

## PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE DOCTORADO MENCIÓN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

# **TESIS DOCTORAL:**

# "Estudio del papel de microRNAs sobre la remodelación post-sináptica inducida por el ligando *Wnt*-5a"

Por: JUAN FRANCISCO CODOCEDO H.

Octubre 2014



# Estudio del papel de microRNAs sobre la remodelación post-sináptica inducida por el ligando *Wnt*-5a

Tesis presentada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular y Molecular

Por:

JUAN FRANCISCO CODOCEDO H.

- Director de Tesis : Dr. Nibaldo Inestrosa Cantín
  - Comisión de Tesis : Dra. María Estela Andrés

Dra. Úrsula Wyneken

Dr. Enrique Brandan

Octubre 2014

#### DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, las personas más importantes en mi vida. A mis padres, que con su esfuerzo, amor y sacrificio han permitido que lleve a cabo mis sueños y metas. A mis hermanos por la alegría inmensa de una infancia que no olvido y el apoyo eterno en los caminos recorridos. A mi esposa, por tu compañía y amor incondicional, y por sobre todo por el regalo más preciado que he recibido en la vida, nuestra hermosa hija Isabella. A ti hija, te dedico esto y todo lo que hago en la vida, porque eres mi motivación y alegría.

Los quiero.

#### AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas e instituciones que han permitido llevar a cabo este proyecto. En primer lugar al Dr. Nibaldo Inestrosa, por la libertad y confianza que ha depositado en mis capacidades durante estos años. A Eliseo Campos por los consejos y conversaciones que han contribuido en mi formación profesional. A los amigos y colaboradores que con paciencia enseñaron y ayudaron a realizar experimentos en los cuales no tenía experiencia. Gracias a Gloria Méndez por los cultivos de neuronas hipocampales, que semana a semana permitieron la realización de este trabajo. A Leonardo Pavés del INTA por ayudarme a realizar la extracción de RNA. A Mariana Quiroz, del laboratorio del Dr. Carlos Vio, por ayudarme en la realización de PCR en tiempo real para la determinación de la expresión de COX-2 y ROCK2. Al laboratorio del Dr. Rodrigo Gutiérrez, por facilitarme sus equipos para realizar el análisis de la expresión de miRNAs. También aprovecho de agradecer a mis compañeros de laboratorio por la amistad, consejos, críticas y colaboración.

Finalmente quisiera agradecer a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) y la Pontificia Universidad Católica de Chile, por los financiamientos que permitieron realizar este trabajo, a través de distintas becas para la compra de insumos, manutención y presentación en congresos nacionales y extranjeros.

A todos uds muchas Gracias.

#### FINACIAMIENTO

Esta tesis de Doctorado fue realizada gracias al financiamiento otorgado por:

## Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) por medio

de las siguientes becas:

- Beca programa de capital humano avanzado. Doctorado en universidades Chilenas, 2009.
- Beca de apoyo a la realización de tesis doctoral en Chile, 2012.
- Beca para la participación de estudiantes de Doctorado en congresos nacionales e internacionales de sociedades científicas. 2013.

Proyecto Financiamiento Basal PFB 12/2007, Centro de Envejecimiento y Regeneración (CARE).

## INDICE

INDICE	Ι
INDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	
RESUMEN	X
ABSTRACTXI	
1. INTRODUCCION	.1
<b>1.1.</b> Vía de señalización Wnt	2
<b>1.2.</b> Efectos sinápticos de Wnt	5
<b>1.3.</b> MicroRNAs	8
1.4. Biogénesis de miRNAs	9
<b>1.4.1.</b> Transcripción de miRNAs	9
<b>1.4.2.</b> Procesamiento de miRNAs1	1
<b>1.4.3.</b> Mecanismos de silenciamiento mediados por miRNA12	2
<b>1.5.</b> Efectos sinápticos de miRNAs1	3
HIPOTESIS	б
OBJETIVO GENERAL10	б
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> 10	6
<b>2. MATERIALES</b>	7
<b>2.1.</b> Materiales y reactivos generales1	7

	2.2. Material Biológico	17
	2.3. Sistemas Comerciales	
	2.4. Péptidos Sintéticos	19
	2.5. Material para transfección	19
	<b>2.6.</b> Anticuerpos	20
3.	METODOS	22
	<b>3.1.</b> Cultivo de neuronas hipocampales de rata.	22
	<b>3.2.</b> Cultivo de Celulas HT22	22
	<b>3.3.</b> Extracción de RNA y control de calidad	24
	3.4. Análisis de expresión de miRNAs hipocampales mediante reacc	ión de la
	polimerasa en cadena en tiempo real (real time-PCR array)	25
	3.5. Cuantificación de la expresión de miRNAs hipocampales mediante	el método
	$\Delta\Delta C_t$ .)	27
	<b>3.6.</b> Uso de Herramientas Bioinformáticas	
	3.7. Análisis de la expresión de los mRNAs de ciclooxigenasa-2 (COX	-2) y Rho
	quinasa 2 (ROCK2)	29
	<b>3.8.</b> Purificación de plasmidio recombinante	30
	<b>3.9.</b> Lipofección de celulas HT22	30
	3.10. Magnetofección de cultivos primarios de neuronas hipocan	npales de
	rata	31
	3.11. Extracción, cuantificación y análisis de Proteínas mediante	Western
	Blot	32
	<b>3.12.</b> Estudios de Inmunofluorescencia	
	<b>3.13.</b> Microscopia Confocal y análisis de imágenes	34

ii

	<b>3.14.</b> Analisis estadistico
4.	RESULTADOS
	4.1. Análisis de expresión de miRNAs en neuronas hipocampales en cultivo, en
	respuesta al tratamiento con Foxy-536
	4.2. Determinación de Funciones Biológicas de los miRNAs regulados por Foxy-
	5
	<b>4.3.</b> Análisis y validación de blancos río abajo de la señalización Wnt42
	<b>4.4.</b> Wnt-5a regula la expresión de ROCK2 en neuronas hipocampales50
	<b>4.5.</b> Wnt-5a regula la expresión de COX-2 en neuronas hipocampales53
	<b>4.6.</b> Wnt-5a activa a ROCK2 en neuronas hipocampales
	4.7. miR-101b participa en la regulación de la morfología de las espinas dendríticas
	inducidas por Wnt-5a55
5.	DISCUSIÓN
	<b>5.1.</b> Wnt-5a regula la expresión de miRNAs en neuronas hipocampales60
	<b>5.2.</b> miR-101b como posible efector de Wnt-5a
	<ul><li>5.2. miR-101b como posible efector de Wnt-5a</li></ul>
	<ul> <li>5.2. miR-101b como posible efector de Wnt-5a</li></ul>
	<ul> <li>5.2. miR-101b como posible efector de Wnt-5a</li></ul>
	<ul> <li>5.2. miR-101b como posible efector de Wnt-5a</li></ul>
	<ul> <li>5.2. miR-101b como posible efector de Wnt-5a</li></ul>
	<ul> <li>5.2. miR-101b como posible efector de Wnt-5a</li></ul>
	<ul> <li>5.2. miR-101b como posible efector de Wnt-5a</li></ul>
	<ul> <li>5.2. miR-101b como posible efector de Wnt-5a</li></ul>

7.	ANEXOS	76
8.	BIBLIOGRAFIA	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vías de señalización Wnt4
Figura 2: Biogénesis de microRNAs10
Figura 3: Foxy-5 regula la expresión de miRNAs en neuronas hipocampales en
cultivo
Figura 4: Análisis bio-informático de los miRNAs modulados por Foxy-540
Figura 5: Análisis funcional de miRNAs regulados por Foxy-541
Figura 6: ROCK2 es blanco de miR-101b44
Figura 7: Validación experimental de la regulación de miR-101b sobre ROCK246
Figura 8: COX-2 (PTGS2) es blanco de miR-101b47
Figura 9: Validación experimental de la regulación de miR-101b sobre COX-248
Figura 10: miR-101b disminuye la expresión de ROCK2 en neuronas hipocampales en
cultivo49
Figura 11: Wnt-5a regula la expresión de ROCK2 en neuronas hipocampales51
Figura 12: Wnt-5a regula la expresión y el <i>clustering</i> de ROCK2
Figura 13: Wnt-5a regula la expresión de COX-2 por medio de un mecanismo post-
transcripcional
Figura 14: Wnt-5A aumenta la actividad de ROCK2 en forma rápida y transitoria56

