nucleasa dependiente de zinc que degrada los transcritos que codifican para los neurofilamentos de cadena liviana (NF-L), componente del citoesqueleto neuronal (Stefanizzi and Canete-Soler, 2007). La sola expresión de aldolasa C en neuronas resulta en una importante baja en el contenido proteico de NF-L. Para degradar este transcrito, ALDOC debe unir una secuencia específica de 68 nucleótidos presente en el mRNA de NF-L, abriendo la interesante posibilidad de que ALDOC sea una proteína de unión a otros RNAs.

Ciclo de Krebs

- Precursor mitocondrial de malato deshidrogenasa, (MDH2): Esta enzima cataliza la conversión de malato a oxaloacetato, en el ciclo de Krebs (Minarik et al., 2002).

Transducción de señales

- Proteína de unión a nucleótidos guanina, subunidad beta (GNB2): Las proteínas heterotriméricas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G), que integran las señales entre receptores y proteínas efectoras, se

componen de subunidades alfa, beta y gamma, donde las subunidades beta y gamma presentan actividad GTPasa y son importantes reguladores de la subunidad alfa, que contiene el dominio de unión al nucleótido (Downes and Gautam, 1999).

- Proteína asociada a sinaptosomas de 25 KDa (SNAP25): Encargada del anclaje y fusión de vesículas sinápticas a la membrana celular (Matteoli et al., 2009). Involucrada en la exocitosis de neurotransmisores y de receptores tipo NMDA (Lau et al., 2010, Tomasoni et al., 2013).
- Enzima Ubiquitina-conjugante E2 variante 2 (UBE2V2): Cataliza la formación de cadenas no canónicas de poli-ubiquitina que no llevan a degradación por el proteosoma. Está relacionada a la activación de factores de transcripción (Li et al., 2007).

Plegamiento de proteínas

- Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A (PPIA): Cataliza la interconversion de enlaces cis a enlaces trans en residuos de prolina, acelerando el plegamiento de proteínas (Arckens et al., 2003).
- Precursor de la proteína disulfuro isomerasa A3 (PDIA3): Cataliza la isomerización de puentes disulfuro, regulando el correcto plegamiento de glicoproteínas (Gilbert, 1997).

Citoesqueleto

- Actina citoplasmática 2 (ACTG1): Componente estructural del citoesqueleto celular (Pollard and Cooper, 2009).

Es importante destacar el cambio observado en actina, proteína que generalmente se usa como control de carga, en análisis por WB de variados modelos experimentales. El tratamiento con fluoxetina induce un remodelamiento de la morfología sináptica (Ampuero et al., 2010), que requiere de plasticidad a nivel de citoesqueleto, lo que podría explicar los cambios observados en el contenido de actina.

Tabla 2 - Proteínas reguladas en la fracción P3-1 luego del tratamiento repetitivo con fluoxetina por dos semanas

Table 1 Regulated proteins in P3-1 fraction of rat cortex after fluoxetine treatment

Spot no.	Protein Name	Entry name SwissProt	Protein score (CI%)	Peptide count	Ratio Flx/Sal	t-test (p =)	Cellular function
1	Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC_RAT	100	15	7.62	0.045	1
2	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	PDIA3_RAT	100	25	3.43	0.049	2
3	Melate dehydrogenase, mitochondrial precursor	MDHM_RAT	99.99	2	2.62	0.016	1
4	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_RAT	100	5	1.74/1.80	0.059/0.012	1
5	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_RAT	99.99	10	0.49/2.53	0.004/0.047	1
6	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	ACTG_RAT	100	16	1.46/2.23/0.28	0.034/0.013/0.0004	3
7	Synaplosomal-associated protein 25 (SNAP-25)	SNP25_RAT	100	5	1.46/0.41	0.1835/0.0032	2
8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_RAT	100	8	1.16	0.042	4
9	Guanine nucleotide-binding protein G(1)/G(S)/G(T) subunit beta 2	GBB2_RAT	99.79	3	0.70/0.38	0.171/0.002	2
10	Creatine kinase B-type	KCRB_RAT	100	3	0.44	0.0008	1
11	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	UB2V2_RAT	99.97	2	0.44	0.005	2

(1)Energy metabolism, (2) Signaling pathways, (3) Cytoskeleton, (4) Other. Abbreviations: Flx, Fluoxetine; MW, molecular weight; pI, Isoelectric points; Sal, Saline.

Tabla 2. Proteínas de la fracción P3-1 identificadas por EM. Se indica el nombre de las proteínas, el código de acceso en la base de datos SwissProt, el porcentaje de identidad del péptido obtenido con respecto a la proteína identificada, número de péptidos que se obtuvo para cada proteína identificada, razón de cambio de las proteínas identificadas luego del tratamiento con el antidepresivo, significancia estadística para cada razón de cambio obtenida y número asociado a la función celular de cada proteína identificada. Funciones celulares: (1) Metabolismo energético, (2) Vías de señalización, (3) Componente de citoesqueleto y (4) Otras funciones celulares.

Posteriormente se procedió a comprobar algunos de los cambios en el contenido de las proteínas observados por EM. Para esto se realizaron WB comparando muestras de P3-1 obtenidas de ratas control y tratadas con fluoxetina por 2 semanas (Figura 7). Se observó que los cambios se condicen con los obtenidos por EM para actina gama, aldolasa C y SNAP25, aunque la magnitud de estos cambios fue menor a lo observado por EM. Esto puede deberse a la presencia de distintas isoformas de estas proteínas, que por EM son identificadas de manera independiente, pero por WB son detectadas en conjunto (Thompson et al., 1982, Ahmad et al., 2012).

Fig. 7 - Validación por WB de los resultados obtenidos por espectrometría de masas

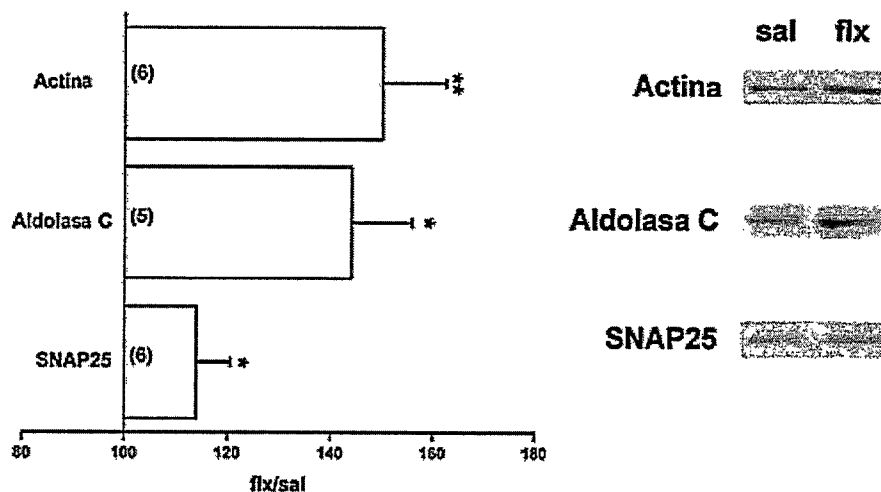


Figura 7. Algunas de las proteínas en la que se observó un cambio por geles bidimensionales luego del tratamiento con fluoxetina fueron analizadas por WB de P3-1. A la izquierda se muestra un gráfico de los resultados cuantificados y a la derecha un WB representativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Al realizar un análisis computacional utilizando el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Thomas and Bonchev, 2010) con las proteínas encontradas, se identifican interacciones entre ellas en base a la literatura. Ello permite generar redes de interacción entre ellas y propuestas sobre vías o redes implicadas en los cambios observados (Sandoval et al., 2013). La red de interacciones que arrojó este análisis se ilustra en la Figura 8. Al incluir TrkB en el listado de proteínas que alimenta el programa, se sugirió una interacción directa con la proteína SNAP25. Es posible entonces que los cambios en SNAP25 se puedan asociar funcionalmente con TrkB en vesículas de tráfico presentes en P3-1 con destino a las sinapsis excitadoras, conteniendo por ejemplo componentes sinápticos. Además, sugiere que las proteínas identificadas pueden ser potencialmente reguladas por la familia de péptidos de la insulina, compuesta por insulina, factor de crecimiento tipo insulina (IGF) 1 y 2, relaxina 1, 2 y 3, y hormona tipo insulina (INSL) 3, 4, 5 y 6 (Fernandez and Torres-Aleman, 2012).

Fig. 8 - Red de interacciones de las proteínas de P3-1 que cambiaron sus niveles luego del tratamiento con fluoxetina

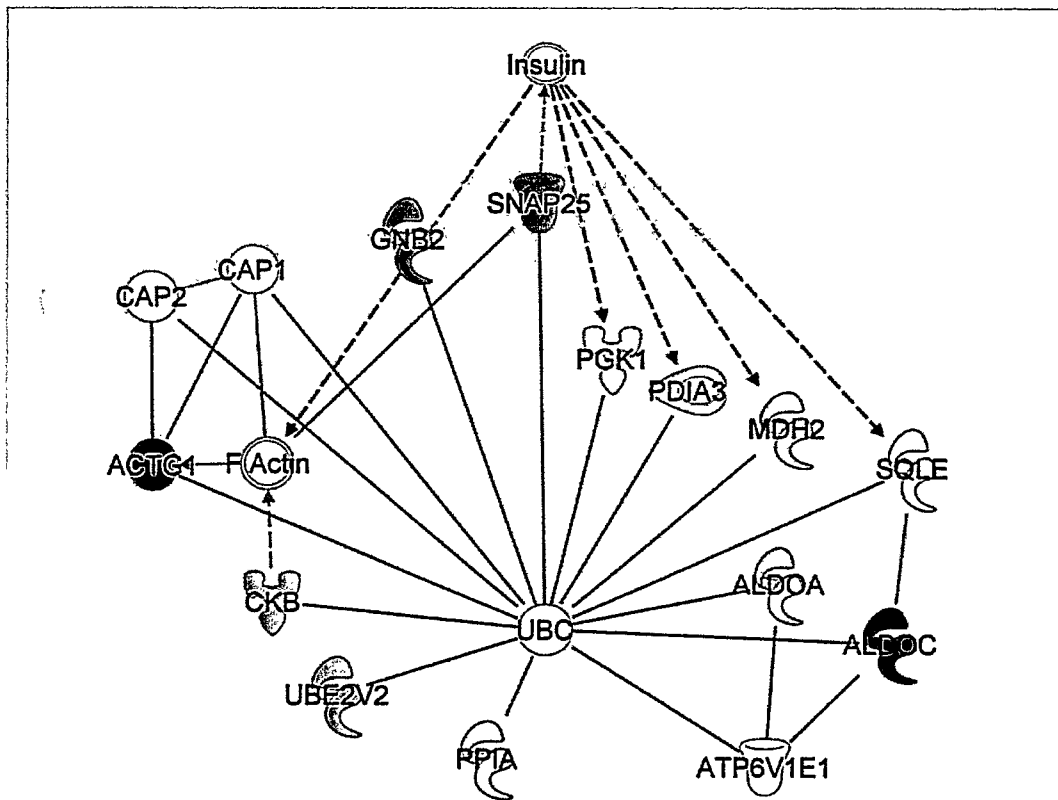


Figura 8. Mediante IPA (Ingenuity Systems Pathway Analysis) se realizó un análisis de las interacciones publicadas entre las proteínas obtenidas por el análisis de EM. Cada proteína recibió un símbolo que refleja su función (1 compuesto químico, 6 enzimas en general, 1 peptidasa, 1 proteína estructural, 2 quinasas, 1 receptor, 1 regulador transcripcional y 2 transportadores) Las tonalidades de rojo indican mayor (rojo intenso) o menor (rosado) aumento en el contenido, mientras que las tonalidades de verde indican una mayor (verde intenso) o menor (verde claro) disminución en el contenido de las proteínas. Los símbolos blancos representan proteínas o compuestos químicos agregados por el programa para generar la red de interacciones.

Líneas continuas: Interacciones proteína-proteína, Flechas con línea continua: Interacción proteína-proteína y cambios en los niveles de expresión, Flechas con línea punteada: Cambios en los niveles de expresión. Abreviaciones: **ACTG1**: Actina citoplasmática 2, **ALDOA**: Fructosa bifosfatasa aldolasa A, **ALDOC**: Fructosa bifosfatasa aldolasa C, **ATP6V1E1**: ATPasa transportadora lisosomal de H^+ de 31 kDa E1 subunidad V1, **CAP1**: Proteína asociada a adenilato ciclasa 1, **CAP2**: Proteína asociada a adenilato ciclasa 2, **CKB**: Creatina quinasa tipo

Actina filamentosa, **GNB2**: Proteína de unión a nucleótidos guanina, subunidad beta (GGB2), **Insulin**: Proteínas de la familia de la insulina, **MDH2**: Precursor mitocondrial de malato deshidrogenasa, **PDIA3**: Precursor de la proteína disulfuro isomerasa A3, **PGK1**: Fosfoglicerato quinasa 1, **PPIA**: Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A, **SNAP25**: Proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa, **SQLE**: Esqualeno epoxidasa, **UBC**: Ubiquitina C, **UBE2V2**: Enzima Ubiquitina-conjugante E2 variante 2.

La estrategia experimental utilizada (electroforesis bidimensional) estaba enfocada en identificar proteínas citosólicas involucradas en la señalización dependiente del complejo BDNF/TrkB en respuesta al tratamiento con fluoxetina.

Para validar la activación del receptor TrkB en P3-1 después del tratamiento con fluoxetina, analizamos su contenido por WB. En la Figura 9A se muestra la distribución de TrkB y TrkB activado (pTrkB Y817, TrkB fosforilado en el residuo de tirosina 816) en P3-1 y P3-2, observándose una redistribución de TrkB hacia P3-1 luego del tratamiento con fluoxetina, mientras pTrkB sólo pudo ser detectado en P3-1 en cualquiera de las condiciones. Al juntar todas las fracciones correspondientes a P3-1 se observó un cambio en el contenido de TrkB y pTrkB, que aumentaron en $27 \pm 9\%$ y $48 \pm 19\%$ respectivamente (Figura 9B). Esto nos indica que el tratamiento con fluoxetina induce una activación y desplazamiento del receptor TrkB en membranas intracelulares P3-1.

Fig. 9 - Niveles de TrkB y TrkB fosforilado (Y817) en P3-1 luego del tratamiento con fluoxetina

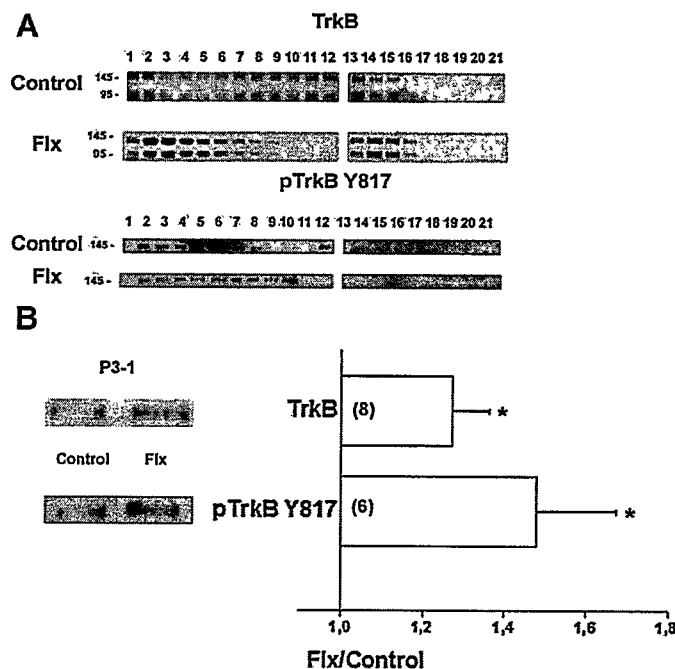


Figura 9. pTrkB Y817 aumenta en la fracción P3-1 luego del tratamiento con fluoxetina. A) WB representativos de un fraccionamiento de P3, de muestras obtenidas de ratas control y tratadas con flx, donde se muestra la distribución de TrkB y pTrkB Y817. B) WB representativos del contenido de TrkB y pTrkB Y817 en muestras de P3-1, obtenidas de ratas control y tratadas con flx (Izquierda). A la derecha se muestra un gráfico de los resultados cuantificados. * $p < 0,05$.

El enriquecimiento de TrkB activado en P3-1 luego del tratamiento con fluoxetina refuerza la idea de la endocitosis de TrkB luego de su activación. Como se ha descrito, la localización intracelular de TrkB activado podría depender de balsas lipídicas, a las cuales se podrían reclutar elementos de señalización y/o componentes de sinapsis glutamatérgicas (Suzuki et al., 2004, Pereira and Chao, 2007, Zheng et al., 2008). Por ello, se procedió a aislar balsas lipídicas a partir de la fracción P3-1 para identificar sus componentes.

III. Identificación, mediante espectrometría de masas, de las proteínas presentes en balsas lipídicas aisladas a partir de P3-1

Se purificaron balsas lipídicas a partir de la fracción P3-1. En la Figura 10A se presenta un gráfico del nivel relativo de proteínas obtenido en las fracciones de la gradiente de sacarosa. En estas fracciones de la gradiente, se detectó la presencia de TrkB, pTrkB Y817 y Thy-1 (Figura 10B), este último utilizado como marcador de balsas lipídicas, cargando para ello volúmenes iguales de cada fracción en un gel para electroforesis en condiciones denaturantes. Se puede apreciar que en la fracción 6 que corresponde a la interfase de sacarosa al 30 y 5%, están las balsas lipídicas. En esa fracción también se pudo detectar TrkB y pTrkB Y817 (Figura 10C), indicando que fuimos capaces de obtener una fracción enriquecida en balsas lipídicas a partir de una fracción subcelular rica en membranas intracelulares, y que detectamos la presencia de TrkB y pTrkB en ella.

Fig. 10 - Caracterización de balsas lipídicas obtenidas a partir de P3-1

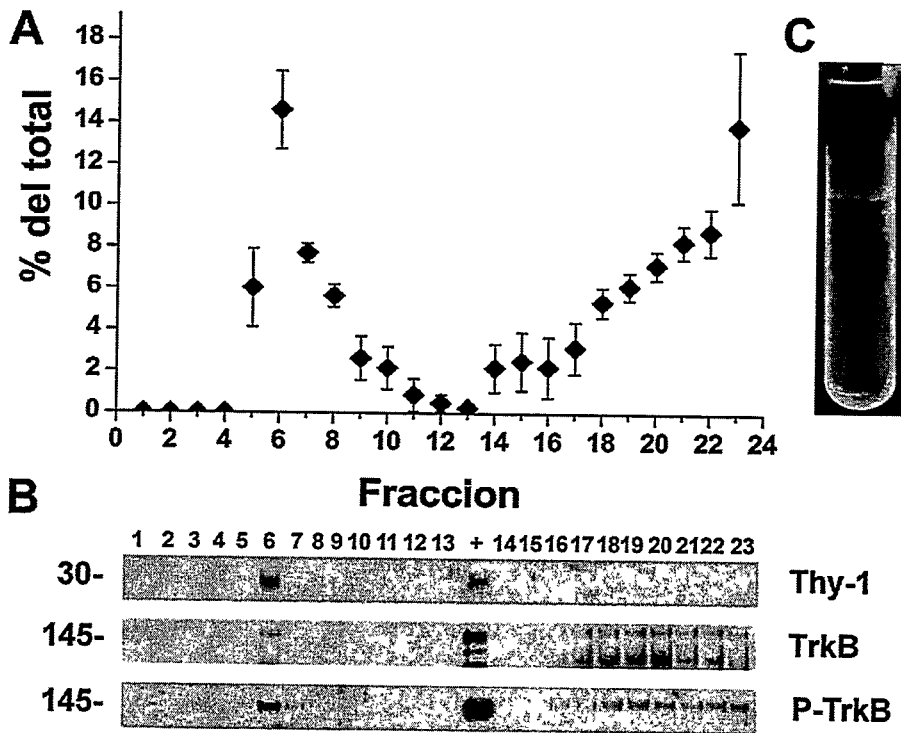


Figura 10. TrkB y pTrkB Y817 están contenidos en balsas lipídicas obtenidas a partir de P3-1. A) Perfil de proteínas, graficando el porcentaje de cada fracción con respecto al total de proteínas obtenidas (n=3). B) WB representativos de Thy-1, TrkB y pTrkB Y817. Los carriles corresponden al número de fracción mientras + indica el control positivo, que corresponde a P3-1. La imagen corresponde a 2 geles unidos entre el control positivo y la fracción 14. C) Imagen de una gradiente representativa, donde se observan las interfaces (40-30% y 30-5%).

En esta fracción realizamos un análisis por EM, para identificar posibles candidatos proteicos que co-localizan intracelularmente con TrkB en balsas lipídicas. Se utilizó una estrategia de EM complementaria a la realizada para analizar P3-1, que nos permitió identificar un gran número de las proteínas contenidas en la muestra, incluyendo las de peso molecular mayor a 100 kDa y

proteínas transmembrana. La limitación de la estrategia utilizada por nosotros es que no se pueden cuantificar proteínas ni comparar sus niveles en ambas condiciones experimentales.

El número de proteínas identificadas superó por mucho nuestras expectativas (cerca de 1000), dificultando el análisis de los resultados. El listado completo de proteínas encontradas en ambas condiciones experimentales se presenta en el Anexo 2. Entre ellas, se encuentra TrkB, además de Thy-1 y flotilina, ambos marcadores de balsas lipídicas. Esto nos confirma por esta metodología que las muestras contenían balsas lipídicas y que hay TrkB asociado a ellas.

En la Figura 11 se presenta un gráfico (Figura 11A) que describe los resultados obtenidos en base a las funciones celulares de las proteínas identificadas, tablas de la frecuencia identificación y porcentajes de las proteínas en base a su función (Figura 11B) y en relación con su localización subcelular (Figura 11C). Además se muestra un análisis de Venn (Figura 11D), donde se comparan los resultados obtenidos por nosotros con los publicados en Foster et al., 2003 (Foster et al., 2003) y Suzuki et al., 2011 (Suzuki et al., 2011), destacando el aporte de nuestro estudio al conocimiento de la composición de las balsas lipídicas. En el estudio de Foster et al., se analizó los componentes proteicos de balsas lipídicas aisladas desde membranas de células HeLa, utilizando la técnica de marcación SILAC (marcación con isótopos estables utilizando aminoácidos en cultivo celular, (Ong et al., 2002)), seguido de un

análisis por EM (LC/MS/MS). En el estudio realizado por Suzuki et al. se purificaron balsas lipídicas a partir de sinaptosomas obtenidas desde telencéfalo de ratas (Wistar), para luego separarlas por SDS-PAGE y analizar las proteínas obtenidas por EM (LC/MS/MS). Al comparar nuestro trabajo con estos dos estudios, encontramos 5 proteínas presentes en los tres análisis (5'-nucleotidasa, cadena pesada de clatrina, flotilina 2, HSP-70 proteína 8 y fosfofructoquinasa), destacando flotilina como marcador de balsas lipídicas y la cadena pesada de clatrina, proteína involucrada en mecanismos de endocitosis. El número de proteínas que se encontró en común al comparar el trabajo realizado en sinaptosomas (Suzuki et al., 2011) y nuestro trabajo fue de 28 proteínas (Anexo 3). En esta comparación destaca la presencia de diversas proteínas con funciones asociadas al sistema nervioso central, a diferencia de en la comparación con el trabajo realizado en células HeLa (31 proteínas, Anexo 4) donde se encontraron principalmente proteínas con una distribución y función heterogéneas. Esto nos estaría indicando que la composición de las balsas lipídicas es diferencial y está influida por el tipo celular desde las cuales son aisladas.



Fig. 11 - Análisis de las proteínas obtenidas por espectrometría de masas de las balsas lipídicas de P3-1

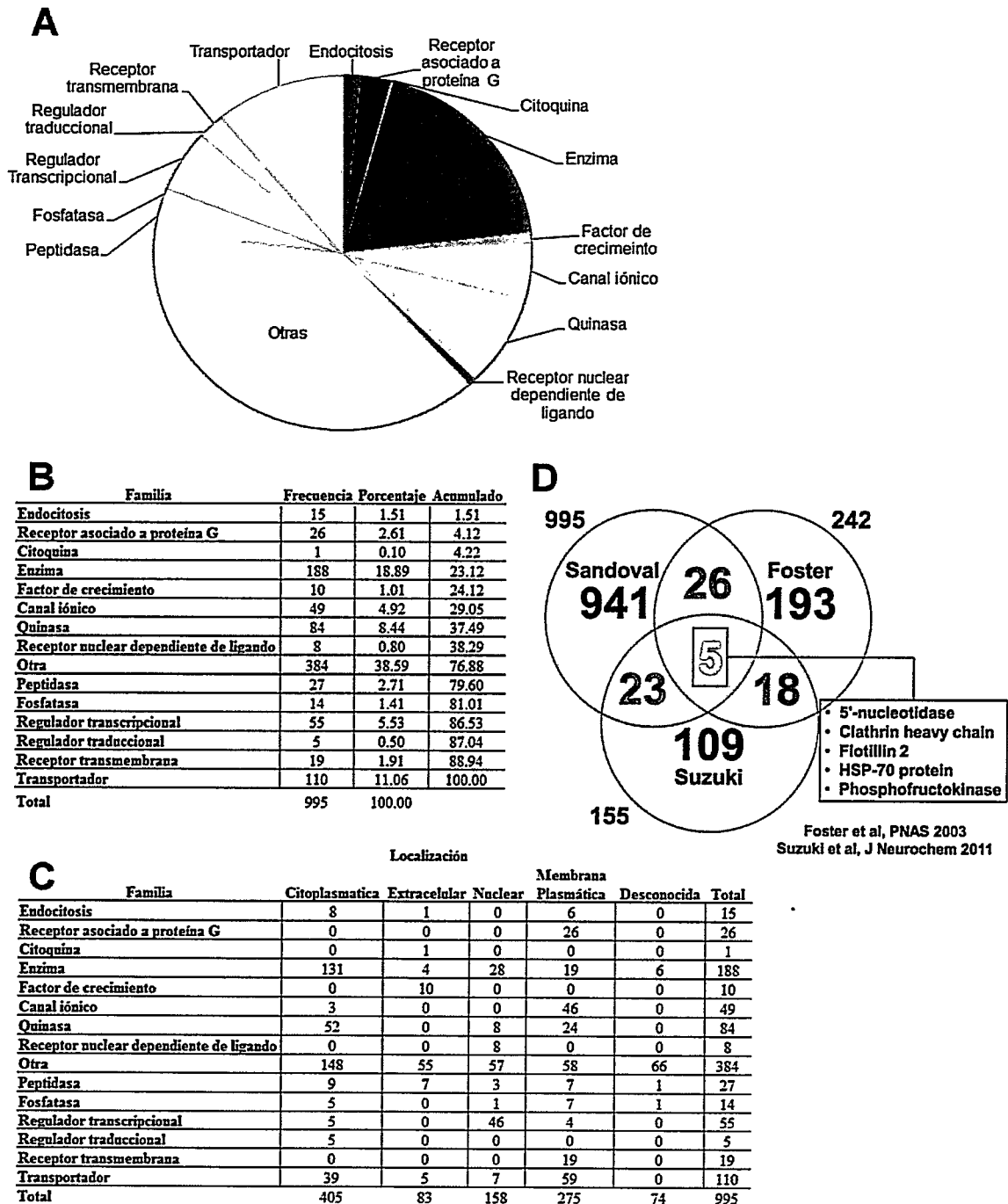


Figura 11. Distribución por función de las proteínas obtenidas por EM de las balsas lipídicas de P3-1. A) Las proteínas identificadas se agruparon según su función celular. Se muestran los porcentajes de cada grupo funcional con respecto al total de proteínas. B) Tabla de frecuencia y porcentajes de las proteínas obtenidas en las balsas lipídicas, de acuerdo a sus funciones descritas. C) Tabla de localización subcelular de cada grupo funcional. D) Diagrama de Venn en que se comparan las proteínas obtenidas en este trabajo con lo publicado en dos trabajos sobre balsas lipídicas analizadas por EM (Foster et al., 2003, Suzuki et al., 2011). El subconjunto Sandoval se refiere a nuestros resultados.

Entre de las proteínas que se identificaron en la EM de las balsas, nos interesan las proteínas relacionadas a sinapsis excitadoras. Dentro de las principales proteínas que encontramos están:

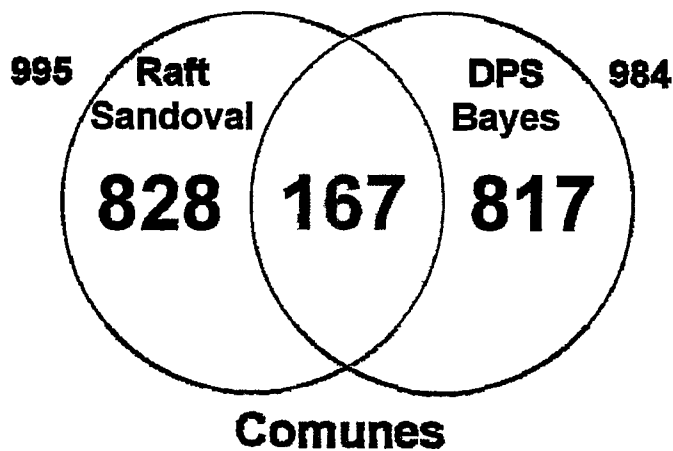
- Subunidades de receptores para L-glutamato
 - R-mGlu: GluR1, GluR5, GluR8.
 - R-AMPA: GluD1.
 - R-KA: GluK4.
 - R-NMDA: GluN1, GluN2A, GluN2D, GluN3A.
- Proteínas de andamio
 - PSD-93, Shank 1, Shank 2, Shank 3, Homer 2, GRIP-2, MAGI-2.
- Proteínas de citoesqueleto
 - Relacionadas a actina: Arpc1A, actina beta, actina gama, actinina 1 alfa, dinamina 1, dinamina 3, factor 1 de unión de actina con microtubulos, sinaptopodina, xin-beta.
 - Relacionadas a tubulina: MAP1-A, MAP1-B, MAP-2, MAP-6, proteína Tau, Mark1, Mark2.

- Otras: proteína 1 de interacción con CASK
- Proteínas de la transducción sináptica
 - Shc-2, neuexina 1, neuexina 2, neuexina 3, kalirin, fosfolipasa C gama, subunidad regulatoria alfa de PI3 quinasa, subunidad regulatoria beta de PI3 quinasa, proteína tipo fosfolipasa C inactiva, fosfolipasa D2, proteína quinasa C beta, proteína quinasa C gama, proteína quinasa C zeta, proteína quinasa D (proteína quinasa C tipo mu), GEF-H1
- Motores moleculares
 - Relacionadas a dineína: cadena pesada 1 de dineína axónica, cadena pesada 7 de dineína axónica, cadena pesada 12 de dineína axónica, cadena pesada 1 de dineína citoplasmática, cadena liviana intermedia 2 de dineína citoplasmática, Dinactina 4.
 - Relacionadas a miosina: Miosina IE, miosina VA, miosina VB, miosina IX, miosina XVI, cadena pesada 3 de miosina, cadena pesada 4 de miosina, cadena pesada 7 de miosina, cadena pesada 9 de miosina, proteína de interacción a miosina Rho fosfatasa.
 - Relacionados a kinesina: Kinesina 1B, kinesina 5A, Kinesina 5B, Kinesina 15, Kinesina 27.

Para verificar cuáles de las proteínas encontradas en nuestro análisis estaban descritas en la literatura como componentes de sinápsis excitadoras, decidimos realizar una comparación con las proteínas descritas como

componentes de la DPS. Como se observa en la Figura 12, encontramos 167 proteínas en común, lo que refuerza la idea de que nuestra fracción de balsas lipídicas intracelulares contiene proteínas de sinapsis excitadoras que pueden estar viajando desde y hacia la membrana plasmática, pues son identificables en nuestra fracción intracelular.

Fig. 12 - Comparación entre las proteínas obtenidas desde balsas lipídicas de P3-1 y proteínas que componen la densidad postsináptica (DPS)



Bayes et al, PloS One 2012

Figura 12. Diagrama de Venn entre las proteínas obtenidas desde las balsas lipídicas de P3-1 por espectrometría de masas y proteínas que componen la densidad postsináptica (DPS). Para este análisis se utilizó todas las proteínas obtenidas por EM (control y fluoxetina) y una base de datos de proteínas contenidas en la DPS (Bayes et al., 2012).

Considerando esta gran proporción de proteínas de sinápsis excitadoras identificada en nuestra fracción, sumado a que estábamos en la búsqueda de una relación entre la señalización mediada por TrkB, decidimos alimentar el programa IPA con un subconjunto de proteínas seleccionado en base a su presencia en este tipo de sinapsis. En este análisis se encontraron propuestas que sugieren fuertemente una relación entre subunidades de receptores para L-glutamato y TrkB, y específicamente con GluN2A (Figura 13). Esta sugerencia, sumada a antecedentes previos del laboratorio que indicaban un aumento en los niveles de GluN2A en neuronas piramidales y en homogenizados de telencéfalo luego del tratamiento con fluoxetina, podría significar que fluoxetina estimula el transporte de GluN2A hacia las sinapsis.

Fig. 13 - Modelo propuesto de interacciones entre TrkB y receptores para L-glutamato

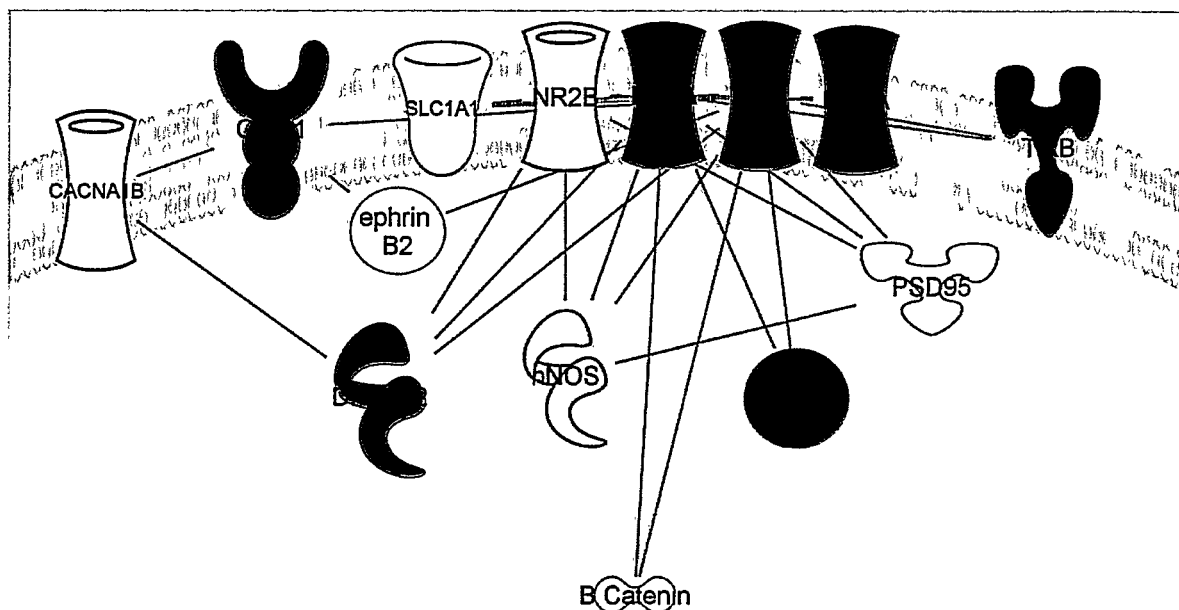


Figura 13. Mediante IPA (Ingenuity Systems Pathway Analysis) se realizó un análisis de las interacciones publicadas entre los receptores para L-glutamato obtenidos por el análisis de EM y TrkB. Cada proteína recibió un símbolo que refleja su función (5 canales iónicos, 1 receptor asociado a proteína G, 1 receptor tirosina quinasa, 1 transportador de membrana, 1 proteína andamio, 1 proteína estructural, 3 enzimas y 1 regulador transcripcional). En azul están las proteínas obtenidas por el análisis de EM. Los símbolos blancos representan proteínas agregados por el programa para generar la red de interacciones. Líneas continuas: Interacciones proteína-proteína. Abreviaciones: **CACNA1B**: Canal de calcio dependiente de voltaje tipo N, subunidad alfa-1B, **B catenin**: Beta catenina, **DPYSL2**: Proteína relacionada a dihidropirimidinasa 2, **ephrin B2**: Ephrin B2, **GluR1**: Subunidad mGluR1 del R-mGlu (metabotrópico), **Homer**: Homer 2, **nNOS**: Óxido nítrico sintasa neuronal, **NR1**: Subunidad GluN1 del R-NMDA, **NR2A**: Subunidad GluN2A del R-NMDA, **NR2B**: Subunidad GluN2B del R-NMDA, **NR3A**: Subunidad GluN3A del R-NMDA, **PSD95**: Proteína de 95 kDa de la densidad postsináptica, **SLC1A1**: Transportador de aminoácidos excitadores 3, **TrkB**: Receptor para BDNF.

Por ello, se cuantificó mediante WB los niveles de la subunidad GluN2A en homogenizado, P3 y balsas lipídicas luego del tratamiento con flx (Figuras 14 y 15). En homogenizado (Figura 14A) se observó aumentos significativos para las subunidades GluN1 y GluN2A ($p < 0,01$), pero no para GluN2B. Al evaluar los cambios en P3 para estas subunidades, se observó un aumento en la subunidad GluN2A ($p < 0,05$) y una disminución en la subunidad GluN2B ($p < 0,01$), mientras la subunidad GluN1 no cambió.

Para las balsas lipídicas se juntaron las fracciones de la gradiente positivas para TrkB, pTrkB y Thy-1 (fracción balsas), y se comparó con las fracciones negativas para marcadores de balsas lipídicas (fracción no-balsas). En la figura 15 se muestran WB representativos de estas fracciones, donde se evaluaron los niveles de TrkB, pTrkB, y las subunidades GluN2A y GluN2B del R-NMDA y Thy-1. Se puede observar que se detecta TrkB y pTrkB en ambas fracciones (Balsas y no-Balsas), a diferencia de la subunidad GluN2A, que está sólo presente en la fracción balsas, tanto en muestras control como tratadas con fluoxetina. La subunidad GluN2B en cambio no fue detectada en la fracción balsas, sólo en la fracción no-balsas, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos en la EM donde no se pudo detectar dicha subunidad. Esto nos muestra que los receptores de NMDA presentes en balsas lipídicas estarían principalmente compuestos por la subunidad GluN2A, indicando una distribución subcelular diferencial con la subunidad GluN2B. Además, al cuantificar los cambios observados en la fracción balsas luego del tratamiento con fluoxetina, se observó

un aumento significativo de TrkB, pTrkB y GluN2A (veces sobre control: $2,16 \pm 0,22$; $1,75 \pm 0,16$; $1,65 \pm 0,08$; respectivamente, $n=3$, $p < 0,05$ para los tres), lo que podría indicar que la localización de estas proteínas es regulada en conjunto por el tratamiento.

Fig. 14 - Análisis de las proteínas presentes en fracciones de homogenizado y P3 de muestras control y tratadas con fluoxetina

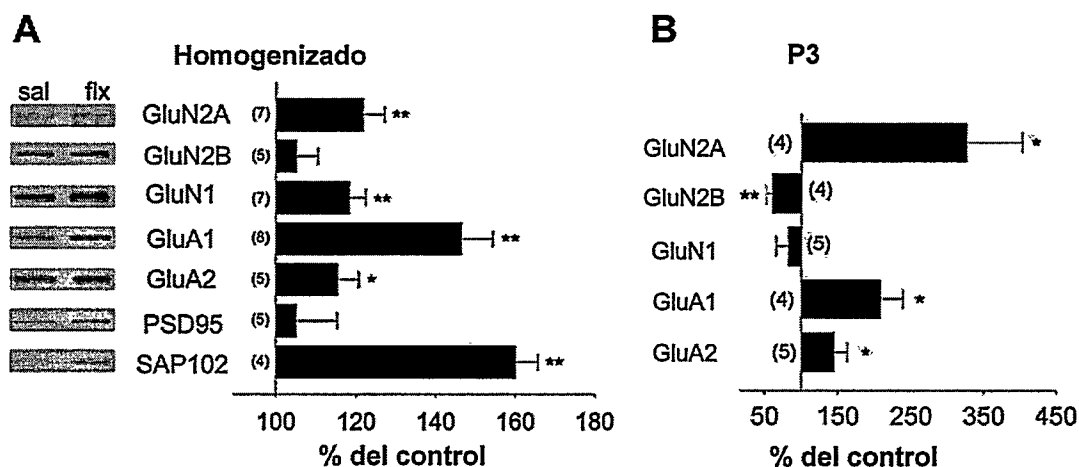


Figura 14. Comparación en homogenizado y P3 después del tratamiento con fluoxetina. A) Cuantificación de los cambios respecto al control en homogenizado de las subunidades de los receptores de NMDA (GluN2A, GluN2B, GluN1) y AMPA (GluA1, GluA2), además de las proteínas andamio PSD95 y SAP102. A la izquierda se muestra un WB representativo y a la derecha los resultados graficados, donde se indica el número de experimentos para cada proteína. B) Cuantificación de los cambios respecto al control en P3 de las subunidades de los receptores NMDA (GluN2A, GluN2B, GluN1) y AMPA (GluA1, GluA2). En el gráfico se indica el número de experimentos para cada proteína. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fig. 15 - Análisis de las proteínas presentes en fracciones de balsas lipídicas de muestras control y tratadas con fluoxetina

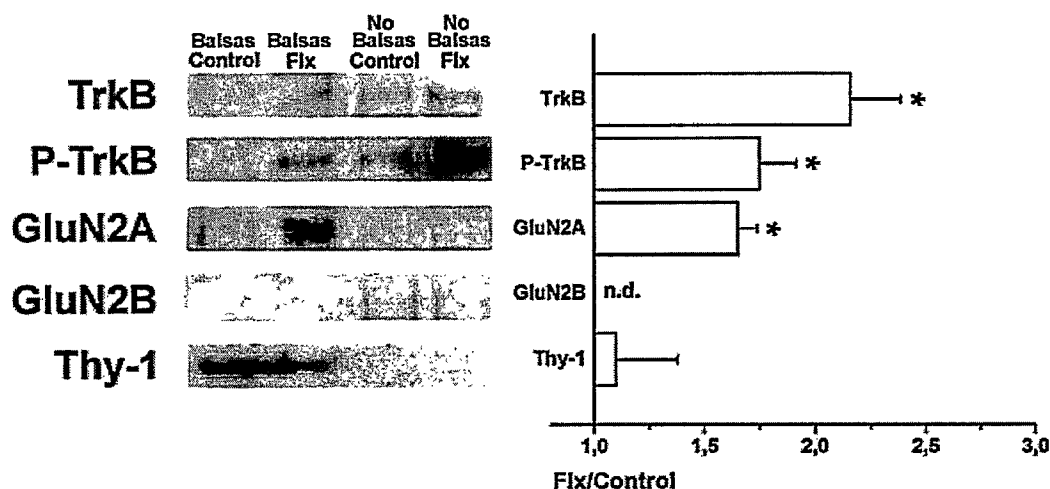


Figura 15. Comparación de niveles de proteínas específicas en balsas lipídicas después del tratamiento con fluoxetina. Las fracciones de las gradientes de balsas positivas para Thy1 se juntaron, para comparar con una fracción negativa para Thy1 (4 últimas fracciones de la gradiente). A la izquierda se muestra un WB donde se reveló contra TrkB, pTrkB (Y817), las subunidades GluN2A y GluN2B del receptor de NMDA, y la proteína marcadora de balsas lipídicas Thy-1. El orden de los carriles es: Fracción con balsas lipídicas obtenidas de ratas control (Balsas control), fracción con balsas lipídicas obtenidas de ratas tratadas con fluoxetina (Balsas Flx), fracción sin balsas lipídicas obtenida de ratas control (No-Balsas Control) y fracción sin balsas lipídicas obtenida de ratas tratadas con fluoxetina (No-Balsas Flx). Se comprobó que se cargara la misma cantidad de proteína por carril con un gel teñido con azul de Coomassie. A la derecha se muestra un gráfico con la cuantificación de la razón fluoxetina v/s control para la fracción de balsas lipídicas. n=3, * p<0,05

Con estos antecedentes, se decidió analizar los niveles de los receptores sinápticos utilizando co-inmunoprecipitaciones.

IV. Niveles de la subunidades de los receptores tipo NMDA y AMPA en sinapsis excitatorias luego del tratamiento repetitivo con fluoxetina

En primer lugar, analizamos el contenido de las subunidades de estos receptores en la DPS, fracción subcelular que representa bioquímicamente a los receptores sinápticos, para evaluar los cambios en su localización en respuesta al tratamiento con fluoxetina (Figura 16A). Encontramos un aumento significativo para las subunidades GluN2A ($p < 0,01$) y GluN1 ($p < 0,05$) del R-NMDA, mientras la subunidad GluN2B del mismo receptor no presentó cambios. Para las subunidades del R-AMPA encontramos una disminución significativa de la subunidad GluA1 ($p < 0,05$), mientras la subunidad GluA2 no presentó cambios.

Luego, realizamos una inmunoprecipitación de la subunidad GluN1, obligatoriamente presente en un receptor de NMDA funcional, desde la DPS, (Figura 16B superior) para detectar en el inmunoprecipitado los niveles de las subunidades GluN2A y GluN2B. Como se puede observar, encontramos un aumento estadísticamente significativo para GluN2A, que aumenta $4,5 \pm 0,88$ veces con respecto al control ($n=3$, $p < 0,05$), no así para GluN2B, donde no se detectó cambio. También se realizó la inmunoprecipitación de la subunidad GluA2 del receptor AMPA desde la DPS, para evaluar cómo respondía este receptor al tratamiento con fluoxetina (Figura 16B inferior). Encontramos que la subunidad GluA1 disminuye $0,62 \pm 0,11$ veces con respecto al control ($n=3$, $p < 0,05$), indicando que la subunidad GluA1 en el tetrámero es reemplazada, probablemente por GluA2. Estos experimentos nos indicaron que existe una

regulación por el tratamiento con fluoxetina sobre la composición de ambos tipos de receptores para L-glutamato. En relación al receptor tipo NMDA, el aumento de subunidades GluN2A junto con los datos de la EM y las redes IPA obtenidas sugieren fuertemente una relación funcional de receptores GluN1/GluN2A con TrkB o incluso una co-distribución en organelos intracelulares con destinación sináptica.