## ABREVIATURAS

AraC	Arabinosido de Citosina
BSA	seroalbúmina de Bovino
°C	Grado celcius
CaMKII	Calmodulina quinasa dependiente de Calcio II
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DIV	Días in vitro
DMEM	Medio Esencial Modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
Dvl	Dishevelled
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GSK3-β	Glicógeno sintasa quinasa 3 beta
h	hora
HRP	Peroxidasa de Rábano
JNK	Quinasa N-terminal de c-jun
М	Molar
miRISC	Complejo inductor de silenciamiento mediado por miRNA

miRNA	microRNA
mM	milimolar
MRE	Elemento de respuesta a miRNA
МҮРТ	Myosin phosphatase targeting protein
μΜ	micromolar
nM	nanomolar
PBS	Buffer salino fosfato
PCR array	Reacción de la polimerasa en cadena, en serie.
ROCK2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
rWnt-5a	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A, proteína
recombinante	
SNC	Sistema Nervioso Central
UTR	Región no traducida.

Wnt Wingless-type MMTV integration site

#### **RESUMEN**

Wnt-5a es un factor sinaptogénico cuya expresión se ve aumentada durante el desarrollo y en consecuencia se ha sugerido que puede participar en procesos de mantención y función sináptica del sistema nervioso adulto. Estudios realizados en neuronas hipocampales han mostrado que el tratamiento con Wnt-5a genera una serie de modificaciones post-sinápticas que incluyen: un aumento en la densidad de las espinas dendríticas, incremento en el tráfico de proteínas sinápticas y cambios en la transmisión sináptica. Estudios recientes han determinado que los factores sinaptogénicos inducen cambios en la estructura y función sináptica por medio de la activación de diversas vías de señalización, incluyendo cambios en la expresión o actividad de varios microRNAs los que a su vez contribuyen a la mantención y consolidación de los cambios sinápticos. Los microRNAs corresponden a una familia de RNAs pequeños endógenos, no codificantes, que controlan la expresión génica de sus mRNAs blancos por medio de hibridación con secuencias complementarias en el 3'UTR, de modo que inhiben su traducción. Un gran número de estudios indica que los microRNAs se encuentran involucrados en la regulación de la plasticidad sináptica inducida por factores sinaptogénicos como por ejemplo el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), dopamina, serotonina y glutamato. En el presente estudio, nosotros examinamos si el tratamiento con Wnt-5a modula los niveles de microRNAs en neuronas hipocampales en cultivo y si esta interacción es parte del mecanismo por el cual Wnt-5a regula la región post-sináptica. Por medio de PCR array, identificamos un grupo de microRNAs que responde al tratamiento por una hora de Foxy-5, un péptido mimético de Wnt-5a. El análisis bio-informático de dichos microRNAs,

demostró que en su conjunto tienen el potencial de regular varios procesos biológicos asociados a la señalización de Wnt-5a, incluyendo distintos tipos de cáncer y procesos asociados a plasticidad sináptica como la regulación del citoesqueleto de actina. Con el fin de establecer una relación entre la regulación de microRNAs y los efectos post-sinápticos de Wnt-5a, estudiamos a miR-101b, el miRNA que más veces vio afectada su expresión en presencia de Foxy-5. miR-101b ha sido extensamente estudiado en carcinogénesis, sin embargo su rol en el cerebro está recién comenzando a ser explorado. Análisis in silico, predicen que ROCK2, una quinasa involucrada en la regulación del citoesqueleto de actina es un posible blanco de miR-101b. Mediante ensayos de ganancia de función, demostramos que miR-101b es capaz de regular la expresión de ROCK2, en células HT22 así como en neuronas hipocampales en cultivo. Por otro lado, consistente con la disminución de miR-101b, Wht-5a aumenta la expresión ROCK2 en neuronas hipocampales en cultivo. Por otro lado, Wnt-5a es capaz de aumentar la actividad de ROCK2 en forma dependiente del tiempo sugiriendo que ROCK2 es parte de las vías de señalización inducidas por Wnt-5a. Finalmente, mediante ensayos de la ganancia de función determinamos que la disminución en los niveles de miR-101b no son necesarios para el aumento en la densidad de espinas dendríticas inducido por Wnt-5a, sin embargo sería importante para el control de la morfología de dichas espinas, pues el tratamiento con Wnt-5a en neuronas con ganancia de función genera espinas mucho más largas, sugiriendo un cambio en la madurez de la estructura post-sináptica.

#### ABSTRACT

Wnt-5a is a synaptogenic factor, whose expression increases during development; therefore, it has been suggested that Wnt-5a plays a role in synaptic function in the adult nervous system. Studies in hippocampal neurons showed that the treatment with Wnt-5a generates several post-synaptic modifications including: an increase in the density of dendritic spines, an increase in the traffic of synaptic proteins and changes in synaptic transmission. Recent studies have determined that synaptogenic factors induce changes in the synaptic structure and function through the activation of different signaling pathways including the modulation of several microRNAs which in turn contribute to the maintenance and consolidation of synaptic changes. microRNAs are a family of endogenous small non-coding RNAs that control the gene expression of their mRNA targets through hybridization with complementary sequences in the 3' UTR, thereby inhibiting the translation of the target proteins. Emerging evidence indicates that the miRNAs are actively involved in the regulation of synaptic plasticity induced by synaptogenic factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), dopamine, serotonin and glutamate. In the present study, we examined whether Wnt-5a treatment modulates the levels of microRNAs in cultured hippocampal neurons as well as whether this interaction is part of the mechanism of the post-synaptic effects of Wnt-5a. Using PCR arrays, we identified a set of microRNAs that respond to Foxy-5 treatment, a mimetic peptide of Wnt-5a. A bio-informatic analysis of the responsive microRNAs, demonstrate that together have the potential to regulate various biological processes associated with Wnt-5a, including cancers and processes associated with synaptic plasticity as the

regulation of actin cytoskeleton. In order to establish a relationship between the regulation of microRNAs and post-synaptic effects of Wnt-5a, we studied miR-101b, the most affected microRNA in the presence of Foxy-5. miR-101b has been extensively studied in carcinogenesis, but its role in the brain is just beginning to be explored. In silico analyzes predict that ROCK2, a kinase involved in the regulation of the actin cytoskeleton is a potential target of miR-101b. Through gain of function studies, we showed that miR-101b is able to regulate the expression of ROCK2, in HT22 cells and in cultured hippocampal neurons. Moreover, consistent with the decrease of miR-101b, Wnt-5a enhances ROCK2 expression in cultured hippocampal neurons. Furthermore, Wnt-5a is able to increase the activity of ROCK2 in a time-dependent manner suggesting that ROCK2 is part of the signaling pathways induced by Wnt-5a. Finally, using gain function experiments, we determined that the decrease in the levels of miR-101b are not required for the increase in dendritic spine density induced by Wnt-5a, however it would be important to control the morphology of these spines, because treatment with Wnt-5a in neurons with gain of function of miR-101b generates significantly longer spines, suggesting a change in the maturity of the postsynaptic structure.

#### 1. INTRODUCCIÓN

El cerebro humano contiene más de ochenta billones de neuronas recibiendo cada una en su etapa adulta decenas de miles de contactos sinápticos o sinapsis las que constituyen el sustrato estructural subyacente a nuestra capacidad de responder frente a los desafíos del medio ambiente, recuperarnos de diversas lesiones, aprender y memorizar. En el caso de las sinapsis excitatorias, los procesos de plasticidad sináptica son dependientes de la regulación estructural y funcional de las espinas dendríticas las cuales son pequeñas protrusiones de las dendritas (0,5-2 µm de largo) que constituyen el principal compartimiento post-sináptico al recibir la mayor parte de la transmisión excitatoria (Alvarez and Sabatini, 2007; Koleske, 2013). Esta relación función-estructura es particularmente clara en las neuronas piramidales del hipocampo, donde la proporción de sinapsis excitatorias y espinas dendríticas es prácticamente 1 a 1 (Nimchinsky et al., 2004). Morfológicamente, las espinas consisten de una cabeza bulbosa que se separa de su dendrita parental por un cuello delgado que puede aislar bioquímicamente dicha cabeza. Esté fenómeno de compartimentalización, dota a la sinapsis de un módulo de señalización confinado, el cual se encuentra enriquecido en proteínas de andamio, canales iónicos, receptores de neurotransmisores y una serie de enzimas que transducen y regulan las señales sinápticas (Chen and Sabatini, 2012; Colgan and Yasuda, 2014).

Diferentes estudios han permitido establecer que el ambiente y la experiencia pueden regular el número, morfología y función de las espinas dendríticas lo que se correlaciona con cambios en la transmisión sináptica de larga duración (Flavell and Greenberg, 2008). Por otro lado, una de las características en común a una serie de enfermedades del sistema nervioso tales como el síndrome de Down, síndrome de X frágil, epilepsia, Parkinson y Alzheimer es la presencia de anormalidades de las espinas dendríticas lo que se asocia a una serie de problemas conductuales y cognitivos (Kulkarni and Firestein, 2012). Por este motivo, existe un gran interés en la comunidad científica por comprender los eventos de señalización que controlan los distintos aspectos de la plasticidad de las espinas dendríticas.

En este sentido, estudios previos de nuestro laboratorio han permitido establecer el rol de Wnt-5a (*Wingless-type MMTV integration site family member 5A*), uno de los ligandos más ampliamente estudiados de la familia Wnt, en la modulación de las espinas dendríticas y actividad sináptica tanto en rebanadas de hipocampo de rata como en cultivos primarios de neuronas hipocampales. El interés de este proyecto fue comprender parte de los mecanismos por los cuales la activación de la vía Wnt, genera dichos cambios, explorando por primera vez el rol de microRNAs (miRNAs), los cuales como veremos posteriormente, constituyen importantes moduladores de la plasticidad sináptica.

#### 1.1. Vía de señalización Wnt

Los ligandos Wnts constituyen una gran familia de glicoproteínas de secreción, las que se encuentran presentes en todas las especies de animales. El genoma de ratones y humanos, posee 19 genes independientes que son expresados en forma tejido específico y también dependiente del desarrollo (Willert and Nusse, 2012). Las vías de señalización mediadas por los distintos ligandos Wnt han sido involucrados en diversos procesos celulares que incluyen proliferación celular, migración, establecimiento de polaridad y especificación del destino celular (Angers and Moon, 2009; Clevers and Nusse, 2012; Nusse and Varmus, 2012). Por esta razón, la desregulación de su señalización se ha asociado al desarrollo de varias

patologías incluyendo casi todos los tipos de cáncer (Polakis, 2012; Anastas and Moon, 2013) y en el sistema nervioso central (SNC) al autismo (Zhang et al., 2012; Sowers et al., 2013), esquizofrenia (Lovestone et al., 2007; Inestrosa et al., 2012), Síndrome de William (Zhao et al., 2005) y la enfermedad de Alzheimer (Purro et al., 2012; Rosso and Inestrosa, 2013).

La vía de señalización Wnt es muy compleja, principalmente por el efecto combinatorio de un gran número de ligandos así como de receptores y co-receptores, los cuales activan a su vez múltiples cascadas de señalización. Basados en los estudios tempranos de las vías de señalización Wnt, se pueden distinguir dos ramas principales, la vía canónica o dependiente de  $\beta$ -catenina y las vías no canónicas o independientes de  $\beta$ -catenina (Figura 1). Sin embargo, dicha clasificación debe ser considerada solo como una guía práctica ya que dependiendo del contexto celular, se observan efectos dependientes de vías divergentes o cruce con otras vías (Niehrs, 2012).

En la vía canónica, la unión de Wnt a receptores *Frizzled* (*Fz*), resulta en la inhibición de la GSK-3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase 3*), la cual fosforila y determina la degradación proteosomal del co-activador transcripcional  $\beta$ -catenina. La inhibición de GSK-3 $\beta$  permite la acumulación citosólica de  $\beta$ -catenina y su posterior translocación al núcleo donde se asocia a factores de transcripción TCF (*T Cell Factor*) / LEF (*Lymphoid Enhancer-binding Factor*) activando la transcripción de genes blancos de la vía Wnt. Esta vía es principalmente relacionada a procesos de diferenciación y proliferación celular (Niehrs, 2012).

Respecto a las vías Wnt no canónicas, la mejor caracterizada es la vía PCP (*Planar cell polarity*) en la cual la activación de receptores  $F_z$  inicia una cascada que incluye a las GTPasas pequeñas RhoA y RAC1, las que a su vez activan a ROCK (*Rho-associated, coiled-coil* 



**Fig. 1. Vías de señalización** *Wnt.* **A.** Vía PCP en la cual la activación de receptores Fz inicia una cascada que incluye a las GTPasas pequeñas RhoA y RAC1, las que a su vez activan a ROCK y JNK, respectivamente generando cambios a nivel del citoesqueleto. **B.** Vía Wnt Canónica. En condiciones basales, GSK3β fosforila β-catenina determinando su degradación. Sin embargo en presencia del ligando Wnt el complejo de destrucción (formado por GSK3β, caseína quinasa Iα (CKIα), Axina y Adenomatosis poliposis coli (APC)) es reclutado al complejo Wnt-receptor e inactivado, lo que permite que β-catenina se acumule, transloque al núcleo donde activa la transcripción de genes blancos bajo el control de factores de transcripción como TCF. **C.** Vía Wnt/Ca<sup>+2</sup>, en la cual la unión de Wnt con receptores Fz genera un aumento en los niveles de Ca<sup>+2</sup> intracelular y en consecuencia la activación de CAMKII, PKC y calcineurina. Esto puede llevar a la activación de factores de transcripción como NFAT para el control de la expresión génica. Además las vías PCP y Wnt/Ca<sup>+2</sup> antagonizan la vía canónica en distintos niveles. Modificado de (Niehrs, 2012).

*containing protein kinase*) y JNK (*JUN-N-terminal Kinase*) respectivamente lo que genera cambios a nivel del citoesqueleto por medio de la polimerización de actina y la estabilización de microtúbulos (Habas et al., 2003). Por otro lado, la vía PCP induce cambios a nivel transcripcional por medio de factores de transcripción rio abajo de JNK como ATF2 (*activating transcription factor 2*) (Simons and Mlodzik, 2008).

Otra importante y estudiada vía Wnt no canónica es la llamada vía Wnt/Ca<sup>+2</sup>, en la cual la unión de Wnt con receptores Fz activa proteínas G heterotriméricas las que a su vez activan a la enzima fosfolipasa C (PLC), lo que lleva a la generación de diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>). Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> inicia la liberación de Ca<sup>+2</sup> desde reservas intracelulares lo que activa varios efectores sensibles a Ca<sup>+2</sup> como PKC (*Protein Kinase C*), CaMKII (*Calmodulin-dependent Kinase II*) y calcineurina. Esta vía también controla la expresión génica, mediante la activación de factores de transcripción como NFAT (*Nuclear Factor Associated with T cells*) (De, 2011).

La actividad de los distintos ligandos Wnts depende del contexto celular, sin embargo algunos ligandos sistemáticamente han sido descritos como activadores preferenciales de la vía canónica y otros de las vías no canónicas. Por ejemplo, Wnt-1, Wnt-3a y Wnt-8 son descritos como ligandos relacionados a las vías dependientes de  $\beta$ -catenina. Por otro lado Wnt-5a y Wnt-11, son ligandos predominantemente relacionados a la activación de las vías PCP y Wnt/Ca<sup>+2</sup> (Kikuchi et al., 2011).

#### 1.2. Efectos sinápticos de Wnt

Como mencionamos previamente, las vías de señalización Wnt, regulan diversos procesos de desarrollo que incluyen al sistema nervioso central. Una serie de trabajos han

demostrado el rol de Wnt en la formación y función de los circuitos neurales, al controlar la diferenciación neuronal, desarrollo dendrítico, guía y crecimiento axonal (Inestrosa and Arenas, 2010; Budnik and Salinas, 2011; Rosso and Inestrosa, 2013).