Fig. 16 - Localización sináptica de subunidades del receptor NMDA y AMPA

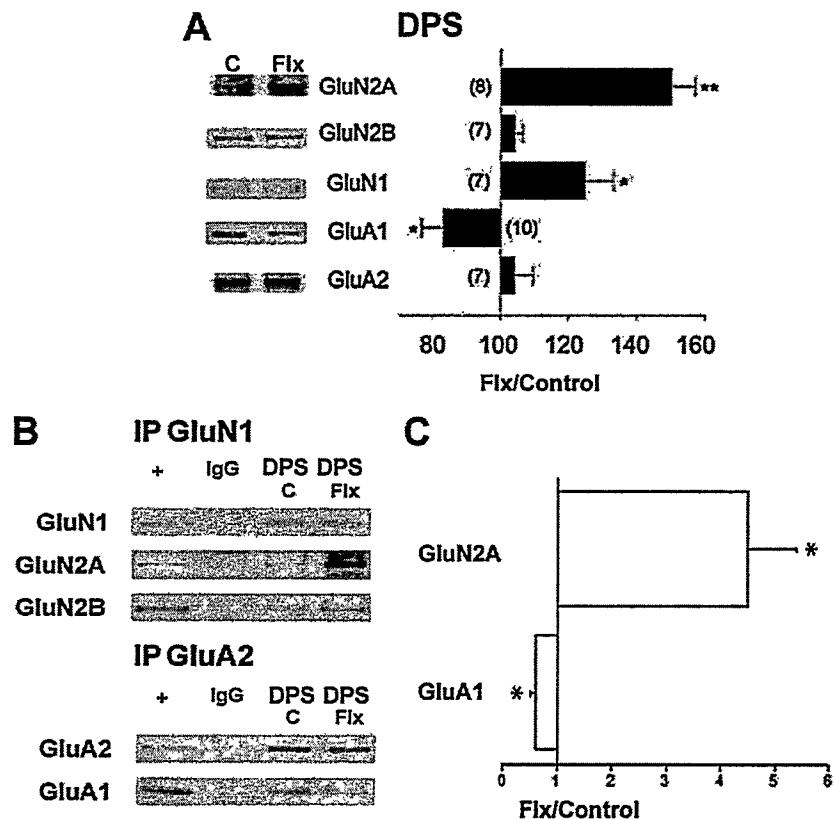


Figura 16. Se utilizaron DPS para mostrar los niveles relativos de las subunidades en situación control y después de tratamiento, y para evaluar la estequiometría de receptores mediante inmunoprecipitación. A) WB representativo de los cambios en el contenido de subunidades de los receptores tipo NMDA (GluN1, GluN2A y GluN2B) y AMPA (GluA1 yGluA2) en DPS, luego del tratamiento con fluoxetina. El orden de los carriles es: C: Control y Flx: Fluoxetina. A la izquierda

se muestra la cuantificación de los cambios observados. B) WB representativo de una inmunoprecipitación de la subunidad GluN1 del receptor de NMDA y de la subunidad GluA2 del receptor AMPA a partir de DPS. En el inmunoprecipitado de GluN1 se reveló contra las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B mientras que en el inmunoprecipitado de GluA2 se reveló contra GluA2 y GluA1 del receptor AMPA. El orden de los carriles es: +: Control positivo (DPS control), IgG: control negativo (inmunoprecipitación desde DPS control utilizando inmunoglobulina G), DPS C: inmunoprecipitación desde DPS control, DPS Fix: inmunoprecipitación desde DPS después de tratamiento con fluoxetina. Se comprobó que se cargara la misma cantidad de proteína por carril con un gel teñido con azul de Coomassie. C) Gráfico con la cuantificación de la razón fix v/s control para GluN2A y GluA1. n=3, * p<0,05.

Para evaluar esta última posibilidad, se realizaron experimentos de inmunopurificación de vesículas desde P3-1 portadoras de TrkB y estudios de co-localización en células.

V. TrkB co-distribuye con GluN2A y no con GluN2B en inmunoprecipitaciones

En primer lugar se generó un anticuerpo dirigido contra la región intracelular de TrkB, considerando que su dominio intracelular queda expuesta hacia el citoplasma en las vesículas que lo transporten. Para ello. En la Figura 17A se describen los partidores utilizados para subclonar el dominio intracelular de TrkB en un plasmidio de expresión, como está descrito en los métodos. La proteína de fusión obtenida, detectada por WB y por un gel teñido con azul de Coomassie (Figura 17B), se utilizó para generar el anticuerpo policlonal en conejos. El anticuerpo obtenido fue utilizado en WB (Figura 17C) y en inmunoprecipitaciones (Figura 17D), para comprobar su especificidad.

Fig. 17 - Generación de un anticuerpo policlonal contra el dominio intracelular de TrkB (TrkBic)

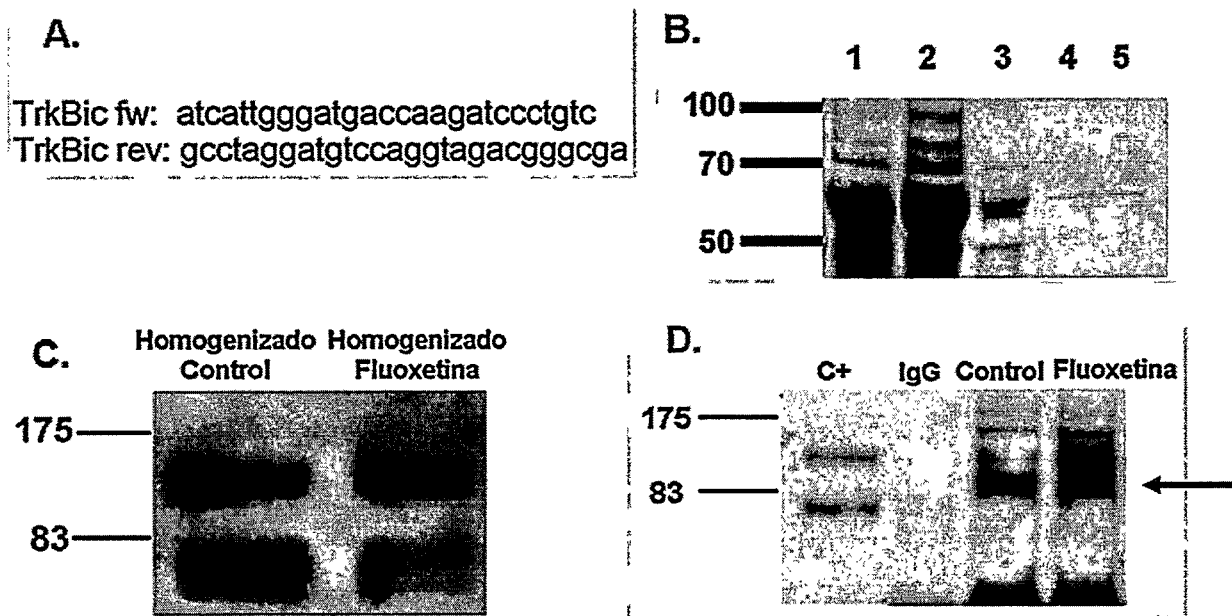


Figura 17. Generación de un anticuerpo específico que reconoce el dominio intracelular de TrkB. A) Secuencia de los partidores que se utilizaron para subclonar el dominio intracelular de TrkB en un vector pMAL c2, para obtener MBP-TrkBic. B) Bacterias BL-21 fueron transformadas con el plasmidio que contenía la secuencia de TrkBic, desde donde se purificó la proteína de fusión MBP-TrkBic, usando una matriz de amilosa y Maltosa para eluir. Se muestra un gel teñido con azul de Coomassie para comprobar la obtención de la proteína de fusión TrkBic-MBP, en los primeros 5 eluidos. C) WB de homogeneizado de cerebro revelado con anti-TrkBic, para una muestra control y una muestra tratada. D) WB de una inmunoprecipitación de TrkB a partir de la fracción P3, utilizando el anticuerpo anti-TrkBic y revelado con un anticuerpo comercial. Los carriles son: C+: Control positivo (P3 control), IgG: control negativo (inmunoprecipitación desde P3 control utilizando inmunoglobulina G), Control: inmunoprecipitación desde P3 obtenido de animales control, Fluoxetina: inmunoprecipitación desde P3 obtenido de animales tratados. Flecha: especie de peso molecular no descrito para TrkB, que solo se había observado en fracciones enriquecidas en DPS.

Con este anticuerpo, se realizó una inmunoprecipitación magnética desde la fracción P3-1 obtenida de ratas control, para comprobar la presencia de las

proteínas de interés (TrkB, pTrkB Y817, GluN1, GluN2A y GluN2B). Como se observa en la Figura 18A, se pudo detectar como posibles proteínas presentes en la misma vesícula portadora de TrkB, a las subunidades GluN1 y GluN2A del receptor de NMDA, no así la subunidad GluN2B. Esto, sumado a lo observado en la EM de las balsas lipídicas y a la posterior comprobación realizada por WB, donde se observó la presencia de la subunidad GluN2A en las balsas lipídicas, sugiere que fuertemente que TrkB y el receptor de NMDA en la conformación GluN1/GluN2A podrían estar contenidos en la misma vesícula intracelular, por ejemplo en un tipo de vesícula exocítica que contiene balsas lipídicas. Para comprobar que la fracción que fue inmunoprecipitada correspondía a una fracción de vesículas, se realizó un análisis por microscopía electrónica, que se presenta en la Figura 18B.

Fig. 18 - Inmunoprecipitación magnética de vesículas portadoras de TrkB a partir de P3-1 obtenido de animales control

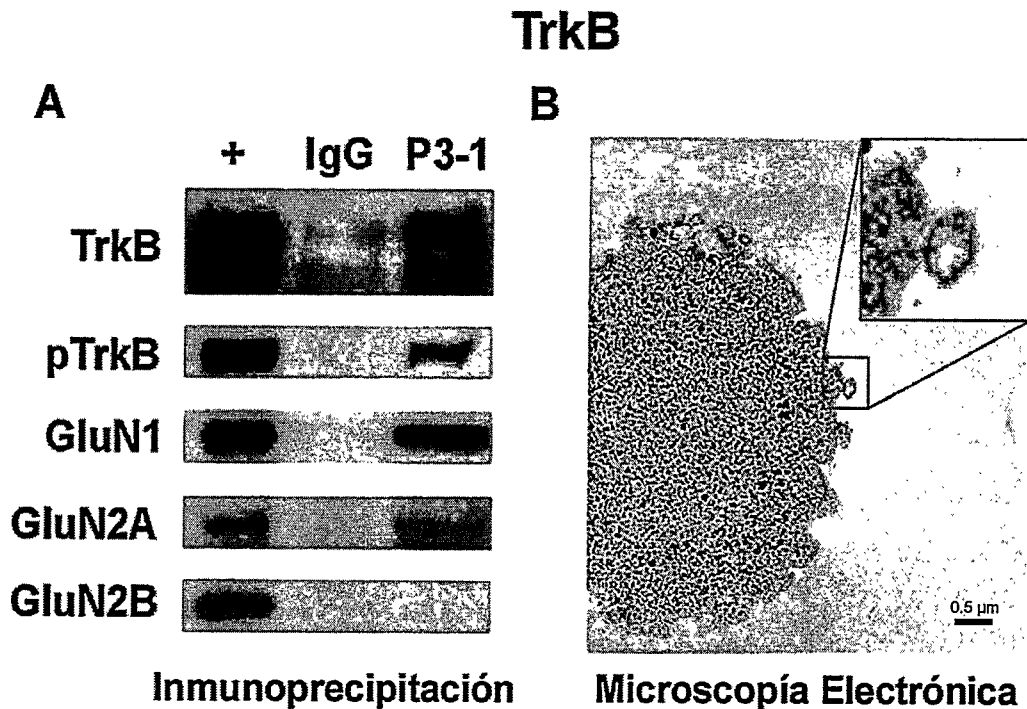


Figura 18. A) WB de una inmunoprecipitación magnética de vesículas portadoras de TrkB a partir de la fracción P3-1 obtenido desde animales control. Se reveló contra TrkB, pTrkB Y817 y las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B del R-NMDA. Los carriles son: +: Control positivo (P3-1 control), IgG: control negativo (inmunoprecipitación desde P3-1 control utilizando inmunoglobulina G), P3-1: inmunoprecipitación desde P3-1 control. Se comprobó que se cargara la misma cantidad de proteína por carril con un gel teñido con azul de Coomassie. B) Microscopía electrónica del material inmunoprecipitado con el anticuerpo contra TrkB a partir de la fracción P3-1 en las mismas condiciones que en A y luego fijada en paraformaldehído al 5%. Fotografía tomada a 20.000 X, se muestra un inserto para destacar una vesícula unida a la esfera magnética. Barra 0,5 μ m.

Una vez comprobado que se podía realizar esta inmunoprecipitación, se realizó desde muestras obtenidas de ratas control y ratas tratadas con fluoxetina, para evaluar posibles cambios en las proteínas que están presentes en la vesícula portadora de TrkB luego del tratamiento (Figura 19). En esta

inmunoprecipitación se observó nuevamente que la subunidad GluN2B del receptor de NMDA no está presente, tampoco después del tratamiento mientras que pTrkB y GluN2A aumentaron ($1,8\pm 0,12$ y $1,5\pm 0,04$ veces con respecto al control, respectivamente).

Fig. 19 - Inmunoprecipitación magnética de vesículas portadoras de TrkB a partir de P3-1 obtenido de animales control y tratados con fluoxetina

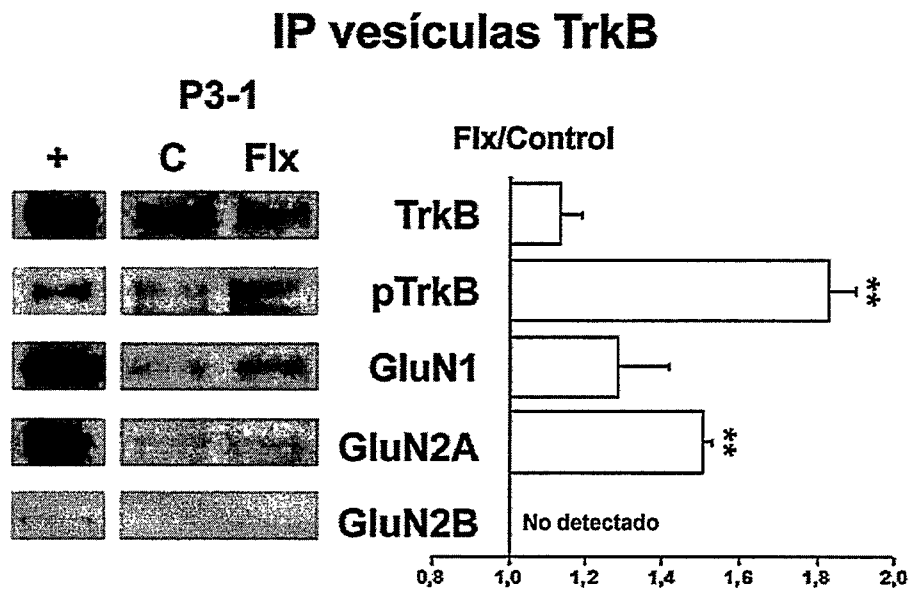


Figura 19. WB de una inmunoprecipitación (IP) de vesículas portadoras de TrkB a partir de la fracción P3-1 obtenida de animales control y después del tratamiento con fix. Se reveló contra TrkB, pTrkB Y817 y las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B del R-NMDA. Los carriles son: +: Control positivo (P3-1 control), C: inmunoprecipitación desde P3-1 obtenido de animales control, Flx: inmunoprecipitación desde P3-1 obtenido de animales tratados con fluoxetina. Se comprobó que se cargara la misma cantidad de proteína por carril con un gel previo teñido con azul de Coomassie. A la derecha se muestra un gráfico con la cuantificación de la razón flx v/s control para TrkB, pTrkB Y817, GluN1 y GluN2A. $n=3$, ** $p<0,01$. GluN2B no fue detectado.

VI. Co-distribución de TrkB y GluN2A en inmunofluorescencia y microscopía electrónica

Para comprobar si estas interacciones descritas ocurren realmente en el contexto de una vesícula intracelular, se están realizando análisis por inmunofluorescencia y microscopía electrónica. En la Figura 20 se presenta una inmunofluorescencia de TrkB y la subunidad GluN1 del R-NMDA en neuronas hipocampales, donde se observa co-distribución de ambas proteínas. Para evaluar si la co-distribución observada entre TrkB y el R-NMDA es diferencial dependiendo de la subunidad GluN2 que componga a este último receptor, se realizó la inmunofluorescencia contra las subunidades GluN2A (Figura 21) y GluN2B (Figura 22). Como se observa en las Figuras 21 y 22, se puede detectar co-distribución entre TrkB y GluN2A, no así con GluN2B, lo que está en pleno acuerdo con los resultados obtenidos por inmunoprecipitación. El grado de co-distribución se cuantificó calculando los coeficientes de Manders (Manders et al., 1993, Zinchuk et al., 2007, Zinchuk and Grossenbacher-Zinchuk, 2009), considerando que los experimentos corresponden a un solo cultivo neuronal.

Finalmente, estamos intentando realizar una co-inmuno-microscopía electrónica utilizando anticuerpos contra TrkB, pTrkB y GluN2A a partir vesículas inmunoprecipitadas desde P3-1, para comprobar que estas dos proteínas se encuentran compartiendo una misma estructura del tipo vesicular. En la Figura 23 se muestra una inmuno-microscopía electrónica para TrkB a partir de vesículas inmunoprecipitadas con esferas magnéticas, donde se pueden

observar las partículas de oro que están asociadas el anticuerpo secundario. Estas partículas de oro parecieran estar asociadas a algún tipo de estructura (por su cercanía), pero no fuimos capaces de visualizar ningún tipo de membrana por problemas técnicos como por ejemplo, disociación o pérdida de las membranas en el proceso de incubación con los anticuerpos.

Los experimentos de co-inmuno-microscopía electrónica se están realizando en colaboración con el Dr. Zuschratter y el Dr. Herrera en el Instituto Leibniz para Neurobiología, Magdeburg, Alemania, para completar la tercera publicación de los resultados obtenidos en esta tesis.

Fig. 20 - Inmunofluorescencia en neuronas hipocampales: TrkB-GluN1 en dendritas y soma

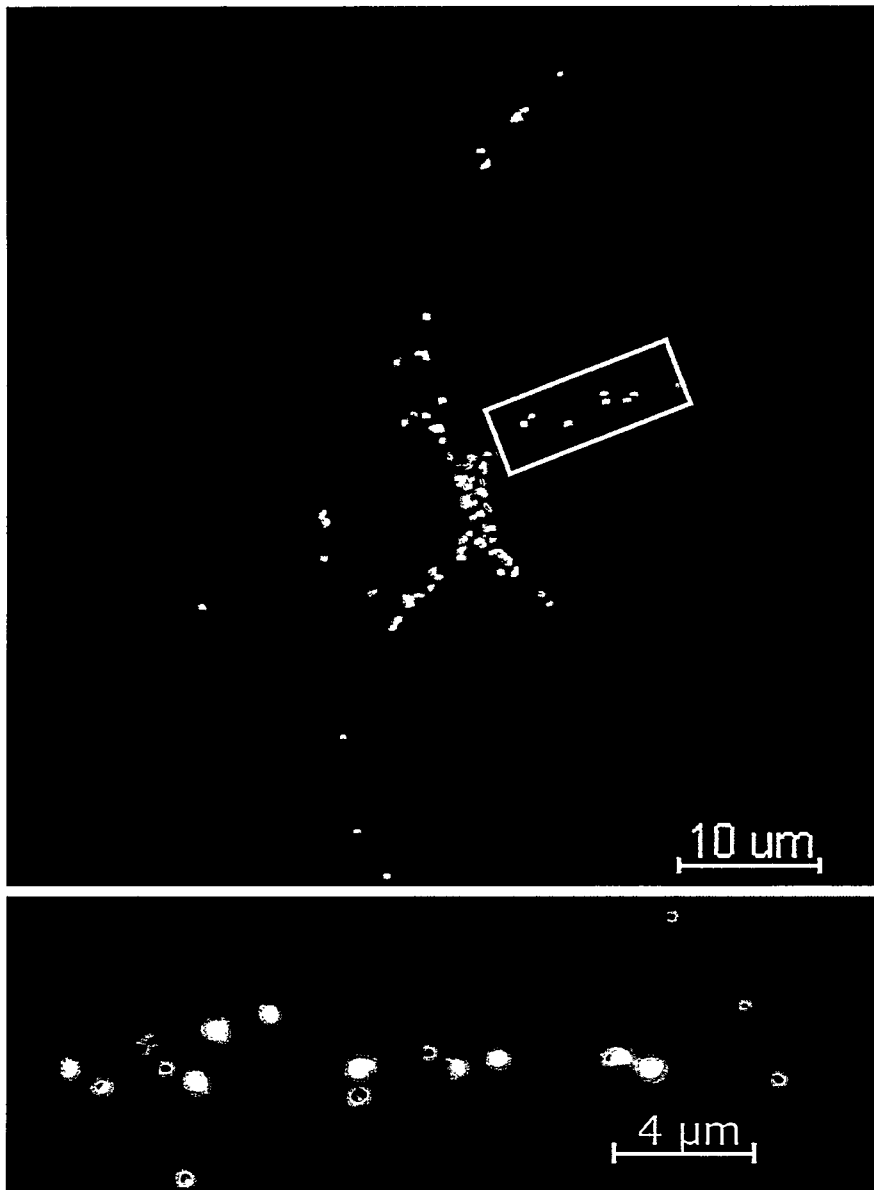


Figura 20. TrkB y la subunidad GluN1 del R-NMDA presentan co-distribución en neuronas hipocampales en cultivo. En rojo se muestra TrkB y en verde GluN1. En la parte superior se muestra la superposición de ambos canales, donde el color amarillo indica co-distribución de ambas proteínas. En la parte inferior se muestra un aumento de una dendrita (recuadro amarillo en la figura superior). Imágenes obtenidas en microscopio confocal a 63X con una apertura numérica de 1,4. Coeficiente de Manders: 0,8081.

Fig. 21 - Inmunofluorescencia en neuronas hipocampales: TrkB-GluN2A

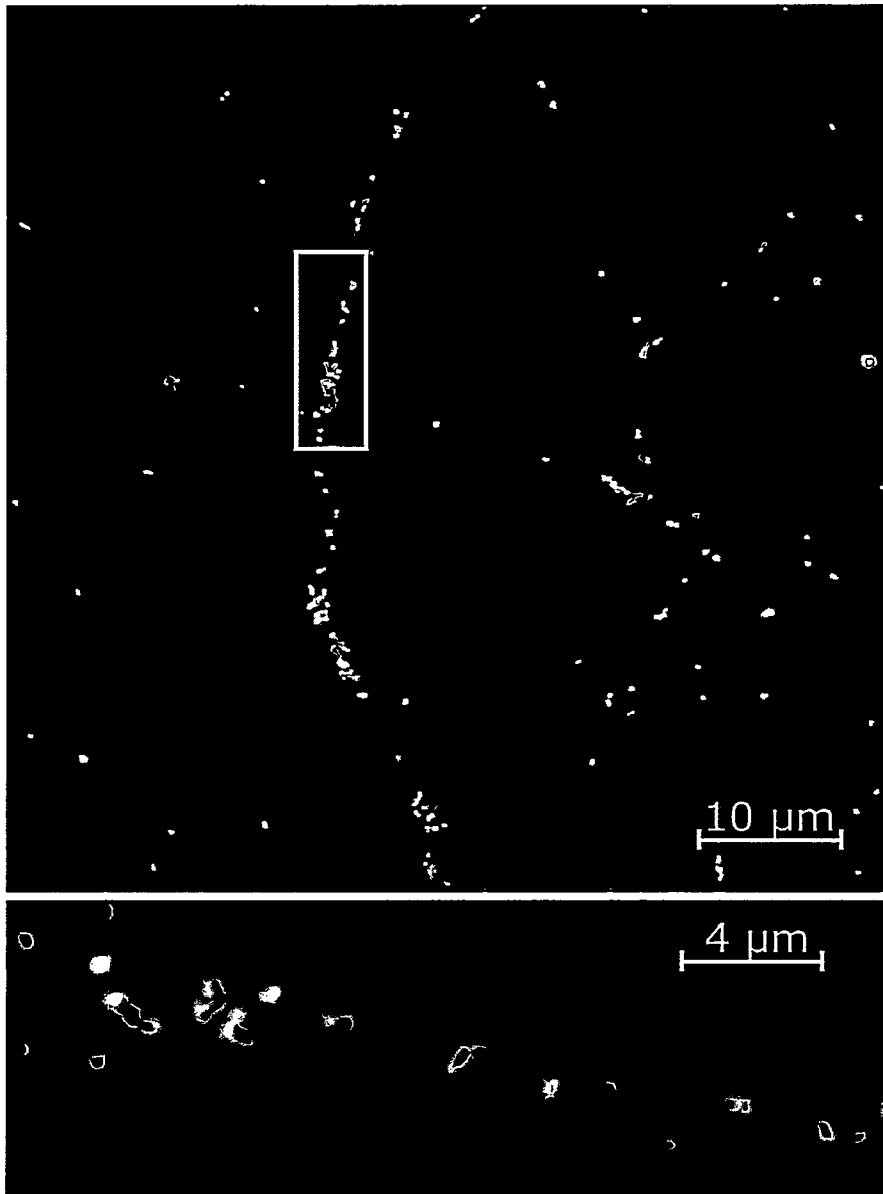


Figura 21. TrkB y la subunidad GluN2A del R-NMDA presentan co-distribución en neuronas hipocampales en cultivo. En rojo se muestra TrkB y en verde GluN2A. En la parte superior se muestra la superposición de ambos canales, donde el color amarillo indica co-distribución de ambas proteínas. En la parte inferior se muestra un aumento de una dendrita (recuadro amarillo en la figura superior). Imágenes obtenidas en microscopio confocal a 63X con una apertura numérica de 1,4. Coeficiente de Manders: 0,5963.