La identificación en el cerebro de animales adultos, de varios componentes de la señalización Wnt (Shimogori et al., 2004; Cerpa et al., 2008; Chacón et al., 2008), permitió sugerir que esta vía juega un rol importante en la función y mantención sináptica. Interesantemente, distintos ligandos Wnt, parecen controlar distintos aspectos de la función sináptica. Por ejemplo, el ligando Wnt-7a es capaz de actuar principalmente a nivel de la región pre-sináptica, aumentando el agrupamiento de proteínas como sinapsina I (Hall et al., 2000), el receptor nicotínico de acetilcolina  $\alpha$ 7 ( $\alpha$ 7-nAChR) (Farías et al., 2007), sinaptofisina, sinaptotagmina y SV2 (Synaptic Vesicle protein 2) (Cerpa et al., 2008) contribuyendo de este modo a la formación de zonas activas. Del mismo modo, el tratamiento con Wnt-7a genera un aumento en la frecuencia de registros de potenciales sinápticos excitatorios de campo (fEPSP) en rebanadas de hipocampo de rata, lo que es consistente con un aumento en la liberación de neurotransmisores desde terminales pre-sinápticos (Cerpa et al., 2008). Interesantemente, Wnt-7a genera dichos cambios sin modular el agrupamiento de proteínas de la región postsináptica, como PSD-95 (PostSynaptic Density protein-95) (Farías et al., 2009). Hallazgos similares han sido descritos para los ligandos Wnt-7b y Wnt-3a, los cuales también señalizan preferencialmente por medio de la vía Wnt canónica (Rosso and Inestrosa, 2013).

En forma contraria a los hallazgos realizados en la región pre-sináptica, la región postsináptica parece estar regulada principalmente por medio de las vías no canónicas. Wnt-5a es un ligando cuya expresión en el hipocampo de rata aumenta durante el desarrollo alcanzando

su mayor nivel en la etapa adulta (Varela-Nallar et al., 2010). En cultivos primarios de neuronas hipocampales, el tratamiento con Wnt-5a generó un aumento en el agrupamiento de PSD-95, sin afectar el agrupamiento de proteínas pre-sinápticas (Farías et al., 2009). Del mismo modo, generó un aumento en la densidad de las espinas dendríticas que como consecuencia induce un aumento en la amplitud de potenciales post-sinápticos excitatorios de campo (fieldEPSP), lo que es interpretado como un aumento en la actividad sináptica por medio de mecanismos de remodelación post-sináptica (Varela-Nallar et al., 2010). Este aumento en la actividad sináptica facilita la inducción de la potenciación de larga duración (LTP) (Cerpa et al., 2011), el cual corresponde a un paradigma electrofisiológico asociado a procesos de memoria y aprendizaje (Citri and Malenka, 2008). El uso de inhibidores farmacológicos específicos para CaMKII y JNK bloquea los efectos post-sinápticos de Wnt-5a lo que claramente sugiere son dependientes de las vías no canónicas Wnt/Ca<sup>+2</sup> y PCP (Farías et al., 2009; Varela-Nallar et al., 2010; Cerpa et al., 2011). Estos hallazgos han permitido establecer el rol de la señalización Wnt en la modulación de la conectividad sináptica. Interesantemente algunos estudios muestran que estos cambios podrían estar inducidos por la experiencia sensorial o la actividad sináptica. Por ejemplo, en neuronas hipocampales en cultivo, la activación de receptores de glutamato tipo NMDA (N-methyl-D-aspartate), generan un aumento en la expresión de Wnt-2 (Wayman et al., 2006) y en animales expuestos a un ambiente enriquecido, se observó un aumento en la expresión de Wnt-7a/b (Gogolla et al., 2009).

La evidencia acumulada apunta a que efectivamente las vías de señalización Wnt regulan diversos aspectos de la función sináptica, sin embargo los mecanismos moleculares por los cuales opera esta regulación están recién comenzando a ser estudiados.

#### 1.3.MicroRNAs

Los miRNAs, son un grupo de RNAs pequeños no codificantes que controlan negativamente la expresión génica al unirse a la región 3'UTR (*Untranslated Region*) de RNAs mensajeros (mRNAs) blancos e inhibiendo su traducción. El estudio de los miRNAs es relativamente reciente, sin embargo el impacto del rol de estas moléculas en diversos procesos biológicos ha sido enorme. Su descubrimiento hace más de 20 años se realizó en el marco de estudio de genes heterocrónicos de *Caenorhabditis elegans*, vale decir genes que controlan los distintos periodos de desarrollo de estos gusanos (Lee et al., 1993). Por un largo período, este hallazgo fue visto como una particularidad de nematodos, sin embargo el descubrimiento de homólogos en mamíferos, particularmente en humanos casi una década después (Pasquinelli et al., 2000) ha motivado un gran interés de la comunidad científica en el estudio de los miRNAs.

Los miRNAs animales son filogenéticamente conservados, por ejemplo, aproximadamente el 55% de los miRNAs de *Caenorhabditis elegans* tiene homólogos en humanos (Ibáñez-Ventoso et al., 2008). En humanos, se estima que los miRNAs controlan la actividad de más del 60% de todos los genes que codifican proteínas (Friedman et al., 2009) lo que explica su participación en la regulación de prácticamente todos los procesos biológicos estudiados hasta ahora (Krol et al., 2010b).

Por otro lado, y en forma similar a lo señalado para la vía Wnt, su desregulación ha sido asociada a la etiología de diversas enfermedades humanas como las que afectan al sistema cardiovascular (Dimmeler and Nicotera, 2013), síndrome metabólico (Rottiers and Näär, 2012), todos los tipos de cáncer (Di Leva et al., 2014) y por supuesto enfermedades que aquejan al sistema nervioso como la enfermedad de Alzheimer (Delay et al., 2012).

#### 1.4. Biogénesis de miRNAs

Con el fin de ejercer su función regulatoria, los miRNAs son expresados como precursores de cientos de nucleótidos para ser posteriormente procesados hasta alcanzar su forma madura la cual se integra en un complejo proteico denominado miRISC (*microRNA-Induced Silencing Complex*) (Figura 2). Este proceso es finamente orquestado y evidencia reciente muestra que puede ser regulado en distintos niveles con el fin de modular la función de miRNAs y de este modo regular distintos procesos biológicos (Kawamata and Tomari, 2010; Kawamata et al., 2011; Kwak and Tomari, 2012).

**1.4.1. Transcripción de miRNAs**: la transcripción de miRNAs genera un transcrito primario (pri-miRNA) el cual es un precursor en forma de horquilla de cientos de nucleótidos (nt). El mecanismo de expresión del miRNA depende de su localización génica (Schanen and Li, 2011). En mamíferos, aproximadamente un 50% de los miRNAs se encuentran localizados en áreas intergénicas y poseen sus propios elementos de regulación para el control de su expresión (secuencias promotoras, represoras, estimuladoras) (O'Carroll and Schaefer, 2013). En forma similar a los genes codificantes para proteínas, la mayoría de los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II (Lee et al., 2004) lo que explica en muchos casos las diferencias en la expresión temporal o tejido especifica de algunos miRNAs por medio de la activación de factores de transcripción específicos (O'Carroll and Schaefer, 2013). Por otro lado, un grupo de miRNAs se encuentran localizados en regiones exónicas o intrónicas de unidades transcripcionales codificantes y no codificantes. Contrario a los miRNAs intergénico



**Fig. 2. Biogénesis de microRNAs** Transcritos primarios (pri-miRNAs) producidos por la RNA polimerasa II son procesadas por la RNasa tipo III, Drosha. El precursor generado de 70 nt posee una estructura de horquilla (pre-miRNA) que es exportada al citoplasma por exportina 5. En el citoplasma el pre-miRNA es procesado por otra RNasa tipo III, Dicer de modo que se genera un miRNA doble hebra de 20 nt. Una de las hebras es cargada en miRISC que contiene proteínas Argonauta. El miRNA maduro permite al RISC reconocer al mRNA blanco por medio de complementariedad de secuencias. Finalmente el miRISC inhibe la expresión del mRNA blanco. Modificado de (Codocedo et al., 2014)

la transcripción de estos miRNAs depende de los elementos de regulación del gen huésped. Aproximadamente un 40% de los miRNAs se encuentra localizado en regiones intrónicas y son normalmente co-transcritos con su gen huésped de modo que el pri-miRNA surge del *splicing* del mRNA huésped. En muchos casos, la co-transcripción se encuentra relacionada a una función cooperativa entre el miRNA y el producto de expresión del gen huésped (Gao et al., 2012). En el caso de miRNAs exónicos, (~10% de los miRNAs), la generación del primiRNA puede interrumpir el exón huésped y afectar la formación del mRNA huésped. Sin embargo el procesamiento de estos miRNAs aún no es estudiado en detalle (Slezak-Prochazka et al., 2013).