Fig. 22 - Inmunofluorescencia en neuronas hipocampales: TrkB-GluN2B

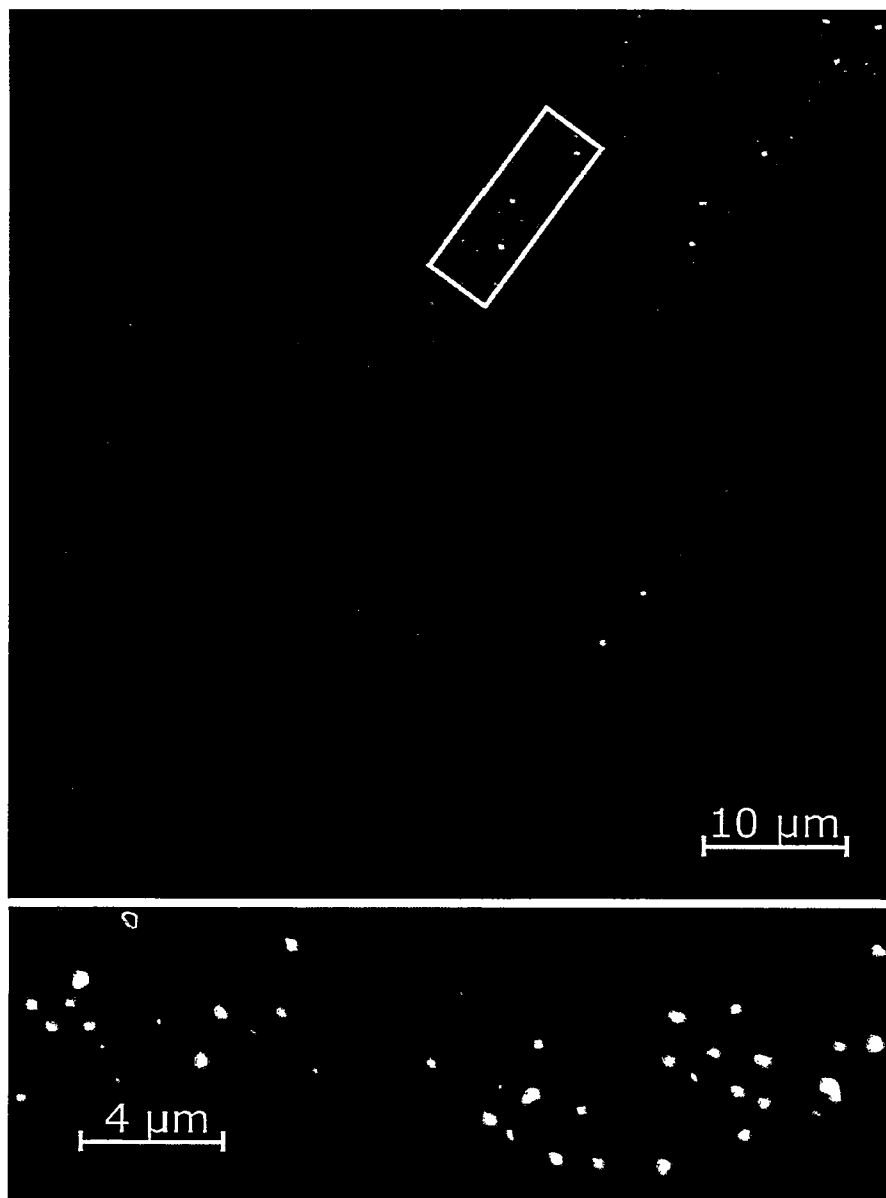


Figura 22. TrkB y la subunidad GluN2B del R-NMDA no presentan co-distribución en neuronas hipocampales en cultivo. En rojo se muestra TrkB y en verde GluN2B. En la parte superior se muestra la superposición de ambos canales, donde el color amarillo indica co-distribución de ambas proteínas. En la parte inferior se muestra un aumento de una dendrita (recuadro amarillo en la figura superior). Imágenes obtenidas en microscopio confocal a 63X con una apertura numérica de 1,4. Coeficiente de Manders: 0,4239.

Discusión

El principal hallazgo de esta tesis fue el obtener la identificación de componentes proteicos de balsas lipídicas intracelulares portadoras de TrkB. Como es sabido, estas balsas agrupan proteínas de señalización transmembrana (Zonta and Minichiello, 2013). En este caso, los resultados obtenidos muestran la presencia de múltiples componentes de sinapsis excitadoras, incluyendo GluN2A, aunque otros, como GluN2B, quedaron claramente excluidos después de utilizar distintas estrategias experimentales. Estos antecedentes abren interesantes posibilidades para estudiar el mecanismo de localización intracelular y transporte de GluN2A, su posible tráfico hacia sinapsis excitadoras, y su relación con la señalización de BDNF/TrkB. El esquema final propuesto que surge de esta tesis (Figura 24) debe ser puesto a prueba utilizando estrategias celulares y moleculares, y ayudará a esclarecer importantes interrogantes en el tema como por ejemplo: 1) Mecanismos de transporte e inserción de receptores compuestos por GluN1/GluN2A a la espina dendrítica, mecanismo hasta hoy desconocido y que participa en procesos desde la maduración sináptica durante el desarrollo hasta plasticidad tipo LTP; 2) Modulación de este proceso por BDNF/TrkB; 3) Interacciones funcionales entre TrkB y GluN2A en la endocitosis, reciclaje o degradación de estos receptores; y 4) Dependencia de estos procesos de la integridad de las balsas lipídicas.

Fig. 24 - Esquema de posibles interacciones funcionales entre TrkB y receptores de NMDA compuestos por GluN1/GluN2A

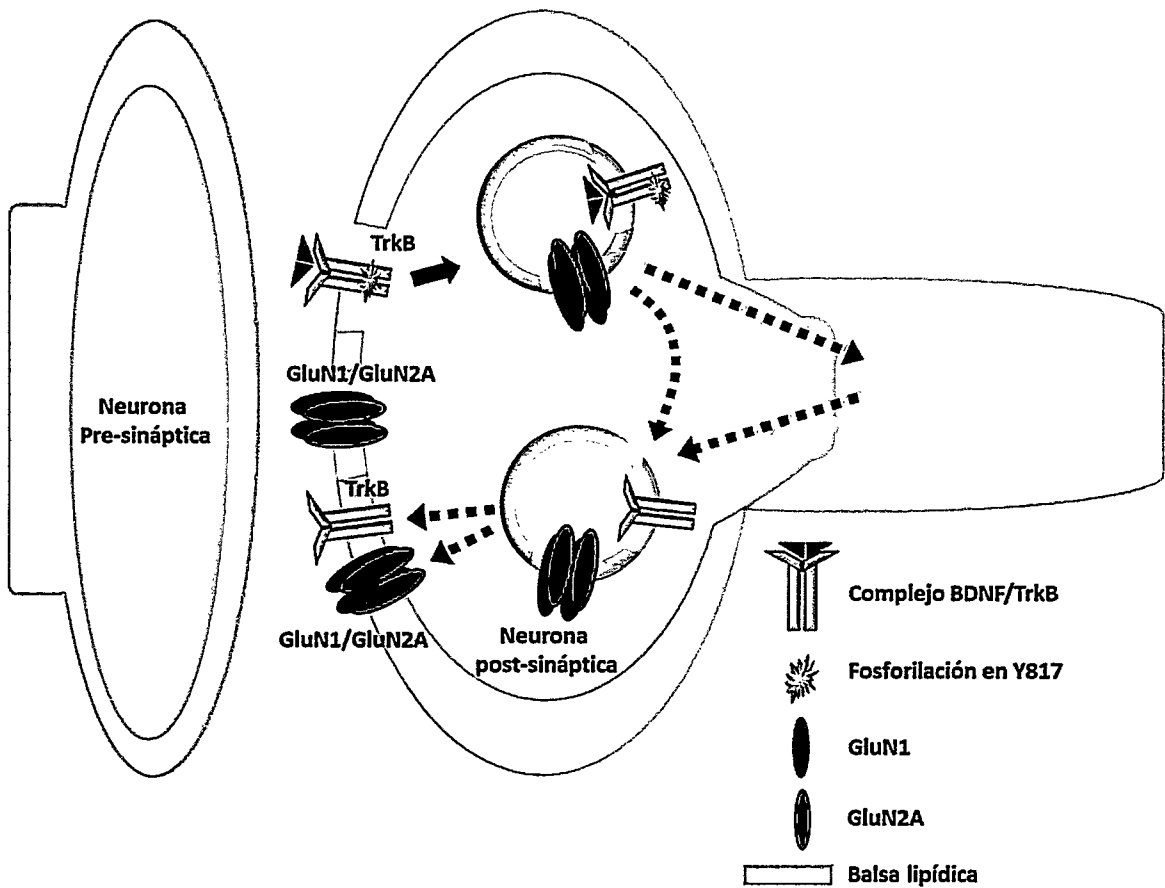


Figura 24. TrkB activado se endocita y es detectado en una fracción intracelular que contiene balsas lipídicas. Los endosomas portadores de TrkB pueden o no contener GluN1/GluN2A y pueden originar endosomas de señalización, reciclaje o degradación. Como aumenta la síntesis de GluN2A con el tratamiento con fluoxetina y además esta subunidad se inserta a la densidad postsináptica con el tratamiento, postulamos que TrkB activado puede inducir síntesis y/o transporte de TrkB y GluN1/GluN2A hacia la espina dendrítica. Las líneas intermitentes indican posibles vías funcionales que podrían ser puestas a prueba en el futuro.

I. Localización intracelular de TrkB

En esta tesis se logró caracterizar bioquímicamente la fracción subcelular P3-1 en la cual está enriquecido tanto el receptor TrkB como su forma activada pTrkB. La presencia aumentada del receptor activado en una fracción de vesículas intracelulares después del tratamiento con fluoxetina puede ser un indicador de alguna de las siguientes situaciones: el receptor TrkB es endocitado luego de su activación, endocitosis que podría inducir una señalización al interior de la célula como la descrita para TrkA (Howe and Mobley, 2005, Yano and Chao, 2005), sumada a la señalización descrita en la membrana celular. Esta señalización del complejo BDNF/TrkB estimula la síntesis de nuevas proteínas en la base de la espina dendrítica, como GluN2A, CAMKII, Arc, Homer, GluA1 y TrkB, por citar algunas (Small et al., 1998, Righi et al., 2000, Tongiorgi et al., 2000, Aakalu et al., 2001, Yin et al., 2002, Schrott et al., 2004). Por otra parte, TrkB localizado intracelularmente podría formar parte de endosomas de reciclaje, cuya función es volver a liberar el BDNF unido al receptor hacia el espacio sináptico (Santi et al., 2006). También se ha reportado que TrkB endocitado puede ser degradado en el proteosoma (Sommerfeld et al., 2000).

Nosotros inmunoaislamos las vesículas que contienen TrkB de los demás componentes vesiculados de P3-1. Sin embargo, de las proteínas identificadas por EM nos concentramos en validar en ellas la presencia de subunidades del receptor de NMDA. Con ello, no tenemos claridad sobre el tipo de vesícula inmunoaislada. Podríamos en el futuro utilizar marcadores de endosomas

tempranos (como la GTPasa monomérica Rab5A, (Brown et al., 2005)), de endosomas tardíos (como la GTPasa monomérica Rab7, (Deinhardt et al., 2006)), de reciclaje (como la GTPasa monomérica Rab11, (Lazo et al., 2013)), de señalización (como la proteína Pincher, marcador de cuerpos multivesiculares, (Valdez et al., 2005)) y de endosomas que viajan desde el soma celular hacia la membrana (como la GTPasa monomérica Rab33A, (Nakazawa et al., 2012)). Interesantemente, en la proteómica de balsas lipídicas se encontraron las GTPasas Rab10 y Rab21, que están presentes en endosomas que viajan desde el soma celular hacia la membrana plasmática (Burgo et al., 2009, Liu et al., 2013) y sugiere que nuestras muestras contienen ese tipo de endosomas.

Lo ideal en el caso de esta tesis era inmunoaíslar las vesículas que sólo contenían TrkB, para identificar sus componentes por EM y acercarse al conocimiento del tipo de vesícula y su cargo de manera más específica. Sin embargo, esto no fue posible porque era necesario eliminar el anticuerpo que queda unido a la muestra en una inmunoprecipitación antes de realizar el análisis por EM, ya que el espectrómetro detectaría en su mayoría al anticuerpo y las proteínas de la muestra quedarían enmascaradas. Para evitar que el anticuerpo quedara unido a la muestra se intentó realizar distintos tipos de entrecruzamiento entre las esferas utilizadas para inmunoprecipitar y el anticuerpo que reconocía TrkB, que en general logran una unión covalente. Sin embargo, en al menos tres protocolos empleados el anticuerpo perdió su capacidad antigénica. Es por esto

que se tuvo que desistir de esta aproximación experimental, eligiéndose las siguientes alternativas:

- 1) EM de la fracción P3-1 completa y, 2) EM de balsas lipídicas obtenidas a partir de P3-1 y que eran portadoras de TrkB activado (pTrkB).

II. Identificación de proteínas en P3-1

Al cuantificar e identificar las proteínas de la fracción P3-1 después del tratamiento con fluoxetina y comparar con P3-1 de animales no tratados se encontró que la enzima Aldolasa C se incrementa 7 veces con el tratamiento (Sandoval et al., 2013). De las proteínas que cambiaron su contenido con el tratamiento, Aldolasa A, Creatina quinasa B, Precursor mitocondrial de malato deshidrogenasa y Precursor de la proteína disulfuro isomerasa A3 se han visto involucradas en enfermedades psiquiátricas mientras que Actina citoplasmática 2, Aldolasa C, Proteína de unión a nucleótidos subunidad beta, Fosfoglicerato quinasa 1 y Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A se han asociado al tratamiento con distintos fármacos antidepresivos (Fatemi et al., 2001, Thompson et al., 2003, Beasley et al., 2006, Cecconi et al., 2007, Marais et al., 2009, Mallei et al., 2011, Piubelli et al., 2011, Huang et al., 2014). Con respecto a Aldolasa C, en el trabajo de Mallei et al. (2011) se comparó el efecto del antidepresivo nortriptilina, un antidepresivo tricíclico que inhibe la recaptación de serotonina y noradrenalina, en un modelo de desesperanza aprendida. Sólo se pudo detectar Aldolasa C

luego del tratamiento con el antidepresivo, a diferencia de nuestro trabajo, donde se encontró aldolasa C en ambas condiciones experimentales, pero con un marcado aumento luego del tratamiento con fluoxetina. Esta diferencia puede deberse a la muestra analizada (sinaptosomas purificados de hipocampo en Mallei et al, (2011) versus nuestra fracción P3-1), al tipo de control utilizado, ya que nuestros animales control fueron tratados con sólo con solución salina, en cambio sus animales control fueron sometidos a estrés y considerados como control al no desarrollar desesperanza aprendida, o al fármaco utilizado, ya que fluoxetina inhibe sólo la recaptación de serotonina.

Al comparar el trabajo de Marais et al. (2009) con el nuestro, encontramos que el tratamiento con escitalopram, un antidepresivo del tipo SSRI, aumenta el contenido de Aldolasa C con respecto al control salino, al igual que el tratamiento con fluoxetina que nosotros utilizamos. Al realizar el tratamiento con el antidepresivo, previo a un modelo de estrés por separación de las ratas recién nacidas de la madre, observaron que el contenido de Aldolasa C disminuía con respecto al control, indicando que el modelo de estrés utilizado por ellos impide el aumento de Aldolasa C inducido por el fármaco antidepresivo.

Es importante destacar que dos trabajos utilizando fármacos antidepresivos están de acuerdo con la regulación diferencial en el contenido de Aldolasa C, donde al igual que en nuestro trabajo, el tratamiento con antidepresivos induce un aumento significativo en los niveles de esta proteína. El aporte adicional de nuestro trabajo publicado fue describir que Aldolasa C se secreta en exosomas en respuesta al tratamiento y hemos visto actualmente que

su presencia en exosomas constituye un marcador periférico en estrés crónico (un modelos animal de depresión) y efectividad antidepresiva (resultados no publicados). En resumen, otros estudios de la literatura apoyan nuestros hallazgos sobre la regulación de las proteínas identificadas en modelos de depresión y tratamiento antidepresivo mientras que estos resultados dieron pie a estudios en el laboratorio que establecen roles celulares no canónicos para Aldolasa C, como en la regulación de la estabilidad de RNA mensajeros y micro-RNA en exosomas (Canete-Soler et al., 2005).

Si bien con esta estrategia obtuvimos valiosa información con respecto a posibles componentes involucrados en la respuesta al tratamiento con fluoxetina, no identificamos proteínas de la vía de señalización clásica de TrkB. Esto puede deberse a que los componentes de esta vía no necesariamente se endocitan junto a TrkB, por lo que no estarían presentes en la fracción P3-1, o estarían presentes en un nivel comparativo menor a otros, por lo que su probabilidad de detección por el espectrómetro es baja, o a que su activación no necesariamente se asocia con cambios en los niveles de la proteína en esta fracción, compuesta por vesículas de origen heterogéneo (diferentes tipos de endosomas, Golgi, retículo, etc).

Con respecto a la segunda aproximación experimental, antecedentes de la literatura indicaban que TrkB está contenido en balsas lipídicas. Interesantemente, en los últimos años se ha mostrado de una manera explosiva que canales iónicos y receptores de membrana están contenidos en balsas

lipídicas, hecho que aumenta la relevancia y contribución que significa haber estudiado la composición proteica de las balsas que contienen TrkB activado.

III. Identificación de proteínas en balsas lipídicas

Los trabajos publicados respecto a la localización de TrkB en balsas lipídicas muestran su presencia en estos microdominios (Suzuki et al., 2004), además de su endocitosis y presencia fosforilada en balsas lipídicas intracelulares (Pereira and Chao, 2007, Assaife-Lopes et al., 2013). En estos trabajos se estudió la presencia de TrkB en balsas lipídicas en cultivos neuronales, donde en el trabajo de Suzuki 2004 muestran un reclutamiento de TrkB y pTrkB hacia una fracción de balsas lipídicas en respuesta a estimulación con BDNF, sin determinarse si estas balsas se localizaban en la membrana plasmática o intracelularmente. En los trabajos de Pereira y Chao (2007) y Assaife-Lopes et al. (2013) se muestra un reclutamiento de TrkB y pTrkB mediado por BDNF hacia una fracción de balsas lipídicas intracelulares, demostrado por experimentos de biotilación de receptores de membrana e inhibiendo la endocitosis por clatrina, respectivamente. En esta tesis fuimos capaces de localizar tanto TrkB como pTrkB en una fracción intracelular de balsas lipídicas obtenida desde tejido completo, localización que se vio aumentada en animales tratados con fluoxetina.

Por lo tanto, en nuestro trabajo mostramos por primera vez que la localización de TrkB en balsas y vesículas intracelulares se puede modular in vivo, en nuestro caso mediante tratamiento farmacológico. Es posible que la utilización de estrategias farmacológicas que induzcan efectos similares sobre la localización de TrkB puedan emplearse para activar la señalización celular de este receptor (Li et al., 2008), con el fin de revertir el fenómeno de disminución de soporte trófico que se observa en diversas patologías, como durante el envejecimiento (Calabrese et al., 2013), enfermedades neurodegenerativas o trastornos cognitivos (Gupta et al., 2013).

Nuestros resultados de EM de balsas lipídicas, fueron comparados con dos trabajos encontrados en la literatura utilizando muestras similares (Foster et al., 2003, Suzuki et al., 2011). Las diferencias observadas en el número y tipo de proteínas detectadas, que se describen en la sección resultados, pueden deberse a:

- 1. Diferente origen de las balsas lipídicas.**

Nuestras balsas lipídicas fueron purificadas de una fracción rica en vesículas intracelulares, a diferencia del trabajo de Suzuki, donde las balsas fueron purificadas desde membranas sinápticas de telencéfalo, y el trabajo de Foster, donde fueron purificadas desde células HeLa. Este distinto origen puede influir en la composición de las balsas lipídicas. En el primer caso se aislaron balsas específicamente sinápticas, mientras en el segundo caso las balsas aisladas eran membrana plasmática de células HeLa. Al comparar el trabajo de Foster con el nuestro (31 proteínas comunes de 242 totales, 12,8%), se obtienen

menos proteínas en común que al compararnos con el de Suzuki (28 proteínas comunes de 155 totales, 18,1%), lo que indica que nuestras muestras tienen mayor relación con proteínas de balsas lipídicas sinápticas que con proteínas de balsas obtenidas desde membrana plasmática en general.

2. La concentración de detergente utilizada.

En esta tesis, al igual que en el trabajo de Foster, utilizamos Triton X-100 al 1% para la purificación de las balsas lipídicas, de acuerdo a lo recomendado en la literatura (Dupree and Pomicter, 2010), mientras que en el trabajo de Suzuki usaron Triton X-100 al 0,15%. Esta diferencia en la concentración de detergente puede influir en el grado de solubilización alcanzado, modificando la composición proteica de las balsas obtenidas.

3. Metodología utilizada para la EM.

En esta tesis se realizó el análisis por EM a partir de la fracción completa de balsas lipídicas purificadas, sin una separación previa antes de la digestión trípica, a diferencia del trabajo de Suzuki, donde las balsas fueron separadas en un SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie, para luego recortar las bandas del gel y proceder a la digestión y posterior análisis. La cantidad de proteínas contenida en una porción de gel supera por mucho la capacidad de detección que tienen los equipos de EM, ya que éstos sólo detectan las proteínas de mayor abundancia relativa en la cantidad de tiempo que dura la nano-inyección, perdiéndose mucha información al inyectar un gran número de péptidos. En

nuestra estrategia experimental se incluyó una separación de los péptidos ya digeridos, para inyectar un menor número de péptidos cada vez y así poder detectar más proteínas. Además, es posible que la mayor sensibilidad que presentan los nuevos equipos de EM haya afectado en el número total de proteínas identificadas.

En cuanto a los resultados esperables, se identificaron los marcadores de balsas lipídicas Thy-1 y flotilina. En cuanto a subunidades de canales iónicos, incluyendo receptores ionotrópicos, se encontraron 12 proteínas, entre las que está la subunidad GluN2A del R-NMDA, lo que fue validado posteriormente por WB de vesículas inmunoaisladas portadoras de TrkB.

Las balsas lipídicas han sido descritas como plataformas transitorias en las cuales se pueden producir distintos fenómenos, entre los cuales está que se pueden agrupar receptores para potenciar la señalización de éstos. También se ha descrito su interacción con proteínas del citoesqueleto, lo que permitiría una regulación de estas balsas sitio específica (Head et al., 2014).

El significado funcional de la presencia de complejos proteicos específicos, como TrkB/GluN2A a diferencia de TrkB/GluN2B, en balsas lipídicas, no se conoce. Es posible que la aplicación de nuevas tecnologías, como el marcaje de proteínas con nanopartículas (Chang and Rosenthal, 2013) pueda dar luces sobre su relevancia en el tráfico, destinación subcelular y señalización.

IV. Efecto del tratamiento con fluoxetina en la composición del R-NMDA sináptico

La presencia de la subunidad GluN2A del R-NMDA en balsas lipídicas, al igual como en el estudio de Suzuki et al, fue comprobada por WB, donde no se pudo detectar GluN2B. En esa fracción se pudo observar además un aumento en el contenido de GluN2A luego del tratamiento con fluoxetina. Por lo tanto propusimos que el tratamiento con fluoxetina, cuyos efectos en parte se deben a señalización BDNF/TrkB, está directamente relacionada con el cambio de composición de los receptores de NMDA sinápticos. El cambio en la estequiometría del receptor sináptico se pudo comprobar con la inmunoprecipitación de GluN1, aunque la relación causal con señalización mediada por TrkB está aún pendiente.

Es importante mencionar que el efecto sináptico de los antidepresivos sólo puede ser estudiado in vivo, ya que estos fármacos actúan sólo indirectamente sobre redes neuronales glutamatérgicas, efecto que no puede recapitularse en cultivos celulares. Así, el resultado sobre el cambio de estequiometría de los receptores para L-glutamato ha sido citado en revistas de alto impacto como *Science* (Duman and Aghajanian, 2012) y *Biological Psychiatry* (Dwyer and Duman, 2013, Musazzi et al., 2013), reforzando la idea de que las sinapsis glutamatérgicas son el blanco final común de tratamientos antidepresivos (Sanacora et al., 2008, Martinowich et al., 2013, Duman, 2014).