**1.4.2. Procesamiento de miRNAs.** Para la mayoría de los miRNAs el procesamiento de primiRNAs hasta su forma madura, involucra el corte secuencial por medio de complejos nucleares y citosólicos en un proceso conocido como vía canónica. Una vez transcritos los miRNAs son reconocidos por el complejo nuclear llamado microprocesador, el cual genera un precursor más pequeño (~ 60-70 nt) con forma de horquilla denominado pre-miRNA (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004). Este complejo se encuentra compuesto por dos proteínas principales, DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) la cual posee un dominio de unión a RNA la cual reconoce al pri-miRNA, y lo pone en proximidad a Drosha, una RNasa III clase II , la cual corta RNA doble hebra de manera escalonada dejando 2 nt que sobresalen del extremo 3' de la horquilla (Han et al., 2006). Esta característica estructural del pre-miRNA es reconocida por la proteína exportina 5, la cual transporta al pre-miRNA al citoplasma en forma dependiente de GTP (Yi et al., 2003; Lund et al., 2004; Okada et al., 2009). Una vez en el citoplasma el pre-miRNA es reconocido y procesado por una RNasa III clase III denominada Dicer, generando un duplete miRNA/\*miRNA de ~22 nt de extensión (Macrae et al., 2006). Finalmente el duplete es incorporado en el complejo miRISC donde la hebra madura es separada de su hebra complementaria, la cual en la mayoría de los casos es degradada (Khvorova et al., 2003).

Algunos miRNAs poseen un mecanismo de biogénesis distinto, en el cual se evita la acción de alguno de los complejos de procesamiento. Esto es posible debido a diferencias estructurales de los precursores lo que les permite ser reconocidos y procesados por otros complejos como el *spliceosoma*. Estas excepciones se ha agrupado bajo el concepto de biogénesis no canónica (Havens et al., 2012).

1.4.3. Mecanismos de silenciamiento mediados por miRNA. Los miRNA no pueden actuar por si solos. Ellos deben formar parte de un complejo ribonucleoproteíco para ejercer su función. El componente principal del miRISC es una proteína de la familia Argonauta (Ago) la cual provee una plataforma única para el reconocimiento del mRNA blanco y su silenciamiento. La mayoría de los mRNAs blancos de miRNAs, son reconocidos por medio de la complementariedad de secuencias entre los nucleótidos 2-7 del extremo 5' del miRNA denominado secuencia semilla, con secuencias complementarias en el extremo 3' UTR del mRNA, denominadas elementos de respuesta a miRNA (MRE) (Bartel, 2009). Una vez formado el complejo miRNA:mRNA, el miRISC induce el silenciamiento mediante varios procesos moleculares que incluyen la represión traduccional por medio de la inhibición del inicio de la traducción o desestabilización del mRNA mediante degradación de la cola poli A (Filipowicz et al., 2008). El resultado de la interacción entre el miRISC y el mRNA es una disminución en la producción de la proteína blanco (Figura 2), afectando de esta forma los distintos procesos biológicos en la que esta participa.

#### 1.5. Efectos sinápticos de miRNAs.

El rol de los miRNAs en el desarrollo del cerebro ha sido bien establecido. La deleción tejido específica de Dicer resulta en serios defectos morfológicos a nivel del hipocampo y la corteza (Davis et al., 2008) sugiriendo que el proceso de biogénesis de miRNAs es necesario para el correcto desarrollo cerebral. Estudios más recientes han explorado el rol de los miRNAs en procesos sinápticos o relacionados a plasticidad (Siegel et al., 2011). En animales en los cuales se indujo la pérdida de expresión de Dicer en el cerebro adulto, se observó un desarrollo cerebral normal, sin embargo se detectaron deficiencias en la morfología de las espinas dendríticas así como cambios en la transmisión sináptica (Konopka et al., 2010) sugiriendo entonces que la función de los miRNAs también es necesaria para la mantención de las estructuras sinápticas y en consecuencia de su actividad en la etapa adulta. Esto se ve reforzado por el hecho de que varios componentes de la ruta bio-sintética de miRNAs, tales como Dicer y Argonauta, se encuentra localizados en las densidades post-sinápticas de neuronas maduras (Lugli et al., 2005). Estudios realizados al combinar microdisección por "captura con láser" de neuronas hipocampales de rata en cultivo y RT (transcripción reversa) PCR en tiempo real, han permitido determinar que la mayoría de los miRNAs neuronales son detectados en las dendritas distribuyéndose a través del compartimiento somatodendrítico con un gradiente constante (Kye et al., 2007). Estudios adicionales usando sinaptosomas de neuronas de ratón han confirmado la presencia de varios miRNAs en la región sináptica (Lugli et al., 2008; Siegel et al., 2009; Zongaro et al., 2013).

Una de las preguntas más interesantes que surge de estas investigaciones es establecer cómo distintas señales moleculares pueden regular la expresión y en consecuencia la actividad de los miRNAs. En el último tiempo se ha puesto de manifiesto que los miRNAs están sujetos a un control sofisticado que opera a nivel de su metabolismo y función (Krol et al., 2010b), de este modo, la actividad sináptica puede regular en forma temporal la represión traduccional ejercida por los miRNAs (Vo et al., 2010). Por ejemplo, el grupo de Kosik describió que la activación del receptor de glutamato tipo NMDA induce la degradación proteosomal de componentes del miRISC a nivel sináptico. Como consecuencia, la actividad de los miRNAs se ve inhibida y una serie de mRNAs son traducidos en forma rápida y local aumentando los niveles de varias proteínas sinápticas como CaMKII (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) entre otros (Banerjee et al., 2009). Por otra parte, la regulación dependiente de actividad no está restringida al compartimiento dendrítico. Factores de transcripción activados por la actividad sináptica, tales como Mef2 (*Myocyte enhancer factor 2*) (Fiore et al., 2009) y CREB (*cAMP responsive element binding protein*) (Impey et al., 2010) aumentan la transcripción de miR-134 y miR-132 respectivamente, en lo que constituye una respuesta más lenta y globalizada.

Subyacente a la inducción de la actividad sináptica, la acción de diversas moléculas de señalización, tales como glutamato, BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), dopamina y serotonina parece fundamental en la determinación de los cambios en la expresión de los miRNAs. Por ejemplo, en el caracol marino, *Aplysia Califórnica*, miR-124 controla la facilitación sináptica de larga duración inducida por serotonina. En condiciones basales, miR-124 reprime la expresión del gen asociado a plasticidad sináptica, CREB. Estímulos prolongados de serotonina inducen una disminución en los niveles de miR-124 con el consiguiente aumento de CREB y la transición de un reflejo de corta duración a uno de larga duración (Rajasethupathy et al., 2009). En neuronas hipocampales en cultivo, el tratamiento

con dopamina, cocaína o anfetaminas induce la expresión de miR-181a el cual a su vez controla la expresión de una de las subunidades del receptor de glutamato tipo AMPA ( $\alpha$ *amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*), GluA2, lo que sugiere un rol de miRNAs en la plasticidad sináptica inducida por drogas (Saba et al., 2012).