El fenómeno de co-localización intracelular en posibles vesículas de tráfico sería responsable, al menos en parte, del remodelamiento sináptico que se observa luego del tratamiento con antidepresivos, después del cual se observan sinapsis más estables (Ampuero et al., 2010).

Ya que nuestros resultados sugieren que GluN1/GluN2A están localizados en la misma vesícula intracelular que TrkB, y más aún, que ambos son reclutados por balsas lipídicas, es hasta donde nosotros sabemos la primera vez que se describe el potencial co-transporte de receptores tirosina quinasa transmembrana con receptores para L-glutamato de tipo ionotrópicos. Es por esto que se realizaron experimentos de co-localización en imágenes por fluorescencia, experimentos que se están completando para obtener cuantificaciones del grado de co-localización que se pueda observar en cultivos entre TrkB, pTrkB y las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B. Esto sumado a los experimentos de inmuno-microscopía electrónica, donde se espera poder observar la presencia de esas proteínas asociadas a algún tipo de estructura vesicular, utilizando anticuerpos secundarios con partículas de oro de distinto tamaño, lo que nos permitirá dilucidar si GluN2A está contenido en el mismo tipo de vesícula que TrkB, pTrkB o ambos.

Finalmente, nosotros proponemos un modelo (Figura 24) en que se sugiere lo siguiente:

- 1) TrkB está preferentemente localizado en balsas lipídicas.
- 2) TrkB activado está en vesículas intracelulares, lo que se debería a endocitosis del complejo BDNF/TrkB.

3) GluN2A, sintetizado en respuesta a BDNF/TrkB, podría ser transportado a la membrana en vesículas portadoras de TrkB. Sin embargo, al desconocerse el estado de fosforilación de TrkB, no se puede precisar si se trata de vesículas que viajan desde o hacia la membrana o ambos tipos, lo que va a poder ser detectado en la inmuno-microscopía electrónica. Alternativamente, la endocitosis de TrkB se realizaría junto a GluN2A, lo que explicaría el aumento de pTrkB en la misma vesícula. Si los receptores así endocitados fueran a reciclaje, aumentaría la tasa de recambio en conjunto de TrkB/GluN2A en la membrana.

Es importante resaltar que la localización subcelular de TrkB en el sistema nervioso central ha sido escasamente abordada. En general, para medir la activación de TrkB se miden los niveles de TrkB fosforilado (Guo et al., 2014), desconociéndose por completo la dinámica intracelular de TrkB, que sí ha sido estudiada en cultivos celulares. Por lo tanto, la presente tesis, a través del análisis global logrado mediante técnicas proteómicas, dará pie a nuevas investigaciones tendientes a comprender mecanismos moleculares implicados en el remodelamiento sináptico inducido por BDNF y su relación causal con la efectividad del tratamiento antidepresivo.

Bibliografia

1. Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, Jiang C, Schuman EM (2001) Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 30:489-502.
2. Ahmad Y, Boisvert FM, Lundberg E, Uhlen M, Lamond AI (2012) Systematic analysis of protein pools, isoforms, and modifications affecting turnover and subcellular localization. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11:M111 013680.
3. Ahmed S, Reynolds BA, Weiss S (1995) BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:5765-5778.
4. Ahn AH, Dziennis S, Hawkes R, Herrup K (1994) The cloning of zebrin II reveals its identity with aldolase C. *Development* 120:2081-2090.
5. Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Graos MM, Carvalho RF, Carvalho AP, Duarte CB (2005) Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell death and differentiation* 12:1329-1343.
6. Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL (2007) Distinct structural and ionotropic roles of NMDA receptors in controlling spine and synapse stability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:7365-7376.
7. Ampuero E, Rubio FJ, Falcon R, Sandoval M, Diaz-Veliz G, Gonzalez RE, Earle N, Dagnino-Subiabre A, Aboitiz F, Orrego F, Wyneken U (2010) Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 169:98-108.
8. Aoki C, Wu K, Elste A, Len G, Lin S, McAuliffe G, Black IB (2000) Localization of brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptors to postsynaptic densities of adult rat cerebral cortex. *Journal of neuroscience research* 59:454-463.
9. Arckens L, Van der Gucht E, Van den Bergh G, Massie A, Leysen I, Vandebussche E, Eysel UT, Huybrechts R, Vandesande F (2003) Differential display implicates cyclophilin A in adult cortical plasticity. *Eur J Neurosci* 18:61-75.
10. Assaife-Lopes N, Sousa VC, Pereira DB, Ribeiro JA, Sebastiao AM (2013) Regulation of TrkB receptor translocation to lipid rafts by adenosine A receptors and its

functional implications for BDNF-induced regulation of synaptic plasticity. Purinergic signalling.

11. Autry AE, Monteggia LM (2012) Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological reviews* 64:238-258.
12. Baj G, Carlino D, Gardossi L, Tongiorgi E (2013) Toward a unified biological hypothesis for the BDNF Val66Met-associated memory deficits in humans: a model of impaired dendritic mRNA trafficking. *Frontiers in neuroscience* 7:188.
13. Balu DT, Hoshaw BA, Malberg JE, Rosenzweig-Lipson S, Schechter LE, Lucki I (2008) Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. *Brain research* 1211:37-43.
14. Bard L, Groc L (2011) Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor. *Molecular and cellular neurosciences* 48:298-307.
15. Baron CB, Greeley P, Coburn RF (1998) Smooth muscle aldolase C-bound inositol 1,4,5-trisphosphate studied in vitro under physiological conditions. *Biochimica et biophysica acta* 1401:81-92.
16. Bassani S, Folci A, Zapata J, Passafaro M (2013) AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70:4411-4430.
17. Bayes A, Collins MO, Croning MD, van de Lagemaat LN, Choudhary JS, Grant SG (2012) Comparative study of human and mouse postsynaptic proteomes finds high compositional conservation and abundance differences for key synaptic proteins. *PLoS one* 7:e46683.
18. Beasley CL, Pennington K, Behan A, Wait R, Dunn MJ, Cotter D (2006) Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: Evidence for disease-associated changes. *Proteomics* 6:3414-3425.
19. Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A (1994) Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 14:689-692.
20. Behar TN, Dugich-Djordjevic MM, Li YX, Ma W, Somogyi R, Wen X, Brown E, Scott C, McKay RD, Barker JL (1997) Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur J Neurosci* 9:2561-2570.

21. Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53:261-277.
22. Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2008a) BDNF and memory formation and storage. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 14:147-156.
23. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH (2008b) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:2711-2716.
24. Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH (2014) BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 76 Pt C:677-683.
25. Bifrare YD, Kummer J, Joss P, Tauber MG, Leib SL (2005) Brain-derived neurotrophic factor protects against multiple forms of brain injury in bacterial meningitis. *The Journal of infectious diseases* 191:40-45.
26. Blum R, Konnerth A (2005) Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology* 20:70-78.
27. Boeckers TM (2006) The postsynaptic density. *Cell and tissue research* 326:409-422.
28. Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Progress in neurobiology* 76:99-125.
29. Brown TC, Tran IC, Backos DS, Esteban JA (2005) NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. *Neuron* 45:81-94.
30. Burgo A, Sotirakis E, Simmler MC, Verraes A, Chamot C, Simpson JC, Lanzetti L, Proux-Gillardeaux V, Galli T (2009) Role of Varp, a Rab21 exchange factor and TI-VAMP/VAMP7 partner, in neurite growth. *EMBO reports* 10:1117-1124.
31. Calabrese F, Guidotti G, Racagni G, Riva MA (2013) Reduced neuroplasticity in aged rats: a role for the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor. *Neurobiology of aging* 34:2768-2776.
32. Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho R, Correia SS, Backos DS, Carvalho AL, Esteban JA, Duarte CB (2007a) Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole

- propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. *The Journal of biological chemistry* 282:12619-12628.
33. Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho RF, Carvalho AL, Duarte CB (2007b) BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Molecular and cellular neurosciences* 35:208-219.
 34. Canete-Soler R, Reddy KS, Tolan DR, Zhai J (2005) Aldolases a and C are ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:4353-4364.
 35. Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, Siekevitz P (1980) Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *The Journal of cell biology* 86:831-845.
 36. Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, Duarte CB (2008) Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1:S310-324.
 37. Castren E (2004) Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Current opinion in pharmacology* 4:58-64.
 38. Castren E, Rantamaki T (2010) The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Developmental neurobiology* 70:289-297.
 39. Cecconi D, Mion S, Astner H, Domenici E, Righetti PG, Carboni L (2007) Proteomic analysis of rat cortical neurons after fluoxetine treatment. *Brain research* 1135:41-51.
 40. Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33:18-41.
 41. Cohen MS, Orth CB, Kim HJ, Jeon NL, Jaffrey SR (2011) Neurotrophin-mediated dendrite-to-nucleus signaling revealed by microfluidic compartmentalization of dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:11246-11251.
 42. Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 37:205-237.
 43. Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH (2010) Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Current molecular pharmacology* 3:12-29.

44. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current opinion in neurobiology* 11:327-335.
45. Chang JC, Rosenthal SJ (2013) Quantum dot-based single-molecule microscopy for the study of protein dynamics. *Methods in molecular biology* 1026:71-84.
46. Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews Neuroscience* 4:299-309.
47. Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS (2006) Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* 314:140-143.
48. Cheng HH, Liu SH, Lee HC, Lin YS, Huang ZH, Hsu CI, Chen YC, Chang YC (2006) Heavy chain of cytoplasmic dynein is a major component of the postsynaptic density fraction. *Journal of neuroscience research* 84:244-254.
49. D'Adamo P, Masetti M, Bianchi V, More L, Mignogna ML, Giannandrea M, Gatti S (2014) RAB GTPases and RAB-interacting proteins and their role in the control of cognitive functions. *Neuroscience and biobehavioral reviews*.
50. Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, Watson R, Worth D, Hanrahan S, Bucci C, Schiavo G (2006) Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* 52:293-305.
51. Di Lieto A, Rantamaki T, Vesa L, Yanpallewar S, Antila H, Lindholm J, Rios M, Tessarollo L, Castren E (2012) The responsiveness of TrkB to BDNF and antidepressant drugs is differentially regulated during mouse development. *PloS one* 7:e32869.
52. Downes GB, Gautam N (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics* 62:544-552.
53. Drake CT, Milner TA, Patterson SL (1999) Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:8009-8026.
54. Duman RS (2014) *Neurobiology of Stress, Depression, and Rapid Acting Antidepressants: Remodeling Synaptic Connections*. Depression and anxiety.
55. Duman RS, Aghajanian GK (2012) Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* 338:68-72.

56. Duman RS, Voleti B (2012) Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends in neurosciences* 35:47-56.
57. Dupree JL, Pomicter AD (2010) Myelin, DIGs, and membrane rafts in the central nervous system. *Prostaglandins & other lipid mediators* 91:118-129.
58. Dwyer JM, Duman RS (2013) Activation of mammalian target of rapamycin and synaptogenesis: role in the actions of rapid-acting antidepressants. *Biological psychiatry* 73:1189-1198.
59. Dzeja PP, Terzic A (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206:2039-2047.
60. Edelman E, Lessmann V, Brigadski T (2014) Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76 Pt C:610-627.
61. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257-269.
62. Fatemi SH, Earle JA, Strydom JM, Lee S, Sedgewick J (2001) Altered levels of the synaptosomal associated protein SNAP-25 in hippocampus of subjects with mood disorders and schizophrenia. *Neuroreport* 12:3257-3262.
63. Fernandez AM, Torres-Aleman I (2012) The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature reviews Neuroscience* 13:225-239.
64. Fisar Z, Hroudova J (2010) Intracellular signalling pathways and mood disorders. *Folia biologica* 56:135-148.
65. Foster LJ, De Hoog CL, Mann M (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5813-5818.
66. Fukumitsu H, Ohtsuka M, Murai R, Nakamura H, Itoh K, Furukawa S (2006) Brain-derived neurotrophic factor participates in determination of neuronal laminar fate in the developing mouse cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:13218-13230.
67. Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438:185-192.

68. Genoux D, Montgomery JM (2007) Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 34:1058-1063.
69. Gilbert HF (1997) Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *The Journal of biological chemistry* 272:29399-29402.
70. Gokce O, Runne H, Kuhn A, Luthi-Carter R (2009) Short-term striatal gene expression responses to brain-derived neurotrophic factor are dependent on MEK and ERK activation. *PloS one* 4:e5292.
71. Gomes RA, Hampton C, El-Sabeawy F, Sabo SL, McAllister AK (2006) The dynamic distribution of TrkB receptors before, during, and after synapse formation between cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:11487-11500.
72. Guillaud L, Setou M, Hirokawa N (2003) KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:131-140.
73. Guo W, Ji Y, Wang S, Sun Y, Lu B (2014) Neuronal activity alters BDNF-TrkB signaling kinetics and downstream functions. *Journal of cell science*.
74. Gupta VK, You Y, Gupta VB, Klistorner A, Graham SL (2013) TrkB Receptor Signalling: Implications in Neurodegenerative, Psychiatric and Proliferative Disorders. *International journal of molecular sciences* 14:10122-10142.
75. Gylys KH, Fein JA, Yang F, Cole GM (2004) Enrichment of presynaptic and postsynaptic markers by size-based gating analysis of synaptosome preparations from rat and human cortex. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 60:90-96.
76. Haapasalo A, Sipola I, Larsson K, Akerman KE, Stoilov P, Stamm S, Wong G, Castren E (2002) Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *The Journal of biological chemistry* 277:43160-43167.
77. Hammer JA, 3rd, Wagner W (2013) Functions of class V myosins in neurons. *The Journal of biological chemistry* 288:28428-28434.
78. Han BH, D'Costa A, Back SA, Parsadanian M, Patel S, Shah AR, Gidday JM, Srinivasan A, Deshmukh M, Holtzman DM (2000) BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiology of disease* 7:38-53.

79. Head BP, Patel HH, Insel PA (2014) Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1838:532-545.
80. Hong CJ, Liou YJ, Tsai SJ (2011) Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain research bulletin* 86:287-297.
81. Hosang GM, Shiles C, Tansey KE, McGuffin P, Uher R (2014) Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine* 12:7.
82. Howe CL, Mobley WC (2005) Long-distance retrograde neurotrophic signaling. *Current opinion in neurobiology* 15:40-48.
83. Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience* 24:677-736.
84. Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry* 72:609-642.
85. Huang SH, Wang J, Sui WH, Chen B, Zhang XY, Yan J, Geng Z, Chen ZY (2013) BDNF-dependent recycling facilitates TrkB translocation to postsynaptic density during LTP via a Rab11-dependent pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:9214-9230.
86. Huang TL, Sung ML, Chen TY (2014) 2D-DIGE proteome analysis on the platelet proteins of patients with major depression. *Proteome science* 12:1.
87. Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nature neuroscience* 3:661-669.
88. Iasevoli F, Tomasetti C, de Bartolomeis A (2013) Scaffolding proteins of the post-synaptic density contribute to synaptic plasticity by regulating receptor localization and distribution: relevance for neuropsychiatric diseases. *Neurochemical research* 38:1-22.
89. Jakawich SK, Nasser HB, Strong MJ, McCartney AJ, Perez AS, Rakesh N, Carruthers CJ, Sutton MA (2010) Local presynaptic activity gates homeostatic changes in presynaptic function driven by dendritic BDNF synthesis. *Neuron* 68:1143-1158.
90. Jiang C, Salton SR (2013) The Role of Neurotrophins in Major Depressive Disorder. *Translational neuroscience* 4:46-58.

91. Jourdi H, Kabbaj M (2013) Acute BDNF treatment upregulates GluR1-SAP97 and GluR2-GRIP1 interactions: implications for sustained AMPA receptor expression. *PLoS one* 8:e57124.
92. Kahne T, Kolodziej A, Smalla KH, Eisenschmidt E, Haus UU, Weismantel R, Kropf S, Wetzel W, Ohi FW, Tischmeyer W, Naumann M, Gundelfinger ED (2012) Synaptic proteome changes in mouse brain regions upon auditory discrimination learning. *Proteomics* 12:2433-2444.
93. Kaneko M, Xie Y, An JJ, Stryker MP, Xu B (2012) Dendritic BDNF synthesis is required for late-phase spine maturation and recovery of cortical responses following sensory deprivation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:4790-4802.
94. Kao AW, Noda Y, Johnson JH, Pessin JE, Saltiel AR (1999) Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *The Journal of biological chemistry* 274:17742-17747.
95. Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 10:381-391.
96. Kiprianova I, Sandkuhler J, Schwab S, Hoyer S, Spranger M (1999) Brain-derived neurotrophic factor improves long-term potentiation and cognitive functions after transient forebrain ischemia in the rat. *Experimental neurology* 159:511-519.
97. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:8856-8860.
98. Kovalchuk Y, Holthoff K, Konnerth A (2004) Neurotrophin action on a rapid timescale. *Current opinion in neurobiology* 14:558-563.
99. Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894-902.
100. Kuczewski N, Porcher C, Gaiarsa JL (2010) Activity-dependent dendritic secretion of brain-derived neurotrophic factor modulates synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* 32:1239-1244.
101. Kumanishi T, Watabe K, Washiyama K (1985) An immunohistochemical study of aldolase C in normal and neoplastic nervous tissues. *Acta neuropathologica* 67:309-314.

102. Kusakabe T, Motoki K, Hori K (1997) Mode of interactions of human aldolase isozymes with cytoskeletons. *Archives of biochemistry and biophysics* 344:184-193.
103. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
104. Lanni C, Govoni S, Lucchelli A, Boselli C (2009) Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66:2985-3008.
105. Lau CG, Takayasu Y, Rodenas-Ruano A, Paternain AV, Lerma J, Bennett MV, Zukin RS (2010) SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:242-254.
106. Lazo OM, Gonzalez A, Ascano M, Kuruvilla R, Couve A, Bronfman FC (2013) BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:6112-6122.
107. Lee S, Jeong J, Kwak Y, Park SK (2010) Depression research: where are we now? *Molecular brain* 3:8.
108. Li JM, Mogi M, Tsukuda K, Tomochika H, Iwanami J, Min LJ, Nahmias C, Iwai M, Horiuchi M (2007) Angiotensin II-induced neural differentiation via angiotensin II type 2 (AT2) receptor-MMS2 cascade involving interaction between AT2 receptor-interacting protein and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 1. *Mol Endocrinol* 21:499-511.
109. Li KW, Hornshaw MP, Van Der Schors RC, Watson R, Tate S, Casetta B, Jimenez CR, Gouwenberg Y, Gundelfinger ED, Smalla KH, Smit AB (2004) Proteomics analysis of rat brain postsynaptic density. Implications of the diverse protein functional groups for the integration of synaptic physiology. *The Journal of biological chemistry* 279:987-1002.
110. Li ST, Pan J, Hua XM, Liu H, Shen S, Liu JF, Li B, Tao BB, Ge XL, Wang XH, Shi JH, Wang XQ (2014) Endothelial Nitric Oxide Synthase Protects Neurons against Ischemic Injury through Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression. *CNS neuroscience & therapeutics* 20:154-164.
111. Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, Chen J, Kwon CH, Kernie SG, Bassel-Duby R, Parada LF (2008) TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* 59:399-412.

112. Liu HY, Meakin SO (2002) ShcB and ShcC activation by the Trk family of receptor tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 277:26046-26056.
113. Liu Y, Xu XH, Chen Q, Wang T, Deng CY, Song BL, Du JL, Luo ZG (2013) Myosin Vb controls biogenesis of post-Golgi Rab10 carriers during axon development. *Nature communications* 4:2005.
114. Lorentzen E, Siebers B, Hensel R, Pohl E (2005) Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. *Biochemistry* 44:4222-4229.
115. Lu Y, Christian K, Lu B (2008) BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiology of learning and memory* 89:312-323.
116. Lu Y, Ji Y, Ganesan S, Schloesser R, Martinowich K, Sun M, Mei F, Chao MV, Lu B (2011) TrkB as a potential synaptic and behavioral tag. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:11762-11771.
117. Mallei A, Giambelli R, Gass P, Racagni G, Mathe AA, Vollmayr B, Popoli M (2011) Synaptoproteomics of learned helpless rats involve energy metabolism and cellular remodeling pathways in depressive-like behavior and antidepressant response. *Neuropharmacology* 60:1243-1253.
118. Manders EM, Verbeek FJ, Aten JA (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* 169:8.
119. Marais L, Hattingh SM, Stein DJ, Daniels WM (2009) A proteomic analysis of the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation and escitalopram treatment. *Metabolic brain disease* 24:569-586.
120. Martinowich K, Jimenez DV, Zarate CA, Jr., Manji HK (2013) Rapid antidepressant effects: moving right along. *Molecular psychiatry* 18:856-863.
121. Martinowich K, Lu B (2008) Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33:73-83.
122. Massart R, Mongeau R, Lanfumey L (2012) Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 367:2485-2494.

123. Matteoli M, Pozzi D, Grumelli C, Condliffe SB, Frassoni C, Harkany T, Verderio C (2009) The synaptic split of SNAP-25: different roles in glutamatergic and GABAergic neurons? *Neuroscience* 158:223-230.
124. Medvedev NI, Rodriguez-Arellano JJ, Popov VI, Davies HA, Tigaret CM, Schoepfer R, Stewart MG (2008) The glutamate receptor 2 subunit controls post-synaptic density complexity and spine shape in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 27:315-325.
125. Melo CV, Okumoto S, Gomes JR, Baptista MS, Bahr BA, Frommer WB, Duarte CB (2013) Spatiotemporal resolution of BDNF neuroprotection against glutamate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 237:66-86.
126. Merkulova M, Hurtado-Lorenzo A, Hosokawa H, Zhuang Z, Brown D, Ausiello DA, Marshansky V (2011) Aldolase directly interacts with ARNO and modulates cell morphology and acidic vesicle distribution. *American journal of physiology Cell physiology* 300:C1442-1455.
127. Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Jr., Reichardt LF, Barres BA (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21:681-693.
128. Miklic S, Juric DM, Carman-Krzan M (2004) Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 22:119-130.
129. Minarik P, Tomaskova N, Kollarova M, Antalik M (2002) Malate dehydrogenases-structure and function. *General physiology and biophysics* 21:257-265.
130. Minichiello L (2009) TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature reviews Neuroscience* 10:850-860.
131. Mitchell DJ, Blasier KR, Jeffery ED, Ross MW, Pullikuth AK, Suo D, Park J, Smiley WR, Lo KW, Shabanowitz J, Deppmann CD, Trinidad JC, Hunt DF, Catling AD, Pfister KK (2012) Trk activation of the ERK1/2 kinase pathway stimulates intermediate chain phosphorylation and recruits cytoplasmic dynein to signaling endosomes for retrograde axonal transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:15495-15510.
132. Moughamian AJ, Osborn GE, Lazarus JE, Maday S, Holzbaur EL (2013) Ordered recruitment of dynactin to the microtubule plus-end is required for efficient initiation of

- retrograde axonal transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:13190-13203.
133. Musazzi L, Treccani G, Mallei A, Popoli M (2013) The action of antidepressants on the glutamate system: regulation of glutamate release and glutamate receptors. *Biological psychiatry* 73:1180-1188.
134. Nagappan G, Lu B (2005) Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications. *Trends in neurosciences* 28:464-471.
135. Nakazawa H, Sada T, Toriyama M, Tago K, Sugiura T, Fukuda M, Inagaki N (2012) Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:12712-12725.
136. Neto FL, Borges G, Torres-Sanchez S, Mico JA, Berrocoso E (2011) Neurotrophins role in depression neurobiology: a review of basic and clinical evidence. *Current neuropharmacology* 9:530-552.
137. Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G (2012) Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 100:656-664.
138. Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H (2010) BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histology and histopathology* 25:237-258.
139. Okabe S (2007) Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Molecular and cellular neurosciences* 34:503-518.
140. Okazawa H, Nishiyama K, Kamei M, Washizaki K, Murayama S, Kwak S, Kanazawa I (1993) trk immunoreactivity at neuronal dendrite and cell body. *Biochemical and biophysical research communications* 194:683-690.
141. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 1:376-386.
142. Orefice LL, Waterhouse EG, Partridge JG, Lalchandani RR, Vicini S, Xu B (2013) Distinct roles for somatically and dendritically synthesized brain-derived neurotrophic factor in morphogenesis of dendritic spines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:11618-11632.