Considerando los efectos sinápticos del ligando Wnt-5a y el rol activo de los miRNAs en el control de dichos procesos, es posible sugerir que los miRNAs formen parte del mecanismo por el cual este ligando es capaz de inducir los cambios descritos en la region postsináptica. Interesantemente, a la fecha no existen reportes que describan la capacidad de Wnt-5a de inducir cambios en el miRNoma (la colección completa de miRNAs en el genoma) de animales menos aun en el SNC. Respecto a otros ligandos Wnt, existen algunos trabajos en los que se ha establecido directa o indirectamente la relación entre la activación de la via canónica y la expresión de miRNAs. Por ejemplo, en embriones de *Xenopus Leavis* la sobreexpresión de Wnt-8 o  $\beta$ -catenina inhibe la expresión de miR-15 y miR-16 afectando el desarrollo de la polaridad dorsoventral embrionaria (Martello et al., 2007). Adicionalmente, una serie de componentes de la vía Wnt canónica han sido descritos como blancos de distintos miRNAs (Huang et al., 2010a).

En resumen, en la actualidad existen muchos reportes que demuestran el rol de los miRNAs en el control de la morfogénesis neuronal y dendrítica, sin embargo su rol modulador de la plasticidad sináptica en forma dependiente de estímulos esta recién comenzando a ser entendida. Wnt-5a es un factor sinaptogénico, que induce cambios a nivel de la region post-sináptica de neuronas hipocampales maduras. En consideración a los antecedentes anteriores nosotros plateamos la siguiente hipótesis de trabajo.

## HIPÓTESIS

La remodelación post-sináptica inducida por Wnt-5a involucra la regulación de miRNAs.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la relación que existe entre la activación de la vía de señalización mediada por Wnt-5a y la función de miRNAs en neuronas hipocampales en cultivo.

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar si Wnt-5a cambia el nivel de expresión de miRNAs en cultivos de neuronas hipocampales.
- Evaluar los efectos post-sinápticos de Wnt-5a, en neuronas con ganacia de función de miRNAs.

#### 2. MATERIALES

#### **2.1.** Materiales y reactivos generales

De Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA): Tripsina 10X, Bromuro de Etidio, medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM), medio de cultivo Neurobasal, suplemento B27, penicilina-estreptomicina, glutamina y suero de caballo y suero fetal bovino.

De Thermo Scientific (Rockford, IL, USA): membranas para transferencia de Polifluoruro de vinilideno (PVDF), estándar de peso molecular para proteínas *page ruler prestained protein ladder*, inhibidor de proteasas *Halt Protease Inhibitor Cocktail*.

De Winkler (Santiago, Chile): metanol, etanol, isopropanol, acrilamida, bisacrilamida, agarosa, Urea, TRIS, sacarosa, HCl, NaOH, Triton X100, Tween 20, dodecilsulfato sódico (SDS), NP-40, deoxicolato de sodio, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glicerol,  $\beta$ -mercaptoetanol, persulfato de amonio, TEMED, glicina, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NaF, Na<sub>2</sub>PO<sub>7</sub>, suero de albumina bovina (BSA), peptona y extracto de levadura.

De Fuji (Japón): películas fotográficas para revelado.

De SouthernBiotech (Birmingham, AL, USA): Fluoromont G

#### 2.2. Material Biológico

Para la preparación de cultivos primarios de neuronas de hipocampo, se utilizaron embriones de ratas silvestres de la cepa Sprague-Dawley de 18 días de gestación.

Células HT22 fueron generosamente donadas por el laboratorio de la Dra. Alejandra Álvarez (Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile). Para la amplificación de plasmidios se utilizaron bacterias competentes de la cepa *E*. *coli* DH5α de Promega (Madison, WI, USA).

Los *primers* para COX-2 y GAPDH fueron generosamente donados por el laboratorio del Dr. Carlos Bio (Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile).

#### 2.3.Sistemas comerciales

Para la extracción de RNA se uso el kit *mirVana miRNA isalation kit* (Cat.No. AM1561) de Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Para la determinación de la expresión de miRNAs hipocampales se utlizaron los siguientes kits: *RT<sup>2</sup> miRNA First Strand Kit* (Cat. No. MA-03/331401), *RT<sup>2</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Cat. No. PA-330523), *Rat miRNome RT<sup>2</sup> miRNA PCR array system* (Cat. No. 331214 MAR-100A) de QIAGEN (California, CA, USA).

Para la determinación de la expresión de los mRNAs COX-2 y GAPDH se utilizó el kit *Fast SYBR Green Master Mix* (cat. No. 4385617) de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA).

Para la cuantificación de proteinas se utilizo el kit *Pierce BCA Protein assay kit* (Cat. No. 23335) de Thermo Scientifics (Rockford, IL, USA).

Para la detección por quimioluminicencia de las proteinas de interes en los ensayos de Western Blot (WB), se utilizo el kit *Western Lightning Plus-ECL* (Cat. No.NEL104001EA) de Perkin Elmer (Waltham, MA, USA).

Para la purificación de plasmidios de DNA se utilizo el kit *HiSpeed Plasmid Midi kit* (Cat. No. 12145) de QIAGEN (California, CA, USA). Para la magnetofección de cultivo primario de neuronas hipocampales se utilizo el kit *NeuroMag Starting Kit* (Cat. No. KC30896) de OZ Biosciences (Marseille, France).

#### **2.4.Peptidos sinteticos**

Para la activación de la vía Wnt no canónica, se utilizo la proteína Wnt-5a recombinante (rWnt-5a) (Cat. No. 645-WN-010) de R&D System (Minneapolis, MN, USA), la cual fue resuspendida en tampón fosfato salino pH 7,4 (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,4 mM, y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM) (PBS) 1X suplementada con albúmina de suero bovino (*BSA*) al 0.1%, hasta una concentración de almacenamiento de 100  $\mu$ g/mL.

Además se utilizó, un hexapéptido formilado derivado de Wnt-5a denominado **Foxy-5** de Genemed Synthesis (San Francisco, CA, USA.). Este fue resuspendido en PBS1X hasta una concentración de almacenamiento de 10 mM. Del mismo modo y como control se utilizó un hexapéptido *scramble* resuspendido en PBS1X hasta una concentración de almacenamiento de 10 mM.

#### 2.5. Material para transfección

Para la transfección de células con GFP (proteína fluorescente verde) se utilizó el vector de clonamiento pcDNA3.1+ de Invitogen (Carlsbad, CA, USA).

Para los experimentos de ganancia de función de miR-101b, se utilizó *mirVana miRNA mimic, mmu-miR-101b-3p* (Cat. No. 4464067) de Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Como control se utilizó *mirVana miRNA Mimic Negative Control #1* (Cat. No. 4464058) de Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) el cual corresponde a una secuencia al
azar, que no produce efectos identificables sobre la función de los miRNAs. Ambos fueron resuspendidos en  $H_2O$  ultra pura hasta una concentración de almacenamiento de 50  $\mu$ M.

Para la transfección de células HT22 se utilizó Lipofectamina 2000 de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

# 2.6.Anticuerpos

Con el fin de realizar los ensayos de Western Blot e inmunofluorescencia se utilizaron los anticuerpos descritos en la tabla I. Tabla I. Lista de anticuerpos para la realización de WB e IF. Se especifican las características del anticuerpo, las condiciones experimentales y los datos del proveedor.

Anticuerpo	Huésped	Experimento/dilución	Proveedor/Cat. No.
α ROCK2	Ratón	WB/1:1000	ABCAM/ab56661
		IF/1:200	
α pMYPT (Thr853)	Conejo	WB/1:1000	CYCLEX/CY-P1025
α COX2	Conejo	WB/1:1000	ABCAM/ab15191
		IF/1:300	
α MAP2	Conejo	IF/1:1000	Millipore/AB5622
α pCAMKII (Thr 286)	Ratón	WB/1:1000	Santa Cruz/sc-32289
α CAMKII	Ratón	WB/1:1000	Santa Cruz/sc-32288
α GAPDH	Ratón	WB/1:20000	Santa Cruz/sc-32233
α Ratón (HRP)*	Cabra	WB/1:7000	Thermo
			Scientific/311430
α Conejo (HRP)*	Cabra	WB/1:7000	Thermo
			Scientific/31460
$\alpha$ Ratón (Alexa 555) <sup>#</sup>	Burro	IF/1:1000	Invitrogen/A31570
$\alpha$ Conejo (Alexa 633) <sup>#</sup>	Cabra	IF/1:1000	Invitrogen/A21070
$\alpha$ Ratón (Alexa 488) <sup>#</sup>	Pollo	IF/1:1000	Invitrogen/21200

\* Conjugado a peroxidasa del rábano (HRP abreviado de la palabra en inglés)

# Conjugado a fluorocromos Alexa, los números corresponden a la longitud de onda en nm.

#### 3. METODOS

## 3.1.Cultivo de neuronas hipocampales de rata

Los cultivos de neuronas hipocampales de rata fueron preparados de acuerdo a protocolos descritos previamente (Alvarez et al., 2004; Kaech and Banker, 2006). En resumen, las neuronas de hipocampo fueron obtenidas de embriones de rata Sprage-dawley de 18 días y mantenidas en DMEM suplementado con suero de caballo por 2 horas. Luego, el medio de cultivo fue sustituido por medio Neurobasal suplementado con B27, 100 µg/ml estreptomicina y 100 units/ml penicilina. Al tercer día *in vitro* (DIV), se adicionó a los cultivos hipocampales, 2 µM de AraC por 24 h con el fin de reducir el número de células gliales. Se sembraron distintas densidades de neuronas en consideración al experimento a realizar (Tabla II). En 14 DIV, las neuronas fueron preincubadas con neurobasal sin suplementados y sin antibióticos por 1 h y luego incubadas con 50 µM de Foxy-5 o 300 ng/mL de rWnt-5a. Neuronas usadas como control, fueron estimuladas con la solución vehículo suplementadas con un péptido *scramble*, para los experimentos realizados con FOXY-5 o el *carrier* de la proteína recombinante (BSA al 0,1%). Los estímulos fueron realizados a 37°C 5% de CO<sub>2</sub> en la estufa de cultivo.

## 3.2. Cultivos de células HT22

Las células HT22 corresponden a una sub-línea de células derivada de la línea parental HT4 las cuales fueron originalmente inmortalizadas de cultivos primarios de neuronas hipocampampales de ratón (Liu et al., 2009). Estas son propagadas en medio de crecimiento (DMEN 2806, glucosa 4,5 g/L, SFB 10%, 100  $\mu$ g/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina), a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en estufa de cultivo (Chhunchha et al., 2013). Los cultivos se dejaron crecer por 2 días previo a su utilización en distintos experimentos (Tabla II).

Cultivo	Placa de cultivo	)	Densidad		Experimento
	Multiplaca de	6	800.000	por	PCR array de
	pocillos		pocillo		miRNAs
	Multiplaca de	6	400.000	por	Western blot
Cultivo primario Neuronas	pocillos		pocillo		
hipocampales	Multiplaca de	24	35.000	por	Inmunofluorescencia
	pocillos		pocillo		
	Multiplaca de	24	80.000	por	Magnetofección
	pocillos		pocillo		
	Multiplaca de	6	90%		Western blot
	pocillos		confluencia		
Linea celular HT22	Multiplaca de	24	60%		Inmunofluorescencia
	pocillos		confluencia		
	Multiplaca de	24	40-50%		Lipofeccción
	pocillos		confluencia		

Tabla II. Cultivos celulares, formato y densidad de siembra por experimento.

## 3.3.Extracción de RNA y control de calidad

Con el fin de determinar cambios en la expresión de miRNAs posterior a la activación de la vía Wnt no canónica, primero se realizó una extracción de RNA total y un subsecuente enriquecimiento en RNAs pequeños (<200 nt) utilizando el sistema comercial MirVana. Brevemente, posterior a la estimulación de los cultivos con Foxy-5 por 1 h, las células fueron lavadas 3 veces con PBS suplementado con CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1mM (PBS Ca<sup>+2</sup>Mg<sup>+2</sup>) en hielo. Inmediatamente después, se adicionó el tampón de lisis denaturante y se homogenizó mecánicamente mediante pipeteo y vortex. Luego de 10 min en hielo se adiciono 1 volumen de fenol acido: cloroformo para la extracción orgánica. Luego de un suave vortex, se centrifugó por 5 min a 14.000 rpm a temperatura ambiente para separar la fase orgánica de la acuosa. La fase acuosa es recuperada en un tubo nuevo con el fin de realizar el enriquecimiento de RNAs pequeños. Para este fin, los RNA grandes son inmovilizados en el filtro de la columna usando una concentración de etanol baja (30%) y colectando el eluído enriquecido en RNAs pequeños. Luego, este eluído es mezclado con una solución con mayor concentración de etanol (60%), con el fin de inmovilizar los RNAs pequeños en el filtro de una segunda columna. El filtro es lavado varias veces con las soluciones incluidas en el sistema comercial y finalmente eluídas en 100 µL de solución de elusión precalentada a 95°C. Inmediatamente después de su obtención, se realizaron ensayos para determinar su concentración pureza e integridad.

La cuantificación y determinación de pureza se realizó mediante espectrofotometría usando un espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop 2000. La concentración fue

determinada midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ). La pureza fue estimada midiendo la razón  $A_{260}/A_{280}$ .

Con el fin de concentrar las muestras, se realizó un proceso de liofilización. Brevemente, Las muestras congeladas, tanto las tratadas con Foxy-5 así como las tratadas con el péptido control, fueron dispuestas dentro del liofilizador Martin Christ (modelo Alpha 1-2 Plus, Alemania) destapados y cubiertos con *parafilm* perforado durante 2 h a -50°C y 0,01 mBar de presión. Luego, el liofilizado obtenido fue resuspendido en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultra pura (10 veces inferior al volumen original) y analizado nuevamente mediante espectrofotometría.

La integridad y pureza fue evaluada mediante electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida al 15% preparado con urea 8 M en tampón TRIS/Borato/EDTA (TBE). Brevemente, 1 µg de muestra es mezclado con un volumen de tampón de carga, incluido en el sistema comercial *mirVana* y calentado por 5 min a 95°C. Las muestras son cargadas en el gel, y resueltas a 45 mA hasta que el frente de azul de bromofenol llega al final del gel. Los geles fueron bañados en una solución de bromuro de etidio al 0,5% durante 5 min y visualizados mediante el uso de un transiluminador. Con fines de estandarización y comparativos se corrieron muestras de RNA total en geles denaturantes de acrilamida al 1% para observar las diferencias con las muestras enriquecidas.

# **3.4.**Análisis de expresión de miRNAs hipocampales mediante reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (real time-PCR array)

Solo aquellas muestras que cumplieron parámetros de pureza  $(A_{260}/A_{280} \ge 1.7)$  e integridad aceptables fueron utilizadas en la determinación de la expresión de miRNAs hipocampales.

La transcripción reversa para la obtención de cDNAs fue realizada de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, 150 ng de cada muestra fue mezclada con 1  $\mu$ L de de partidores, 2  $\mu$ L de tampón RT 5X, 1  $\mu$ L de nucleótidos, 1  $\mu$ L de la mezcla de enzimas (Poli-A polimerasa y transcriptasa reversa) y H<sub>2</sub>O libre de RNasas hasta completar un volumen final de 10  $\mu$ L. En un termociclador convencional (Applied Biosystems 2720), las muestras fueron incubadas por 2 h a 37°C. Luego, las muestras fueron calentadas a 95°C con el fin de inactivar la transcriptasa reversa. Finalmente las muestras son enfriadas en hielo por 1 min y se adiciono 90  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de RNasas para completar un volumen de 100  $\mu$ L las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta la realización del PCR en tiempo real.

Para la realización del PCR en tiempo real, se mezcló en tubos libres de nucleasas de 15 mL, 100  $\mu$ L de cDNA correspondiente a cada muestra, 5 mL de *SYBR Green PCR master mix* 2X y 4,9 mL de H<sub>2</sub>O para completar un volumen de 10 mL. Luego, 25  $\mu$ L de la mezcla son adicionados cuidadosamente a cada pocillo de las placas de 96 pocillos que contienen los partidores específicos para cada miRNA de rata. La reacción de PCR en tiempo real fue realizada por medio de un programa de 3 pasos. El primer paso consistió en un único ciclo de 10 min a 95°C para activar la DNA Polimerasa (*HotStart*). El segundo paso correspondió a 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 seg; 60°C por 30 seg y 72°C por 30 seg. Finalmente, un ciclo final de 72°C durante 30 segundos para la realización de una curva de disociación (*melting curve*).