143. Osterweil E, Wells DG, Mooseker MS (2005) A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *The Journal of cell biology* 168:329-338.
144. Park H, Poo MM (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature reviews Neuroscience* 14:7-23.
145. Parton RG, Richards AA (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4:724-738.
146. Pattwell SS, Bath KG, Perez-Castro R, Lee FS, Chao MV, Ninan I (2012) The BDNF Val66Met polymorphism impairs synaptic transmission and plasticity in the infralimbic medial prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:2410-2421.
147. Pereira DB, Chao MV (2007) The tyrosine kinase Fyn determines the localization of TrkB receptors in lipid rafts. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:4859-4869.
148. Persaud-Sawin DA, Lightcap S, Harry GJ (2009) Isolation of rafts from mouse brain tissue by a detergent-free method. *Journal of lipid research* 50:759-767.
149. Piubelli C, Vighini M, Mathe AA, Domenici E, Carboni L (2011) Escitalopram modulates neuron-remodelling proteins in a rat gene-environment interaction model of depression as revealed by proteomics. Part I: genetic background. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 14:796-833.
150. Pizzorusso T, Ratto GM, Putignano E, Maffei L (2000) Brain-derived neurotrophic factor causes cAMP response element-binding protein phosphorylation in absence of calcium increases in slices and cultured neurons from rat visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2809-2816.
151. Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326:1208-1212.
152. Puri C, Tosoni D, Comai R, Rabellino A, Segat D, Caneva F, Luzzi P, Di Fiore PP, Tacchetti C (2005) Relationships between EGFR signaling-competent and endocytosis-competent membrane microdomains. *Molecular biology of the cell* 16:2704-2718.
153. Rajendran L, Simons K (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of cell science* 118:1099-1102.
154. Rantamaki T, Hendolin P, Kankaanpaa A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Mannisto PT, Castren E (2007) Pharmacologically diverse antidepressants

rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 32:2152-2162.

155. Rantamaki T, Vesa L, Antila H, Di Lieto A, Tammela P, Schmitt A, Lesch KP, Rios M, Castren E (2011) Antidepressant drugs transactivate TrkB neurotrophin receptors in the adult rodent brain independently of BDNF and monoamine transporter blockade. *PLoS one* 6:e20567.

156. Rauner C, Kohr G (2011) Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *The Journal of biological chemistry* 286:7558-7566.

157. Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 361:1545-1564.

158. Righi M, Tongiorgi E, Cattaneo A (2000) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:3165-3174.

159. Rodriguez G dIA (1986) Subcellular Fractionation. In: *Neuromethods*, vol. 1, pp 19-67.

160. Rubio FJ, Ampuero E, Sandoval R, Toledo J, Pancetti F, Wyneken U (2013) Long-term fluoxetine treatment induces input-specific LTP and LTD impairment and structural plasticity in the CA1 hippocampal subfield. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:66.

161. Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castren M, Castren E (2005) Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:1089-1094.

162. Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK (2008) Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature reviews Drug discovery* 7:426-437.

163. Sandoval M, Luarte A, Herrera-Molina R, Varas-Godoy M, Santibanez M, Rubio FJ, Smit AB, Gundelfinger ED, Li KW, Smalla KH, Wyneken U (2013) The glycolytic enzyme aldolase C is up-regulated in rat forebrain microsomes and in the cerebrospinal fluid after repetitive fluoxetine treatment. *Brain research*.

164. Santi S, Cappello S, Riccio M, Bergami M, Aicardi G, Schenk U, Matteoli M, Canossa M (2006) Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *The EMBO journal* 25:4372-4380.
165. Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW (2013) Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 19:62-75.
166. Sarnataro D, Caputo A, Casanova P, Puri C, Paladino S, Tivodar SS, Campana V, Tacchetti C, Zurzolo C (2009) Lipid rafts and clathrin cooperate in the internalization of PrP in epithelial FRT cells. *PloS one* 4:e5829.
167. Schrott GM, Nigh EA, Chen WG, Hu L, Greenberg ME (2004) BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:7366-7377.
168. Schulz-Klaus B, Lessmann V, Endres T (2013) BDNF-dependent consolidation of fear memories in the perirhinal cortex. *Frontiers in behavioral neuroscience* 7:205.
169. Schuman EM, Dynes JL, Steward O (2006) Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:7143-7146.
170. Schwartz JP, Nishiyama N (1994) Neurotrophic factor gene expression in astrocytes during development and following injury. *Brain research bulletin* 35:403-407.
171. Sebastiao AM, Assaife-Lopes N, Diogenes MJ, Vaz SH, Ribeiro JA (2011) Modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) actions in the nervous system by adenosine A(2A) receptors and the role of lipid rafts. *Biochimica et biophysica acta* 1808:1340-1349.
172. Seebohm G, Neumann S, Theiss C, Novkovic T, Hill EV, Tavare JM, Lang F, Hollmann M, Manahan-Vaughan D, Strutz-Seebohm N (2012) Identification of a novel signaling pathway and its relevance for GluA1 recycling. *PloS one* 7:e33889.
173. Sepulveda FJ, Bustos FJ, Inostroza E, Zuniga FA, Neve RL, Montecino M, van Zundert B (2010) Differential roles of NMDA Receptor Subtypes NR2A and NR2B in dendritic branch development and requirement of RasGRF1. *Journal of neurophysiology* 103:1758-1770.

174. Setou M, Nakagawa T, Seog DH, Hirokawa N (2000) Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288:1796-1802.
175. Shelly M, Cancedda L, Heilshorn S, Sumbre G, Poo MM (2007) LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129:565-577.
176. Sheng M, Hoogenraad CC (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annual review of biochemistry* 76:823-847.
177. Sheng M, Kim E (2011) The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.
178. Shetty AK, Turner DA (1998) In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor. *Journal of neurobiology* 35:395-425.
179. Shinoda Y, Sadakata T, Nakao K, Katoh-Semba R, Kinameri E, Furuya A, Yanagawa Y, Hirase H, Furuichi T (2011) Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) promotes BDNF secretion and is critical for the development of GABAergic interneuron network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:373-378.
180. Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 1:31-39.
181. Small DL, Murray CL, Mealing GA, Poulter MO, Buchan AM, Morley P (1998) Brain derived neurotrophic factor induction of N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A expression in cultured rat cortical neurons. *Neuroscience letters* 252:211-214.
182. Smalla KH, Mikhaylova M, Sahin J, Bernstein HG, Bogerts B, Schmitt A, van der Schors R, Smit AB, Li KW, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2008) A comparison of the synaptic proteome in human chronic schizophrenia and rat ketamine psychosis suggest that prohibitin is involved in the synaptic pathology of schizophrenia. *Molecular psychiatry* 13:878-896.
183. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150:76-85.
184. Sommerfeld MT, Schweigreiter R, Barde YA, Hoppe E (2000) Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an involvement of

- the proteasome and differential regulation of TrkA and TrkB. *The Journal of biological chemistry* 275:8982-8990.
185. Soto D, Pancetti F, Marengo JJ, Sandoval M, Sandoval R, Orrego F, Wyneken U (2004) Protein kinase CK2 in postsynaptic densities: phosphorylation of PSD-95/SAP90 and NMDA receptor regulation. *Biochemical and biophysical research communications* 322:542-550.
186. Stefanizzi I, Canete-Soler R (2007) Coregulation of light neurofilament mRNA by poly(A)-binding protein and aldolase C: implications for neurodegeneration. *Brain research* 1139:15-28.
187. Suzuki S, Numakawa T, Shimazu K, Koshimizu H, Hara T, Hatanaka H, Mei L, Lu B, Kojima M (2004) BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *The Journal of cell biology* 167:1205-1215.
188. Suzuki T, Zhang J, Miyazawa S, Liu Q, Farzan MR, Yao WD (2011) Association of membrane rafts and postsynaptic density: proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. *Journal of neurochemistry* 119:64-77.
189. Swanwick CC, Harrison MB, Kapur J (2004) Synaptic and extrasynaptic localization of brain-derived neurotrophic factor and the tyrosine kinase B receptor in cultured hippocampal neurons. *The Journal of comparative neurology* 478:405-417.
190. Swanwick CC, Shapiro ME, Yi Z, Chang K, Wenthold RJ (2009) NMDA receptors interact with flotillin-1 and -2, lipid raft-associated proteins. *FEBS Lett* 583:1226-1230.
191. Takei K, Mundigl O, Daniell L, De Camilli P (1996) The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *The Journal of cell biology* 133:1237-1250.
192. Taupin P, Zini S, Cesselin F, Ben-Ari Y, Roisin MP (1994) Subcellular fractionation on Percoll gradient of mossy fiber synaptosomes: morphological and biochemical characterization in control and degranulated rat hippocampus. *Journal of neurochemistry* 62:1586-1595.
193. Thomas S, Bonchev D (2010) A survey of current software for network analysis in molecular biology. *Human genomics* 4:353-360.
194. Thompson PM, Egbufoama S, Vawter MP (2003) SNAP-25 reduction in the hippocampus of patients with schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 27:411-417.

195. Thompson RJ, Kynoch PA, Willson VJ (1982) Cellular localization of aldolase C subunits in human brain. *Brain research* 232:489-493.
196. Tomasoni R, Repetto D, Morini R, Elia C, Gardoni F, Di Luca M, Turco E, Defilippi P, Matteoli M (2013) SNAP-25 regulates spine formation through postsynaptic binding to p140Cap. *Nature communications* 4:2136.
197. Tongiorgi E, Armellin M, Cattaneo A (2000) Differential somato-dendritic localization of TrkA, TrkB, TrkC and p75 mRNAs in vivo. *Neuroreport* 11:3265-3268.
198. Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. (2002) Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends in neurosciences* 25:412-417.
199. Tyler WJ, Pozzo-Miller L (2003) Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *The Journal of physiology* 553:497-509.
200. Vacaresse N, Moller B, Danielsen EM, Okada M, Sap J (2008) Activation of c-Src and Fyn kinases by protein-tyrosine phosphatase RPTPalph is substrate-specific and compatible with lipid raft localization. *The Journal of biological chemistry* 283:35815-35824.
201. Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S (2005) Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:5236-5247.
202. van der Sluijs P, Hoogenraad CC (2011) New insights in endosomal dynamics and AMPA receptor trafficking. *Seminars in cell & developmental biology* 22:499-505.
203. van Wingen G, Rijpkema M, Franke B, van Eijndhoven P, Tendolkar I, Verkes RJ, Buitelaar J, Fernandez G (2010) The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism affects memory formation and retrieval of biologically salient stimuli. *NeuroImage* 50:1212-1218.
204. Varga A, Szabo J, Flachner B, Gugolya Z, Vonderviszt F, Zavodszky P, Vas M (2009) Thermodynamic analysis of substrate induced domain closure of 3-phosphoglycerate kinase. *FEBS Lett* 583:3660-3664.
205. Volker KW, Knull H (1997) A glycolytic enzyme binding domain on tubulin. *Archives of biochemistry and biophysics* 338:237-243.
206. Wang H, Hu Y, Tsien JZ (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in neurobiology* 79:123-135.



207. Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Jr., Karcher R, Li XD, Davison IG, Ikebe M, Mercer JA, Kauer JA, Ehlers MD (2008) Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* 135:535-548.
208. Whittaker VP (1965) The application of subcellular fractionation techniques to the study of brain function. *Progress in biophysics and molecular biology* 15:39-96.
209. Wilson BS, Steinberg SL, Liederman K, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Zhang J, Samelson LE, Yang LH, Kotula PG, Oliver JM (2004) Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Molecular biology of the cell* 15:2580-2592.
210. Wong ML, Licinio J (2001) Research and treatment approaches to depression. *Nature reviews Neuroscience* 2:343-351.
211. Wu C, Butz S, Ying Y, Anderson RG (1997) Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 272:3554-3559.
212. Wu K, Xu JL, Suen PC, Levine E, Huang YY, Mount HT, Lin SY, Black IB (1996) Functional trkB neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density. *Brain research Molecular brain research* 43:286-290.
213. Wu YJ, Kruttgen A, Moller JC, Shine D, Chan JR, Shooter EM, Cosgaya JM (2004) Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 are sorted to dense-core vesicles and released via the regulated pathway in primary rat cortical neurons. *Journal of neuroscience research* 75:825-834.
214. Wyneken U, Sandoval M, Sandoval S, Jorquera F, Gonzalez I, Vargas F, Falcon R, Monari M, Orrego F (2006) Clinically relevant doses of fluoxetine and reboxetine induce changes in the TrkB content of central excitatory synapses. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31:2415-2423.
215. Wyneken U, Smalla KH, Marengo JJ, Soto D, de la Cerda A, Tischmeyer W, Grimm R, Boeckers TM, Wolf G, Orrego F, Gundelfinger ED (2001) Kainate-induced seizures alter protein composition and N-methyl-D-aspartate receptor function of rat forebrain postsynaptic densities. *Neuroscience* 102:65-74.
216. Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC (1997) Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *The Journal of comparative neurology* 378:135-157.

217. Yano H, Chao MV (2005) Biochemical characterization of intracellular membranes bearing Trk neurotrophin receptors. *Neurochemical research* 30:767-777.
218. Yao RQ, Qi DS, Yu HL, Liu J, Yang LH, Wu XX (2012) Quercetin attenuates cell apoptosis in focal cerebral ischemia rat brain via activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway. *Neurochemical research* 37:2777-2786.
219. Yashiro K, Philpot BD (2008) Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55:1081-1094.
220. Yin Y, Edelman GM, Vanderklish PW (2002) The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneuroosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:2368-2373.
221. Yu H, Chen ZY (2011) The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta pharmacologica Sinica* 32:3-11.
222. Zhang Y, Pardridge WM (2001) Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32:1378-1384.
223. Zheng J, Shen WH, Lu TJ, Zhou Y, Chen Q, Wang Z, Xiang T, Zhu YC, Zhang C, Duan S, Xiong ZQ (2008) Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. *The Journal of biological chemistry* 283:13280-13288.
224. Zhou B, Cai Q, Xie Y, Sheng ZH (2012) Snapin recruits dynein to BDNF-TrkB signaling endosomes for retrograde axonal transport and is essential for dendrite growth of cortical neurons. *Cell reports* 2:42-51.
225. Ziff EB (1997) Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* 19:1163-1174.
226. Zinchuk V, Grossenbacher-Zinchuk O (2009) Recent advances in quantitative colocalization analysis: focus on neuroscience. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 44:125-172.
227. Zinchuk V, Zinchuk O, Okada T (2007) Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta histochemica et cytochemica* 40:101-111.
228. Zonta B, Minichiello L (2013) Synaptic membrane rafts: traffic lights for local neurotrophin signaling? *Frontiers in synaptic neuroscience* 5:9.

Anexos

I. Carta de aprobación de protocolos por el comité de ética



Universidad de los Andes
Santiago-Chile

Santiago de Chile, 10 de Mayo de 2006

Doctora
Ursula Wyneken
Laboratorio de Neurociencias
Facultad de Medicina
Universidad de los Andes
Santiago
CHILE

Estimada Dra Wyneken:

Acuso recibo, para examen de este Comité, de los documentos relativos al Proyecto Anillo "Centro para el estudio del estrés y fármacos antidepressivos: desde mecanismos celulares a la clínica" a desarrollarse en conjunto con otras instituciones universitarias.

Luego de examinados los documentos, en las partes que competen a esta institución, y de haber conversado en detalle con uno de los investigadores participantes, estimamos que el diseño de esta investigación proyectada cumple con las exigencia de orden ético para la investigación científica biomédica en animales de experimentación. De acuerdo a la normativa de nuestro Comité le rogamos mantenernos informados acerca del cumplimiento de los aspectos éticos durante el desarrollo efectivo del Proyecto.

Sin otro particular, la saluda atentamente,

Dr. Alejandro Serani Merlo

Presidente

Comité de Ética

Facultad de Medicina, Universidad de los Andes

II. Total proteínas espectrometría de masas de balsas lipídicas

	Uniprot	Nombre
1	1433F_RAT	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta
2	1433G_RAT	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma
3	1433Z_RAT	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta
4	2AAB_RAT	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, beta
5	3MG_RAT	N-methylpurine-DNA glycosylase
6	4F2_RAT	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2
7	5HT5A_RAT	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A, G protein-coupled
8	A1CF_RAT	APOBEC1 complementation factor
9	A1M_RAT	pregnancy zone protein
10	AACS_RAT	acetoacetyl-CoA synthetase
11	AASD1_RAT	alanyl-tRNA synthetase domain containing 1
12	AASS_RAT	aminoadipate-semialdehyde synthase
13	ABCA2_RAT	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2
14	ABCA7_RAT	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7
15	ABCB7_RAT	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7
16	ABCC9_RAT	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9
17	ABCG8_RAT	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8
18	ABHGA_RAT	abhydrolase domain containing 16A
19	ABTB2_RAT	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2
20	ACACA_RAT	acetyl-CoA carboxylase alpha
21	ACADS_RAT	acyl-CoA dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain
22	ACE_RAT	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1
23	ACLY_RAT	ATP citrate lyase
24	ACMSD_RAT	aminocarboxymuconate semialdehyde decarboxylase
25	ACOC_RAT	aconitase 1, soluble
26	ACSM2_RAT	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2A
27	ACSM3_RAT	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3
28	ACTB_RAT	actin, beta
29	ACTG_RAT	actin, gamma 1
30	ACTN1_RAT	actinin, alpha 1

31	ACV1B_RAT	activin A receptor, type IB
32	ACVR1_RAT	activin A receptor, type I
33	ADA18_RAT	ADAM metallopeptidase domain 18
34	ADAM7_RAT	ADAM metallopeptidase domain 7
35	ADCY4_RAT	adenylate cyclase 4
36	ADCY8_RAT	adenylate cyclase 8 (brain)
37	ADCYA_RAT	adenylate cyclase 10 (soluble)
38	ADIP_RAT	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein
39	ADO_RAT	aldehyde oxidase 1
40	AFAD_RAT	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)
41	AGAP2_RAT	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2
42	AGRIN_RAT	agrin
43	AKA11_RAT	A kinase (PRKA) anchor protein 11
44	AKA12_RAT	A kinase (PRKA) anchor protein 12
45	AKAP4_RAT	A kinase (PRKA) anchor protein 4
46	AKAP6_RAT	A kinase (PRKA) anchor protein 6
47	AL1A1_RAT	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
48	ALBU_RAT	albumin
49	ALEX_RAT	GNAS complex locus
50	AMPD1_RAT	adenosine monophosphate deaminase 1
51	AMPE_RAT	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)
52	AMPN_RAT	alanyl (membrane) aminopeptidase
53	ANKL2_RAT	ankyrin repeat and LEM domain containing 2
54	ANPRB_RAT	natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B (atrionatriuretic peptide receptor B)
55	ANXA6_RAT	annexin A6
56	AP2A2_RAT	adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit
57	AP2B1_RAT	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit
58	APBA1_RAT	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 1
59	APBA2_RAT	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2
60	APBA3_RAT	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3
61	APC_RAT	adenomatous polyposis coli
62	APC5_RAT	anaphase promoting complex subunit 5
63	APOB_RAT	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)
64	APOE_RAT	apolipoprotein E
65	ARAF_RAT	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog
66	ARBK2_RAT	adrenergic, beta, receptor kinase 2
67	ARC1A_RAT	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa
68	ARFP2_RAT	ADP-ribosylation factor interacting protein 2
69	ARGI1_RAT	arginase, liver

70	ARHG2_RAT	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2
71	ARI4B_RAT	AT rich interactive domain 4B (RBP1-like)
72	ARMC9_RAT	armadillo repeat containing 9
73	ARRB2_RAT	arrestin, beta 2
74	ARSB_RAT	arylsulfatase B
75	AT12A_RAT	ATPase, H ⁺ /K ⁺ transporting, nongastric, alpha polypeptide
76	AT1A1_RAT	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide
77	AT1A2_RAT	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide
78	AT1A3_RAT	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3 polypeptide
79	AT2A3_RAT	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, ubiquitous
80	AT2B1_RAT	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1
81	AT2B2_RAT	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2
82	AT2B4_RAT	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4
83	ATLA3_RAT	atlastin GTPase 3
84	ATP7B_RAT	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide
85	ATPA_RAT	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle
86	ATPB_RAT	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
87	ATPG_RAT	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
88	ATRN_RAT	atractin
89	ATS1_RAT	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1
90	ATS4_RAT	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 4
91	AZIN1_RAT	antizyme inhibitor 1
92	B3A2_RAT	solute carrier family 4, anion exchanger, member 2
93	BACD2_RAT	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)
94	BAIP2_RAT	BAI1-associated protein 2
95	BAKOR_RAT	autophagy related 14
96	BCAM_RAT	basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)
97	BCKD_RAT	branched chain ketoacid dehydrogenase kinase
98	BECN1_RAT	beclin 1, autophagy related
99	BGAT1_RAT	ABO blood group (transferase A, alpha 1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase)
100	BI2L1_RAT	BAI1-associated protein 2-like 1
101	BODG_RAT	butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma-butyrobetaine hydroxylase)
102	BOP1_RAT	block of proliferation 1
103	BOREA_RAT	cell division cycle associated 8
104	BRCA1_RAT	breast cancer 1, early onset
105	BRCA2_RAT	breast cancer 2, early onset
106	BRE_RAT	brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)
107	BSN_RAT	bassoon (presynaptic cytomatrix protein)
108	C11B1_RAT	cytochrome P450, family 11, subfamily b, polypeptide 1

109	C1GLC_RAT	C1GALT1-specific chaperone 1
110	C1GLT_RAT	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase
111	C1QR1_RAT	CD93 molecule
112	C2D1A_RAT	coiled-coil and C2 domain containing 1A
113	CA112_RAT	chromosome 1 open reading frame 112
114	CA114_RAT	chromosome 1 open reading frame 114
115	CA2D2_RAT	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2
116	CABIN_RAT	calcineurin binding protein 1
117	CAC1A_RAT	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
118	CAC1B_RAT	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit
119	CAC1D_RAT	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit
120	CAC1E_RAT	calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit
121	CAC1G_RAT	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit
122	CAC1I_RAT	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1I subunit
123	CACO1_RAT	calcium binding and coiled-coil domain 1
124	CACP_RAT	carnitine O-acetyltransferase
125	CADH7_RAT	cadherin 7, type 2
126	CALR_RAT	calreticulin
127	CALX_RAT	calnexin
128	CALY_RAT	calcyon neuron-specific vesicular protein
129	CAND2_RAT	cullin-associated and neddylation-dissociated 2 (putative)
130	CAPS1_RAT	Ca ⁺⁺ -dependent secretion activator
131	CASP2_RAT	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
132	CASP3_RAT	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
133	CATA_RAT	catalase
134	CBLB_RAT	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase B
135	CBLN1_RAT	cerebellin 1 precursor
136	CBS_RAT	cystathionine-beta-synthase
137	CC037_RAT	chromosome 3 open reading frame 37
138	CCD47_RAT	coiled-coil domain containing 47
139	CCD51_RAT	coiled-coil domain containing 51
140	CCD67_RAT	coiled-coil domain containing 67
141	CCD93_RAT	coiled-coil domain containing 93
142	CD38_RAT	CD38 molecule
143	CDC20_RAT	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
144	CDC27_RAT	cell division cycle 27 homolog (S. cerevisiae)
145	CDC42_RAT	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)
146	CDK1_RAT	cyclin-dependent kinase 1
147	CELR2_RAT	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, Drosophila)

148	CELR3_RAT	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 (flamingo homolog, Drosophila)
149	CENPQ_RAT	centromere protein Q
150	CF089_RAT	chromosome 6 open reading frame 89
151	CFTR_RAT	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C)
152	CG010_RAT	chromosome 7 open reading frame 10
153	CGL_RAT	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
154	CH60_RAT	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
155	CHKA_RAT	choline kinase alpha
156	CHM4C_RAT	charged multivesicular body protein 4C
157	CHRD_RAT	chordin
158	CI117_RAT	chromosome 9 open reading frame 117
159	CK5P1_RAT	CDK5 regulatory subunit associated protein 1
160	CL050_RAT	chromosome 12 open reading frame 50
161	CLAP2_RAT	cytoplasmic linker associated protein 2
162	CLC4F_RAT	C-type lectin domain family 4, member F
163	CLH_RAT	clathrin, heavy chain (Hc)
164	CLPB_RAT	ClpB caseinolytic peptidase B homolog (E. coli)
165	CLPX_RAT	ClpX caseinolytic peptidase X homolog (E. coli)
166	CLUS_RAT	clusterin
167	CN37_RAT	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
168	CN37_RAT	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
169	CNKR2_RAT	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 2
170	CNKR3_RAT	CNKSR family member 3
171	CNNM2_RAT	cyclin M2
172	CNOT6_RAT	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6
173	CNOTA_RAT	CCR4-NOT transcription complex, subunit 10
174	CNR2_RAT	cannabinoid receptor 2 (macrophage)
175	CNTN1_RAT	contactin 1
176	CNTN4_RAT	contactin 4
177	CNTP1_RAT	contactin associated protein 1
178	CO1A1_RAT	collagen, type I, alpha 1
179	CO1A2_RAT	collagen, type I, alpha 2
180	CO2A1_RAT	collagen, type II, alpha 1
181	CO3_RAT	complement component 3
182	CO3A1_RAT	collagen, type III, alpha 1
183	CO4_RAT	complement component 4B (Chido blood group)
184	CO5A1_RAT	collagen, type V, alpha 1
185	CO6_RAT	complement component 6
186	COBA1_RAT	collagen, type XI, alpha 1

187	COL12_RAT	collectin sub-family member 12
188	CORA1_RAT	collagen, type XXVII, alpha 1
189	CORIN_RAT	corin, serine peptidase
190	CORO6_RAT	coronin 6
191	COT2_RAT	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
192	CP21A_RAT	cytochrome P450, family 21, subfamily A, polypeptide 2
193	CP2D3_RAT	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6
194	CP3AI_RAT	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 43
195	CP4AA_RAT	cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11
196	CP4AE_RAT	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14
197	CPNE9_RAT	copine family member IX
198	CPT1A_RAT	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)
199	CPT1B_RAT	carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle)
200	CREL2_RAT	cysteine-rich with EGF-like domains 2
201	CRF_RAT	corticotropin releasing hormone
202	CRHBP_RAT	corticotropin releasing hormone binding protein
203	CRLF2_RAT	cytokine receptor-like factor 2
204	CRNL1_RAT	crooked neck pre-mRNA splicing factor-like 1 (Drosophila)
205	CSF1R_RAT	colony stimulating factor 1 receptor
206	CSKI1_RAT	CASK interacting protein 1
207	CSPG2_RAT	versican
208	CSPG4_RAT	chondroitin sulfate proteoglycan 4
209	CSTN2_RAT	calsyntenin 2
210	CSTN3_RAT	calsyntenin 3
211	CTL1_RAT	solute carrier family 44, member 1
212	CTNB1_RAT	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
213	CTP5D_RAT	contactin associated protein-like 5C
214	CTU1_RAT	cytosolic thioridylase subunit 1 homolog (S. pombe)
215	CUBN_RAT	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)
216	CUZD1_RAT	CUB and zona pellucida-like domains 1
217	CX057_RAT	chromosome X open reading frame 57
218	CYTC_RAT	cystatin C
219	DAB2P_RAT	DAB2 interacting protein
220	DBNL_RAT	drebrin-like
221	DC1L2_RAT	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 2
222	DCLK2_RAT	doublecortin-like kinase 2
223	DCTN4_RAT	dynactin 4 (p62)
224	DCX_RAT	doublecortin
225	DCXR_RAT	dicarbonyl/L-xylulose reductase

226	DDI1_RAT	DNA-damage inducible 1 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
227	DDX4_RAT	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4
228	DEF3B_RAT	defensin RatNP-3 precursor
229	DEST_RAT	destrin (actin depolymerizing factor)
230	DGLA_RAT	diacylglycerol lipase, alpha
231	DHE3_RAT	glutamate dehydrogenase 1
232	DHX30_RAT	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30
233	DISC1_RAT	disrupted in schizophrenia 1
234	DLGP3_RAT	discs, large (<i>Drosophila</i>) homolog-associated protein 3
235	DLL1_RAT	delta-like 1 (<i>Drosophila</i>)
236	DNM3A_RAT	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha
237	DNMT1_RAT	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
238	DOPO_RAT	dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monoxygenase)
239	DPOD1_RAT	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit
240	DPOG1_RAT	polymerase (DNA directed), gamma
241	DPOLA_RAT	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit
242	DPYD_RAT	dihydropyrimidine dehydrogenase
243	DPYL2_RAT	dihydropyrimidinase-like 2
244	DRD1_RAT	dopamine receptor D1
245	DSG4_RAT	desmoglein 4
246	DTNB_RAT	dystrobrevin, beta
247	DUOX2_RAT	dual oxidase 2
248	DUS3L_RAT	dihydrouridine synthase 3-like (<i>S. cerevisiae</i>)
249	DYH1_RAT	dynein, axonemal, heavy chain 1
250	DYH12_RAT	dynein, axonemal, heavy chain 12
251	DYH7_RAT	dynein, axonemal, heavy chain 7
252	DYHC1_RAT	dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1
253	DYN1_RAT	dynamamin 1
254	DYN3_RAT	dynamamin 3
255	E2AK3_RAT	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3
256	E41L5_RAT	erythrocyte protein band 4.1-like 5
257	EAA1_RAT	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3
258	EAA2_RAT	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
259	EAA4_RAT	solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member 6
260	ECEL1_RAT	endothelin converting enzyme-like 1
261	EF2_RAT	eukaryotic translation elongation factor 2
262	EF2K_RAT	eukaryotic elongation factor-2 kinase
263	EFC4A_RAT	EF-hand calcium binding domain 4A
264	EFGM_RAT	G elongation factor, mitochondrial 1

265	EFHA1_RAT	EF-hand domain family, member A1
266	EGF_RAT	epidermal growth factor
267	EGLN3_RAT	egl nine homolog 3 (<i>C. elegans</i>)
268	EHD1_RAT	EH-domain containing 1
269	EHD3_RAT	EH-domain containing 3
270	EI2BG_RAT	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3 gamma, 58kDa
271	EIF3A_RAT	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A
272	EKI2_RAT	ethanolamine kinase 2
273	ELP1_RAT	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated
274	EMAL5_RAT	echinoderm microtubule associated protein like 5
275	ENPP3_RAT	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
276	EPAS1_RAT	endothelial PAS domain protein 1
277	EPHA3_RAT	EPH receptor A3
278	EPHA5_RAT	EPH receptor A5
279	EPHA7_RAT	EPH receptor A7
280	EPHB6_RAT	EPH receptor B6
281	EPN3_RAT	epsin 3
282	ERBB2_RAT	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene h2, neuro/glioblas derived oncogene
283	ERC2_RAT	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2
284	ERCC3_RAT	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3
285	ERO1A_RAT	ERO1-like (<i>S. cerevisiae</i>)
286	ERR1_RAT	estrogen-related receptor alpha
287	ERR3_RAT	estrogen-related receptor gamma
288	ESPN_RAT	espin
289	ESR1_RAT	estrogen receptor 1
290	EST4_RAT	carboxylesterase 1F
291	EXOC2_RAT	exocyst complex component 2
292	EXOC3_RAT	exocyst complex component 3
293	EXOC5_RAT	exocyst complex component 5
294	F10C1_RAT	fragile site, folic acid type, rare, fra(10)(q23.3) or fra(10)(q24.2) candidate 1
295	F13A_RAT	coagulation factor XIII, A1 polypeptide
296	F154A_RAT	similar to hypothetical protein MGC35182
297	F16P1_RAT	fructose-1,6-bisphosphatase 1
298	F16P2_RAT	fructose-1,6-bisphosphatase 2
299	F198B_RAT	family with sequence similarity 198, member B
300	FA48A_RAT	suppressor of Ty 20 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
301	FA71B_RAT	family with sequence similarity 71, member B
302	FA98A_RAT	family with sequence similarity 98, member A
303	FAF1_RAT	Fas (TNFRSF6) associated factor 1

304	FAS_RAT	fatty acid synthase
305	FAT2_RAT	FAT tumor suppressor homolog 2 (Drosophila)
306	FAT3_RAT	FAT tumor suppressor homolog 3 (Drosophila)
307	FBLN5_RAT	fibulin 5
308	FBRL_RAT	fibrillarlin
309	FBX11_RAT	F-box protein 11
310	FBX46_RAT	F-box protein 46
311	FER_RAT	fer (fps/fes related) tyrosine kinase
312	FETA_RAT	alpha-fetoprotein
313	FGD4_RAT	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4
314	FGF23_RAT	fibroblast growth factor 23
315	FGFR1_RAT	fibroblast growth factor receptor 1
316	FGFR4_RAT	fibroblast growth factor receptor 4
317	FINC_RAT	fibronectin 1
318	FLOT2_RAT	flotillin 2
319	FMO4_RAT	flavin containing monooxygenase 4
320	FNDC1_RAT	fibronectin type III domain containing 1
321	FOXM1_RAT	forkhead box M1
322	FSHR_RAT	follicle stimulating hormone receptor
323	FUT10_RAT	alpha3-fucosyltransferase
324	FZD4_RAT	frizzled family receptor 4
325	G3P_RAT	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
326	GABR1_RAT	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1
327	GABR2_RAT	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2
328	GABT_RAT	4-aminobutyrate aminotransferase
329	GAK_RAT	cyclin G associated kinase
330	GALR2_RAT	galanin receptor 2
331	GALT7_RAT	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypep N-acetylgalactosaminyltransferase 7
332	GAS6_RAT	growth arrest-specific 6
333	GASP1_RAT	G protein-coupled receptor associated sorting protein 1
334	GATA2_RAT	GATA binding protein 2
335	GATM_RAT	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)
336	GBA2_RAT	glucosidase, beta (bile acid) 2
337	GBRA5_RAT	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5
338	GCC2_RAT	GRIP and coiled-coil domain containing 2
339	GCNT3_RAT	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type
340	GCP60_RAT	acyl-CoA binding domain containing 3
341	GCYA2_RAT	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 2
342	GEPH_RAT	gephyrin

343	GGN_RAT	gametogenetin
344	GHC2_RAT	solute carrier family 25 (glutamate carrier), member 18
345	GLNA_RAT	coiled-coil domain containing 92
346	GLPK_RAT	glycerol kinase
347	GLSL_RAT	glutaminase 2 (liver, mitochondrial)
348	GLT13_RAT	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypep N-acetylgalactosaminyltransferase 13
349	GLTP_RAT	glycolipid transfer protein
350	GLYAT_RAT	glycine-N-acyltransferase
351	GLYG_RAT	glycogenin 1
352	GNAL_RAT	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypep, olfactory
353	GNAO_RAT	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypep O
354	GON4L_RAT	gon-4-like (C. elegans)
355	GORAB_RAT	golgin, RAB6-interacting
356	GP116_RAT	G protein-coupled receptor 116
357	GP156_RAT	G protein-coupled receptor 156
358	GP173_RAT	G protein-coupled receptor 173
359	GPC1_RAT	glypican 1
360	GPC2_RAT	glypican 2
361	GPDM_RAT	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)
362	GPHA2_RAT	glycoprotein hormone alpha 2
363	GPSM1_RAT	G-protein signaling modulator 1
364	GRAK_RAT	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)
365	GRAM3_RAT	GRAM domain containing 3
366	GRID1_RAT	glutamate receptor, ionotropic, delta 1
367	GRIK4_RAT	glutamate receptor, ionotropic, kainate 4
368	GRIP2_RAT	glutamate receptor interacting protein 2
369	GRK5_RAT	G protein-coupled receptor kinase 5
370	GRM1_RAT	glutamate receptor, metabotropic 1
371	GRM5_RAT	glutamate receptor, metabotropic 5
372	GRM8_RAT	glutamate receptor, metabotropic 8
373	GRN_RAT	granulin
374	GRP_RAT	gastrin-releasing peptide
375	GSDMC_RAT	gasdermin C
376	GSK3A_RAT	glycogen synthase kinase 3 alpha
377	GSLG1_RAT	golgi glycoprotein 1
378	GSTT2_RAT	glutathione S-transferase theta 2
379	GUC2D_RAT	guanylate cyclase 2E, pseudogene
380	GUC2F_RAT	guanylate cyclase 2F, retinal
381	H2A1_RAT	histone cluster 2, H2aa3

382	HACL1_RAT	2-hydroxyacyl-CoA lyase 1
383	HAIR_RAT	hair growth associated
384	HAT1_RAT	histone acetyltransferase 1
385	HCN4_RAT	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4
386	HEAT6_RAT	HEAT repeat containing 6
387	HEM3_RAT	hydroxymethylbilane synthase
388	HEP2_RAT	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1
389	HEXB_RAT	hexosaminidase B (beta polypeptide)
390	HINT3_RAT	histidine triad nucleotide binding protein 3
391	HIPK3_RAT	homeodomain interacting protein kinase 3
392	HMGB1_RAT	high mobility group box 1
393	HNRPD_RAT	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa)
394	HNRPM_RAT	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
395	HOME2_RAT	homer homolog 2 (Drosophila)
396	HPCL1_RAT	hippocalcin-like 1
397	HS105_RAT	heat shock 105kDa/110kDa protein 1
398	HS71L_RAT	heat shock protein 1-like
399	HSP72_RAT	heat shock 70kDa protein 2
400	HSP7C_RAT	heat shock 70kDa protein 8
401	HTF4_RAT	transcription factor 12
402	HXK1_RAT	hexokinase 1
403	HXK3_RAT	hexokinase 3 (white cell)
404	HYALP_RAT	sperm adhesion molecule 1
405	HYES_RAT	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
406	HYOU1_RAT	hypoxia up-regulated 1
407	ICA1L_RAT	islet cell autoantigen 1,69kDa-like
408	IGF1R_RAT	insulin-like growth factor 1 receptor
409	IGS10_RAT	immunoglobulin superfamily, member 10
410	IKKB_RAT	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
411	IL4RA_RAT	interleukin 4 receptor
412	IL6RA_RAT	interleukin 6 receptor
413	ILF2_RAT	interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa
414	ILF3_RAT	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa
415	ILK_RAT	integrin-linked kinase
416	IMB1_RAT	karyopherin (importin) beta 1
417	INO80E_RAT	INO80 complex subunit E
418	INSR_RAT	insulin receptor
419	INSRR_RAT	insulin receptor-related receptor
420	IP6K2_RAT	inositol hexakisphosphate kinase 2

421	IPPK_RAT	inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase
422	IQCAL_RAT	RIKEN cDNA 4931409K22 gene
423	IQEC3_RAT	IQ motif and Sec7 domain 3
424	IRK3_RAT	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3
425	IRK5_RAT	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5
426	IRPL1_RAT	interleukin 1 receptor accessory protein-like 1
427	IRS1_RAT	insulin receptor substrate 1
428	ITA1_RAT	integrin, alpha 1
429	ITB1_RAT	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29, MDF2, MSK12)
430	ITB4_RAT	integrin, beta 4
431	ITGBL_RAT	integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)
432	ITPR1_RAT	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1
433	ITPR2_RAT	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2
434	ITPR3_RAT	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 3
435	IWS1_RAT	IWS1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
436	JAG1_RAT	jagged 1
437	K1731_RAT	KIAA1731
438	K1C10_RAT	keratin 10
439	K1C17_RAT	keratin 17
440	K1C18_RAT	keratin 18
441	K1C24_RAT	keratin 24
442	K1C42_RAT	keratin 42
443	K22E_RAT	keratin 2
444	K2C1_RAT	keratin 1
445	K2C72_RAT	keratin 72
446	K2C73_RAT	keratin 73
447	K2C75_RAT	keratin 75
448	K6PF_RAT	phosphofructokinase, muscle
449	K6PL_RAT	phosphofructokinase, liver
450	K6PP_RAT	phosphofructokinase, platelet
451	KALRN_RAT	kalirin, RhoGEF kinase
452	KAP3_RAT	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
453	KATL1_RAT	katanin p60 subunit A-like 1
454	KCAB1_RAT	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1
455	KCC1A_RAT	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I
456	KCC2A_RAT	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
457	KCC2D_RAT	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta
458	KCMA1_RAT	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1
459	KCNA3_RAT	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3

460	KCNH4_RAT	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 4
461	KCNH8_RAT	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 8
462	KCNKA_RAT	potassium channel, subfamily K, member 10
463	KCNKC_RAT	potassium channel, subfamily K, member 12
464	KCNN3_RAT	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, 3
465	KCNN4_RAT	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, 4
466	KCNQ2_RAT	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2
467	KCNQ3_RAT	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 3
468	KCNT1_RAT	potassium channel, subfamily T, member 1
469	KCNT2_RAT	potassium channel, subfamily T, member 2
470	KDM3A_RAT	lysine (K)-specific demethylase 3A
471	KIF15_RAT	kinesin family member 15
472	KIF1B_RAT	kinesin family member 1B
473	KIF27_RAT	kinesin family member 27
474	KIF5A_RAT	kinesin family member 5A
475	KINH_RAT	kinesin family member 5B
476	KIRR1_RAT	kin of IRRE like (Drosophila)
477	KKCC2_RAT	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta
478	KLH21_RAT	kelch-like 21 (Drosophila)
479	KLHL7_RAT	kelch-like 7 (Drosophila)
480	KLK2_RAT	kallikrein 1
481	KPCB_RAT	protein kinase C, beta
482	KPCD1_RAT	protein kinase D1
483	KPCG_RAT	protein kinase C, gamma
484	KPCZ_RAT	protein kinase C, zeta
485	KPRB_RAT	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2
486	KPYM_RAT	pyruvate kinase, muscle
487	KS6B1_RAT	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
488	LAMB2_RAT	laminin, beta 2 (laminin S)
489	LAMP1_RAT	lysosomal-associated membrane protein 1
490	LARG2_RAT	glycosyltransferase-like 1B
491	LAT1_RAT	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5
492	LDHA_RAT	lactate dehydrogenase A
493	LDHB_RAT	lactate dehydrogenase B
494	LDLR_RAT	low density lipoprotein receptor
495	LIMK2_RAT	LIM domain kinase 2
496	LIN7C_RAT	lin-7 homolog C (C. elegans)
497	LIPA4_RAT	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypep (PTPRF), interact protein (liprin)
498	LIPS_RAT	lipase, hormone-sensitive

499	LMBL2_RAT	I(3)mbt-like 2 (<i>Drosophila</i>)
500	LMP1_RAT	lens intrinsic membrane protein 2, 19kDa
501	LMOD2_RAT	leiomodulin 2 (cardiac)
502	LONM_RAT	lon peptidase 1, mitochondrial
503	LPH_RAT	lactase
504	LPHN3_RAT	latrophilin 3
505	LPP60_RAT	asparaginase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
506	LPPR4_RAT	lipid phosphate phosphatase-related protein type 4
507	LRC66_RAT	leucine rich repeat containing 66
508	LRFN1_RAT	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 1
509	LRP2_RAT	low density lipoprotein receptor-related protein 2
510	LRP4_RAT	low density lipoprotein receptor-related protein 4
511	LRRC4_RAT	leucine rich repeat containing 4
512	LRRF1_RAT	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
513	LRRN1_RAT	leucine rich repeat neuronal 1
514	LSAMP_RAT	limbic system-associated membrane protein
515	LSHR_RAT	luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
516	LT4R2_RAT	leukotriene B4 receptor 2
517	LTBP1_RAT	latent transforming growth factor beta binding protein 1
518	LTBP2_RAT	latent transforming growth factor beta binding protein 2
519	LUZP1_RAT	leucine zipper protein 1
520	LYAG_RAT	glucosidase, alpha; acid
521	LZTS1_RAT	leucine zipper, putative tumor suppressor 1
522	M2GD_RAT	dimethylglycine dehydrogenase
523	M2OM_RAT	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11
524	M3K1_RAT	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase
525	MACF1_RAT	microtubule-actin crosslinking factor 1
526	MADD_RAT	MAP-kinase activating death domain
527	MAGBG_RAT	melanoma antigen family B, 16
528	MAGI2_RAT	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2
529	MAGI3_RAT	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3
530	MAK_RAT	male germ cell-associated kinase
531	MANBA_RAT	mannosidase, beta A, lysosomal
532	MAP1A_RAT	microtubule-associated protein 1A
533	MAP1B_RAT	microtubule-associated protein 1B
534	MAP2_RAT	microtubule-associated protein 2
535	MAP6_RAT	microtubule-associated protein 6
536	MARK1_RAT	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1
537	MARK2_RAT	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2

538	MAST1_RAT	microtubule associated serine/threonine kinase 1
539	MBP_RAT	myelin basic protein
540	MCAT_RAT	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20
541	MCCB_RAT	methylcrotonoyl-CoA carboxylase 2 (beta)
542	MDR1_RAT	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
543	MED22_RAT	mediator complex subunit 22
544	MED23_RAT	mediator complex subunit 23
545	MED24_RAT	mediator complex subunit 24
546	MEGF6_RAT	multiple EGF-like-domains 6
547	MEGF8_RAT	multiple EGF-like-domains 8
548	MET_RAT	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
549	METRN_RAT	meteorin, glial cell differentiation regulator
550	MFGM_RAT	milk fat globule-EGF factor 8 protein
551	MFN2_RAT	mitofusin 2
552	MFRN1_RAT	solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter), member 37
553	MGAT1_RAT	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
554	MGLL_RAT	monoglyceride lipase
555	MGT5A_RAT	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase
556	MK13_RAT	mitogen-activated protein kinase 13
557	MLH1_RAT	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
558	MMP16_RAT	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
559	MMSA_RAT	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1
560	MNS1_RAT	meiosis-specific nuclear structural 1
561	MOG_RAT	myelin oligodendrocyte glycoprotein
562	MOT3_RAT	solute carrier family 16, member 8 (monocarboxylic acid transporter 3)
563	MPDZ_RAT	multiple PDZ domain protein
564	MPEG1_RAT	macrophage expressed 1
565	MPP4_RAT	membrane protein, palmitoylated 4 (MAGUK p55 subfamily member 4)
566	MPRIP_RAT	myosin phosphatase Rho interacting protein
567	MRC2_RAT	mannose receptor, C type 2
568	MRCKA_RAT	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
569	MRCKB_RAT	CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)
570	MRP1_RAT	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1
571	MRP3_RAT	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
572	MRP5_RAT	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5
573	MT1_RAT	metallothionein 1E
574	MUC2_RAT	mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming
575	MUC2L_RAT	similar to Intestinal mucin-like protein (MLP)
576	MUC4_RAT	mucin 4, cell surface associated

577	MUTYH_RAT	mutY homolog (E. coli)
578	MYH10_RAT	myosin, heavy chain 10, non-muscle
579	MYH3_RAT	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic
580	MYH4_RAT	myosin, heavy chain 4, skeletal muscle
581	MYH7_RAT	myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta
582	MYH9_RAT	myosin, heavy chain 9, non-muscle
583	MYO16_RAT	myosin XVI
584	MYO1E_RAT	myosin IE
585	MYO5A_RAT	myosin VA (heavy chain 12, myoxin)
586	MYO5B_RAT	myosin VB
587	MYO9A_RAT	myosin IXA
588	MYOME_RAT	phosphodiesterase 4D interacting protein
589	MYT1L_RAT	myelin transcription factor 1-like
590	NAA25_RAT	N(alpha)-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit
591	NAGK_RAT	N-acetylglucosamine kinase
592	NAGT1_RAT	cDNA sequence BC021785
593	NALP6_RAT	NLR family, pyrin domain containing 6
594	NB5R1_RAT	cytochrome b5 reductase 1
595	NBN_RAT	nibrin
596	NCDN_RAT	neurochondrin
597	NCKX1_RAT	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 1
598	NCKX3_RAT	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3
599	NCOA2_RAT	nuclear receptor coactivator 2
600	NCOA3_RAT	nuclear receptor coactivator 3
601	NCOAT_RAT	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)
602	NDC1_RAT	transmembrane protein 48
603	NELL1_RAT	NEL-like 1 (chicken)
604	NELL2_RAT	NEL-like 2 (chicken)
605	NEO1_RAT	neogenin 1
606	NEST_RAT	nestin
607	NET1_RAT	netrin 1
608	NEUA_RAT	cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase
609	NF1_RAT	neurofibromin 1
610	NFASC_RAT	neurofascin
611	NHLC1_RAT	NHL repeat containing 1
612	NIBAN_RAT	family with sequence similarity 129, member A
613	NISCH_RAT	nischarin
614	NLRX1_RAT	NLR family member X1
615	NMD3A_RAT	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3A

616	NMDE1_RAT	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A
617	NMDE4_RAT	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2D
618	NMDZ1_RAT	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
619	NMT1_RAT	N-myristoyltransferase 1
620	NOLC1_RAT	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1
621	NOS3_RAT	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)
622	NOSTN_RAT	nitric oxide synthase trafficker
623	NOTC1_RAT	notch 1
624	NOTC2_RAT	notch 2
625	NOTC3_RAT	notch 3
626	NPCL1_RAT	NPC1-like 1
627	NPHN_RAT	nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin)
628	NPTN_RAT	neuroplastin
629	NR1I3_RAT	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3
630	NR4A3_RAT	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
631	NRDC_RAT	nardilysin (N-arginine dibasic convertase)
632	NRX1A_RAT	neurexin 1
633	NRX2A_RAT	neurexin 2
634	NRX3A_RAT	neurexin 3
635	NSE1_RAT	non-SMC element 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
636	NSF_RAT	N-ethylmaleimide-sensitive factor
637	NT5D2_RAT	5'-nucleotidase domain containing 2
638	NTRK2_RAT	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
639	NU153_RAT	nucleoporin 153kDa
640	NUBP1_RAT	nucleotide binding protein 1
641	NUD18_RAT	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 18
642	NUD19_RAT	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19
643	NUP50_RAT	nucleoporin 50kDa
644	NUP54_RAT	nucleoporin 54kDa
645	NUP98_RAT	nucleoporin 98kDa
646	ODC_RAT	solute carrier family 25 (mitochondrial oxoadipate carrier), member 21
647	ODFP4_RAT	outer dense fiber of sperm tails 4
648	ODP2_RAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase
649	ODPAT_RAT	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 2
650	OGG1_RAT	8-oxoguanine DNA glycosylase
651	OPCM_RAT	opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
652	ORC1_RAT	origin recognition complex, subunit 1
653	OREX_RAT	hypocretin (orexin) neuropeptide precursor
654	OSGEP_RAT	O-sialoglycoprotein endopeptidase

655	OST48_RAT	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase
656	OTOF_RAT	otoferlin
657	OX1R_RAT	hypocretin (orexin) receptor 1
658	P2RX2_RAT	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2
659	P3C2G_RAT	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 gamma
660	P63_RAT	tumor protein p63
661	P85A_RAT	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
662	P85B_RAT	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)
663	PACS1_RAT	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1
664	PAI1_RAT	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member
665	PALLD_RAT	similar to palladin
666	PAN2_RAT	PAN2 poly(A) specific ribonuclease subunit homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
667	PARD3_RAT	par-3 partitioning defective 3 homolog (<i>C. elegans</i>)
668	PARG_RAT	poly (ADP-ribose) glycohydrolase
669	PCCB_RAT	propionyl CoA carboxylase, beta polypeptide
670	PCLO_RAT	piccolo (presynaptic cytomatrix protein)
671	PCSK5_RAT	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5
672	PCSK6_RAT	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6
673	PCSK7_RAT	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7
674	PCYOX_RAT	prenylcysteine oxidase 1
675	PDE10_RAT	phosphodiesterase 10A
676	PDE12_RAT	phosphodiesterase 12
677	PDE3B_RAT	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited
678	PDE4A_RAT	phosphodiesterase 4A, cAMP-specific
679	PDGFD_RAT	platelet derived growth factor D
680	PDIA5_RAT	protein disulfide isomerase family A, member 5
681	PDS5A_RAT	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
682	PDS5B_RAT	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
683	PDZD2_RAT	PDZ domain containing 2
684	PE2R4_RAT	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
685	PELP1_RAT	proline, glutamate and leucine rich protein 1
686	PERF_RAT	perforin 1 (pore forming protein)
687	PGAM2_RAT	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)
688	PGFS_RAT	family with sequence similarity 213, member B
689	PGH1_RAT	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase
690	PHRF1_RAT	PHD and ring finger domains 1
691	PI4KB_RAT	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, beta
692	PI5PA_RAT	inositol polyphosphate-5-phosphatase J
693	PIGR_RAT	polymeric immunoglobulin receptor

694	PKHA4_RAT	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) 4
695	PKHG5_RAT	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) 5
696	PKN2_RAT	protein kinase N2
697	PKR1_RAT	prokineticin receptor 1
698	PLB1_RAT	phospholipase B1
699	PLBL2_RAT	phospholipase B domain containing 2
700	PLCG1_RAT	phospholipase C, gamma 1
701	PLCL1_RAT	phospholipase C-like 1
702	PLD1_RAT	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific
703	PLD2_RAT	phospholipase D2
704	PLEC_RAT	plectin
705	PLK2_RAT	polo-like kinase 2
706	PLK4_RAT	polo-like kinase 4
707	PLPL7_RAT	patatin-like phospholipase domain containing 7
708	PLPP_RAT	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase
709	PLVAP_RAT	plasmalemma vesicle associated protein
710	PMFBP_RAT	polyamine modulated factor 1 binding protein 1
711	PNCB_RAT	nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1
712	PORIM_RAT	transmembrane protein 123
713	PP1R7_RAT	protein phosphatase 1, regulatory subunit 7
714	PP1RA_RAT	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10
715	PP2BA_RAT	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme
716	PPARG_RAT	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
717	PRG2_RAT	proteoglycan 2, bone marrow (natural killer cell activator)
718	PRGC2_RAT	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta
719	PRGR_RAT	progesterone receptor
720	PROM2_RAT	prominin 2
721	PROS_RAT	protein S (alpha)
722	PRP4B_RAT	PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B (yeast)
723	PRS6B_RAT	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4
724	PRUNE_RAT	prune homolog (Drosophila)
725	PSMD1_RAT	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1
726	PSMD2_RAT	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2
727	PSPC1_RAT	paraspeckle component 1
728	PTBP2_RAT	polypyrimidine tract binding protein 2
729	PTN23_RAT	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23
730	PTPR2_RAT	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2
731	PTPRQ_RAT	protein tyrosine phosphatase, receptor type, Q
732	PTPRR_RAT	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R

733	PYC_RAT	pyruvate carboxylase
734	PYGB_RAT	phosphorylase, glycogen; brain
735	PYGL_RAT	phosphorylase, glycogen, liver
736	QN1_RAT	KIAA1009
737	RAB10_RAT	RAB10, member RAS oncogene family
738	RAB21_RAT	RAB21, member RAS oncogene family
739	RABE1_RAT	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1
740	RAE1L_RAT	RAE1 RNA export 1 homolog (S. pombe)
741	RASA1_RAT	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1
742	RASA2_RAT	RAS p21 protein activator 2
743	RAVR1_RAT	ribonucleoprotein, PTB-binding 1
744	RB612_RAT	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1
745	RELN_RAT	reelin
746	REPI1_RAT	replication initiator 1
747	RETST_RAT	retinol saturase (all-trans-retinol 13,14-reductase)
748	RGMC_RAT	hemochromatosis type 2 (juvenile)
749	RGS12_RAT	regulator of G-protein signaling 12
750	RGS14_RAT	regulator of G-protein signaling 14
751	RHDF1_RAT	rhomboid 5 homolog 1 (Drosophila)
752	RHG07_RAT	deleted in liver cancer 1
753	RHG20_RAT	Rho GTPase activating protein 20
754	RHG29_RAT	Rho GTPase activating protein 29
755	RIMB1_RAT	benzodiazapine receptor (peripheral) associated protein 1
756	RIMS1_RAT	regulating synaptic membrane exocytosis 1
757	RIMS2_RAT	regulating synaptic membrane exocytosis 2
758	RIPL2_RAT	Rab interacting lysosomal protein-like 2
759	RL13_RAT	ribosomal protein L13
760	RL18_RAT	ribosomal protein L18
761	RL31_RAT	ribosomal protein L31
762	RL37A_RAT	ribosomal protein L37a
763	RL6_RAT	ribosomal protein L6
764	RL7_RAT	ribosomal protein L7
765	RM02_RAT	mitochondrial ribosomal protein L2
766	RM37_RAT	mitochondrial ribosomal protein L37
767	RNH1_RAT	ribonuclease H1
768	RNH2A_RAT	ribonuclease H2, subunit A
769	RNS1D_RAT	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)
770	ROA1_RAT	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2
771	ROA3_RAT	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3

772	ROBO1_RAT	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)
773	ROBO4_RAT	roundabout, axon guidance receptor, homolog 4 (Drosophila)
774	ROCK2_RAT	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2
775	ROGDI_RAT	rogdi homolog (Drosophila)
776	RP3A_RAT	rabphilin 3A homolog (mouse)
777	RPA1_RAT	polymerase (RNA) I polypeptide A, 194kDa
778	RPAP1_RAT	RNA polymerase II associated protein 1
779	RPAP2_RAT	RNA polymerase II associated protein 2
780	RS16_RAT	ribosomal protein S16
781	RS26_RAT	ribosomal protein S26
782	RS3_RAT	ribosomal protein S3
783	RSAD2_RAT	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
784	RSMB_RAT	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1
785	RT15_RAT	mitochondrial ribosomal protein S15
786	RTN3_RAT	reticulon 3
787	S12A1_RAT	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 1
788	S13A5_RAT	solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5
789	S15A2_RAT	solute carrier family 15 (H ⁺ /peptide transporter), member 2
790	S22A7_RAT	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7
791	S22AH_RAT	solute carrier family 22, member 17
792	S27A5_RAT	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5
793	S41A3_RAT	solute carrier family 41, member 3
794	S4A10_RAT	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10
795	S4A4_RAT	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4
796	S4A5_RAT	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 5
797	S4A8_RAT	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 8
798	S6A13_RAT	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13
799	S6A18_RAT	solute carrier family 6, member 18
800	SAFB1_RAT	scaffold attachment factor B
801	SAP_RAT	prosaposin
802	SBNO1_RAT	strawberry notch homolog 1 (Drosophila)
803	SC5A2_RAT	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 2
804	SC6A1_RAT	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1
805	SCG1_RAT	chromogranin B (secretogranin 1)
806	SCLT1_RAT	sodium channel and clathrin linker 1
807	SCN1A_RAT	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit
808	SCN3A_RAT	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit
809	SCN4A_RAT	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha subunit
810	SCN5A_RAT	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit

811	SCNAA_RAT	sodium channel, voltage-gated, type X, alpha subunit
812	SCNBA_RAT	sodium channel, voltage-gated, type XI, alpha subunit
813	SCRB1_RAT	scavenger receptor class B, member 1
814	SEBP2_RAT	SECIS binding protein 2
815	SELT_RAT	selenoprotein T
816	SEM4F_RAT	sema domain, immunog domain, transmem domain (TM) and short cyto domain
817	SENP2_RAT	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2
818	SEP10_RAT	septin 10
819	SEPT7_RAT	septin 7
820	SFTPD_RAT	surfactant protein D
821	SFXN3_RAT	sideroflexin 3
822	SGPL1_RAT	sphingosine-1-phosphate lyase 1
823	SH3G2_RAT	SH3-domain GRB2-like 2
824	SH3R1_RAT	SH3 domain containing ring finger 1
825	SH3R2_RAT	SH3 domain containing ring finger 2
826	SHAN1_RAT	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1
827	SHAN2_RAT	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2
828	SHAN3_RAT	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3
829	SHC2_RAT	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 2
830	SHP1_RAT	signal-regulatory protein alpha
831	SI1L1_RAT	signal-induced proliferation-associated 1 like 1
832	SI1L2_RAT	signal-induced proliferation-associated 1 like 2
833	SIDT1_RAT	SID1 transmembrane family, member 1
834	SIN1_RAT	mitogen-activated protein kinase associated protein 1
835	SKA1_RAT	spindle and kinetochore associated complex subunit 1
836	SKOR1_RAT	SKI family transcriptional corepressor 1
837	SL9A2_RAT	solute carrier family 9, subfamily A (NHE2, cation proton antiporter 2), member 2
838	SL9A5_RAT	solute carrier family 9, subfamily A (NHE5, cation proton antiporter 5), member 5
839	SLIT1_RAT	slit homolog 1 (Drosophila)
840	SLIT3_RAT	slit homolog 3 (Drosophila)
841	SLK_RAT	STE20-like kinase
842	SMAD3_RAT	SMAD family member 3
843	SMAL1_RAT	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin
844	SMBT1_RAT	Scm-like with four mbt domains 1
845	SMC1A_RAT	structural maintenance of chromosomes 1A
846	SMC3_RAT	structural maintenance of chromosomes 3
847	SNED1_RAT	sushi, nidogen and EGF-like domains 1
848	SNP25_RAT	synaptosomal-associated protein, 25kDa
849	SNRK_RAT	SNF related kinase

850	SO1A1_RAT	solute carrier organic anion transporter family, member 1a1
851	SO1A3_RAT	predicted gene 6614
852	SO1A4_RAT	solute carrier organic anion transporter family, member 1a4
853	SO1C1_RAT	solute carrier organic anion transporter family, member 1C1
854	SO2B1_RAT	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1
855	SOBP_RAT	sine oculis binding protein homolog (Drosophila)
856	SOX11_RAT	SRY (sex determining region Y)-box 11
857	SPAT6_RAT	spermatogenesis associated 6
858	SPEF2_RAT	sperm flagellar 2
859	SPEG_RAT	SPEG complex locus
860	SPERT_RAT	spermatid associated
861	SPKAP_RAT	SPHK1 interactor, AKAP domain containing
862	SPT20_RAT	spermatogenesis associated 20
863	SPTN2_RAT	spectrin, beta, non-erythrocytic 2
864	SRBP1_RAT	sterol regulatory element binding transcription factor 1
865	SRBP2_RAT	sterol regulatory element binding transcription factor 2
866	SRC_RAT	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
867	SRCN1_RAT	SRC kinase signaling inhibitor 1
868	SSPO_RAT	SCO-spondin homolog (Bos taurus)
869	SSR2_RAT	somatostatin receptor 2
870	SSRP1_RAT	structure specific recognition protein 1
871	ST18_RAT	suppression of tumorigenicity 18 (breast carcinoma) (zinc finger protein)
872	STAB2_RAT	stabilin 2
873	STAG3_RAT	stromal antigen 3
874	STMN1_RAT	stathmin 1
875	STX1A_RAT	syntaxin 1A (brain)
876	STX1B_RAT	syntaxin 1B
877	STXB1_RAT	syntaxin binding protein 1
878	SULF1_RAT	sulfatase 1
879	SV2A_RAT	synaptic vesicle glycoprotein 2A
880	SVEP1_RAT	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1
881	SYAC_RAT	alanyl-tRNA synthetase
882	SYCE1_RAT	synaptonemal complex central element protein 1
883	SYCP1_RAT	synaptonemal complex protein 1
884	SYFA_RAT	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit
885	SYGP1_RAT	synaptic Ras GTPase activating protein 1
886	SYN2_RAT	synapsin II
887	SYN3_RAT	synapsin III
888	SYNJ1_RAT	synaptojanin 1

889	SYNJ2_RAT	synaptojanin 2
890	SYNPO_RAT	synaptopodin
891	SYT2_RAT	synaptotagmin II
892	SYVC_RAT	valyl-tRNA synthetase
893	TAF1C_RAT	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, C, 110kDa
894	TANC1_RAT	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1
895	TAU_RAT	microtubule-associated protein tau
896	TAXB1_RAT	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1
897	TBA1A_RAT	tubulin, alpha 1a
898	TBA1B_RAT	tubulin, alpha 1b
899	TBA1C_RAT	tubulin, alpha 1c
900	TBA4A_RAT	tubulin, alpha 4a
901	TBA4A_RAT	tubulin, alpha 4a
902	TBA8_RAT	tubulin, alpha 8
903	TBB2A_RAT	tubulin, beta 2A class IIa
904	TBB2B_RAT	tubulin, beta 2B class IIb
905	TBB3_RAT	tubulin, beta 3 class III
906	TBB5_RAT	tubulin, beta class I
907	TBL3_RAT	transducin (beta)-like 3
908	TBX5_RAT	T-box 5
909	TEN2_RAT	teneurin transmembrane protein 2
910	TENR_RAT	tenascin R
911	TENS4_RAT	tensin 4
912	TEP1_RAT	telomerase-associated protein 1
913	TF3C1_RAT	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa
914	TFF1_RAT	trefoil factor 1
915	TFP11_RAT	tuftelin interacting protein 11
916	TGBR3_RAT	transforming growth factor, beta receptor III
917	TGFI1_RAT	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
918	THIC_RAT	acetyl-CoA acetyltransferase 2
919	THIL_RAT	acetyl-CoA acetyltransferase 1
920	THY1_RAT	Thy-1 cell surface antigen
921	THYG_RAT	thyroglobulin
922	TM140_RAT	transmembrane protein 140
923	TMPS9_RAT	transmembrane protease, serine 9
924	TNNI3_RAT	troponin I type 3 (cardiac)
925	TNR16_RAT	nerve growth factor receptor
926	TNR8_RAT	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
927	TOP2A_RAT	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa

928	TOX3_RAT	TOX high mobility group box family member 3
929	TPIS_RAT	triosephosphate isomerase 1
930	TPM1_RAT	tropomyosin 1, alpha
931	TR143_RAT	taste receptor, type 2, member 143
932	TR150_RAT	thyroid hormone receptor associated protein 3
933	TRFE_RAT	transferrin
934	TRI18_RAT	midline 1 (Opitz/BBB syndrome)
935	TRIM9_RAT	tripartite motif containing 9
936	TRPA1_RAT	transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1
937	TRPC2_RAT	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2, pseudogene
938	TRPC3_RAT	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3
939	TRPM7_RAT	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7
940	TRPM8_RAT	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8
941	TRPV2_RAT	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2
942	TRPV4_RAT	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4
943	TRUA_RAT	pseudouridylate synthase 1
944	TS1R2_RAT	taste receptor, type 1, member 2
945	TSC2_RAT	tuberous sclerosis 2
946	TSP4_RAT	thrombospondin 4
947	TSPY1_RAT	testis specific protein, Y-linked 1
948	TTC5_RAT	tetratricopeptide repeat domain 5
949	UBAC1_RAT	UBA domain containing 1
950	UBR4_RAT	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4
951	UBR5_RAT	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5
952	UBTD1_RAT	ubiquitin domain containing 1
953	UCP1_RAT	uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)
954	UCP3_RAT	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)
955	UHRF1_RAT	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1
956	UN13A_RAT	unc-13 homolog A (C. elegans)
957	UN13B_RAT	unc-13 homolog B (C. elegans)
958	UN13C_RAT	unc-13 homolog C (C. elegans)
959	UN13D_RAT	unc-13 homolog D (C. elegans)
960	UN45A_RAT	unc-45 homolog A (C. elegans)
961	USH2A_RAT	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)
962	UTP15_RAT	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (S. cerevisiae)
963	VATB2_RAT	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B2
964	VATL_RAT	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 16kDa, V0 subunit c
965	VEGFC_RAT	vascular endothelial growth factor C
966	VGFR2_RAT	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)

967	VINC_RAT	vinculin
968	VMAT1_RAT	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1
969	VMAT2_RAT	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2
970	VP33B_RAT	vacuolar protein sorting 33 homolog B (yeast)
971	VPP1_RAT	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit a1
972	VPS4A_RAT	vacuolar protein sorting 4 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
973	VWA3A_RAT	von Willebrand factor A domain containing 3A
974	WASL_RAT	Wiskott-Aldrich syndrome-like
975	WDR44_RAT	WD repeat domain 44
976	WDR7_RAT	WD repeat domain 7
977	WDR91_RAT	WD repeat domain 91
978	WFKN1_RAT	WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 1
979	WHRN_RAT	deafness, autosomal recessive 31
980	WIF1_RAT	WNT inhibitory factor 1
981	WIPF1_RAT	WASWASL interacting protein family, member 1
982	WNK1_RAT	WNK lysine deficient protein kinase 1
983	XDH_RAT	xanthine dehydrogenase
984	XIRP2_RAT	xin actin-binding repeat containing 2
985	YRDC_RAT	yrdC domain containing (<i>E. coli</i>)
986	Z354A_RAT	zinc finger protein 354A
987	ZBT38_RAT	zinc finger and BTB domain containing 38
988	ZC3HE_RAT	zinc finger CCCH-type containing 14
989	ZCCHV_RAT	zinc finger CCCH-type, antiviral 1
990	ZEP2_RAT	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2
991	ZFAN6_RAT	zinc finger, AN1-type domain 6
992	ZFR_RAT	zinc finger RNA binding protein
993	ZFY27_RAT	zinc finger, FYVE domain containing 27
994	ZGPAT_RAT	zinc finger, CCCH-type with G patch domain
995	ZN423_RAT	zinc finger protein 423

III. ANEXO Sandoval v/s Suzuki 2011

	Uniprot	Nombre
1	NT5D2_RAT	5'-nucleotidase domain containing 2
2	THIL_RAT	acetyl-CoA acetyltransferase 1
3	AP2B1_RAT	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit
4	ATPB_RAT	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
5	AT1A2_RAT	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide
6	CA2D2_RAT	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2
7	CLH_RAT	clathrin, heavy chain (Hc)
8	CNTN1_RAT	contactin 1
9	CNTP1_RAT	contactin associated protein 1
10	ODP2_RAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase
11	DCTN4_RAT	dynactin 4 (p62)
12	EF2_RAT	eukaryotic translation elongation factor 2
13	FNDC1_RAT	fibronectin type III domain containing 1
14	FLOT2_RAT	flotillin 2
15	GBRA5_RAT	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5
16	HSP7C_RAT	heat shock 70kDa protein 8
17	LSAMP_RAT	limbic system-associated membrane protein
18	OPCM_RAT	opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
19	PDE4A_RAT	phosphodiesterase 4A, cAMP-specific
20	K6PL_RAT	phosphofructokinase, liver
21	KAP3_RAT	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
22	PP2BA_RAT	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme
23	ODPAT_RAT	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 2
24	RAB10_RAT	RAB10, member RAS oncogene family
25	RAB21_RAT	RAB21, member RAS oncogene family
26	EAA2_RAT	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
27	SYT2_RAT	synaptotagmin II
28	TBA8_RAT	tubulin, alpha 8

IV. ANEXO Sandoval v/s Foster 2003

	Uniprot	Nombre
1	NT5D2_RAT	5'-nucleotidase
2	ACTB_RAT	Actin, beta
3	ANXA6_RAT	Annexin VI
4	ACLY_RAT	ATP citrate lyase
5	KCC1A_RAT	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I
6	CALX_RAT	Calnexin
7	CLH_RAT	Clathrin heavy chain
8	CO5A1_RAT	Collagen, alpha 1(V)
9	DYH1_RAT	Dynein heavy chain
10	EHD1_RAT	EH-domain containing 1
11	FLOT2_RAT	Flotillin 2
12	GP116_RAT	G protein-coupled receptor 116
13	LYAG_RAT	glucosidase, alpha; acid
14	G3P_RAT	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
15	GPC1_RAT	Glypican-1
16	HSP7C_RAT	HSP-70 protein 8
17	ITPR1_RAT	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1
18	ITB1_RAT	Integrin, beta 1
19	K1C17_RAT	Keratin 17
20	LDHA_RAT	Lactate dehydrogenase A
21	MACF1_RAT	Microtubule-actin crosslinking factor 1
22	MYH10_RAT	myosin, heavy chain 10, non-muscle
23	OTOF_RAT	Otoferlin
24	K6PL_RAT	phosphofructokinase, liver
25	PLCG1_RAT	phospholipase C, gamma 1
26	KPYM_RAT	Pyruvate kinase
27	RIPL2_RAT	Rab interacting lysosomal protein-like 2
28	RASA2_RAT	RAS p21 protein activator 2
29	RL7_RAT	Ribosomal protein L7
30	RS16_RAT	Ribosomal protein S16
31	TPM1_RAT	tropomyosin 1, alpha