Después de finalizados los ciclos de amplificación, se determinó una línea base en forma automática usando la función "línea base adaptativa" del instrumento de PCR. El valor

umbral se determinó en forma manual, con el fin de obtener los valores de ciclo umbral (C<sub>t</sub>). Este valor umbral fue utilizado para el análisis de todas las reacciones.

# 3.5. Cuantificación de la expresión de miRNAs hipocampales mediante el método $\Delta\Delta C_t$

Los valores C<sub>t</sub> de cada miRNA fueron exportados a la plataforma en línea de QIAGEN, (<u>http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php</u>) para el cálculo automático de la expresión de los miRNAs en presencia de Foxy-5, mediante el método  $\Delta\Delta C_t$  (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008). El cálculo de la expresión del miRNA de interés (L) se expresa matemáticamente de acuerdo a la ecuación 1:

$$L = 2^{-Ct(miRNA)}$$

La expresión del miRNA de interés fue normalizada al valor C<sub>t</sub> promedio de genes de expresión constitutiva (*housekeeping*) incluidos en el sistema comercial (Rnu6, U87, 4.5S-V1, Y1) de acuerdo a la ecuación 2:

$$\frac{2^{-Ct(miRNA)}}{2^{-Ct(housekeeping)}} = 2^{-(Ct(miRNA) - Ct(housekeeping))} = 2^{-\Delta Ct}$$

Finalmente la determinación de las veces de cambio (*Fold change*) en la expresión del miRNA en la condición tratada con Foxy-5 respecto al control, responde a la ecuación 3:

$$\frac{\frac{2^{-Ct(miRNA)}Foxy5}{2^{-Ct(housekeeping)}Foxy5}}{\frac{2^{-Ct(miRNA)}Control}{2^{-Ct(housekeeping)}Control}} = \frac{2^{-(Ct(miRNA)-Ct(housekeeping))}Foxy5}{2^{-(Ct(miRNA)-Ct(housekeeping))}Control} = \frac{2^{-\Delta Ct}Foxy5}{2^{-\Delta Ct}Control} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Todos los valores C<sub>t</sub> superiores o iguales a 35 fueron considerados como no detectados y en consecuencia no fueron incluidos en los análisis de variación. Los resultados fueron representados como "*fold-regulation*" al tomar el valor inverso negativo de cualquier número menor a 1, cambiando así desde un numero fraccional a un número entero. El programa usa *student T test* para evaluar la significancia estadística de los cambios observados. Adicionalmente, se utilizó como criterio de inclusión un mínimo de 5 veces de "*fold-regulation*" de acuerdo a trabajos previos (Jovičić et al., 2013).

#### 3.6. Uso de herramientas Bioinformáticas

Para la predicción *in silico* de los posibles blancos de los miRNAs regulados luego de la activación de la vía Wnt no canónica, se utilizó el programa en línea TargetScan (Lewis et al., 2005) el cual predice blancos biológicos de miRNAs al buscar la presencia de sitios conservados de 7- y 8-mer en el 3' UTR de mRNAs de mamíferos que hibriden con la región semilla de cada miRNA. Por otro lado, TargetScan evalúa la estabilidad termodinámica de cada sitio de unión usando el motor del programa RNAfold (Hamzeiy et al., 2014).

Con el fin de acotar el número de blancos obtenidos por TargetScan y al mismo tiempo orientar la elección de blancos atingentes a procesos relacionados a plasticidad sináptica, se utilizó el programa en línea DIANA-mirPath (Papadopoulos et al., 2009). Este programa realiza un análisis de enriquecimiento de blancos predichos de miRNAs en los procesos biológicos de la base de datos KEGG *pathways* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa and Goto, 2000). El análisis de enriquecimiento es realizado por medio de una Prueba de Chi cuadrado de Pearson:

$$\chi^2 = \Sigma \left[ \frac{(O-E)^2}{E} \right]$$

Donde O corresponde al número de blancos de miRNAs que fueron encontrados dentro de un proceso biológico en particular y E corresponde al número de blancos de miRNAs que se espera por chance sea parte de dicha vía, considerando el largo de las listas de blancos predichos y la vía de KEEG. El efecto combinatorio de miRNAs co-regulados en la modulación de un proceso biológico en particular, es considerado por el programa para generar una jerarquización de las vías reguladas de por dichos miRNAs representado por el logaritmo natural negativo del valor de P (-Ln P) (Papadopoulos et al., 2009).

# 3.7.Análisis de la expresión de los mRNAs de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y Rho quinasa 2 (ROCK2)

20 µg/µl de RNA total, fue utilizado para la síntesis de cDNA usando el sistema de transcripción reversa GoScrip (Promega). La determinación de la expresión del mRNA de COX-2 y ROCK2 fue evaluada por PCR cuantitativo (qPCR) usando el sistema de PCR en tiempo real *StepOne 48 wells* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) y el *kit Fast SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems). Brevemente, 4 µl de cDNA fueron mezclados con 4 µl de H<sub>2</sub>O DEPC, 10 µl Master Mix, 1 µl *reverse primer* y 1 µl *forward primer* para un volumen total 20 µl. El gen de referencia utilizado fue la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; *forward primer*: 5'-CACGGCAAGTTCAACGGC-3'; reverse primer 5'-GGTGGTGAAGACGCCAGTA-3') a una temperatura de *annealing* de 60°C. La secuencia de los *primers* de COX-2 es: *forward primer*: 5'-TGTATGCTACCATCTGGCTTCGG-3', *reverse primer* 5'-GTTTGGAACAGTCGCTCGTCATC-3'. La secuencia de los *primers* de

ROCK2 es: *forward primer*: 5'-GCTCCAGACCCTTTTGCCCG-3', *reverse primer* 5'-GGCAGTTAGCTTGGTTTGTTTGGA-3'.

# 3.8. Purificación de plasmidio recombinante

Bacterias de la cepa DH5 $\alpha$  que contenían el plasmidio para la expresión de GFP fueron crecidas en medio Luria-Bertani (Peptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L y ampicilina 100 µg/mL) bajo agitación y a 37°C durante toda la noche. Para la purificación del plasmidio a mediana escala (50 mL de cultivo bacterial) se siguieron las indicaciones del proveedor del sistema comercial *HiSpeed Plasmid Midi kit*, basado en el método de lisis alcalina y filtración con columnas.

La concentración de DNA fue determinada usando un espectrofotómetro de luz UV, midiendo la  $A_{260}$ , donde una unidad de densidad óptica equivale a 50 µg/mL (ADN doble hebra). Del mismo modo, la pureza fue evaluada midiendo la razón  $A_{260}/A_{280}$  donde se obtuvieron valores superiores a 1.8 que indican un elevado grado de pureza.

### 3.9. Lipofección de Células HT22

Para los experimentos de ganancia de función de miR-101b en células HT22, se utilizó el método de Lipofectamina según las recomendaciones del proveedor. Brevemente, células crecidas en multiplacas de 6 pocillos por 48 h hasta un 60% de confluencia fueron lavadas con PBS 1X estéril y luego se adiciono 1,8 mL de Optimen. Luego, se diluyó en forma separada la lipofectamina y distintas cantidades de miR-101b *mimic* (25, 50, 75 y 100 pmoles) en 100  $\mu$ L de optimen durante 5 min. Luego se formaron los liposomas al mezclar la lipofectamina y el miR-101b *mimic* durante 20 min a temperatura ambiente. Los 200  $\mu$ L de liposomas fueron

agregados gota a gota a los cultivos y fueron incubados durante 4 h a 37°C en estufa de cultivo. Al cabo de este período, se reemplazó el medio con DMEN fresco. El efecto de la ganancia de función de miR-101b fue evaluado 48 h posterior a la transfección por medio de WB.

Para experimentos de IF, se utilizó el mismo procedimiento ajustando los volúmenes para cultivos crecidos sobre cubreobjetos en multiplaca de 24 pocillos. Además se adicionó a los liposomas un plásmido que incluye la secuencia de la proteína fluorescente verde (GFP; 0,5 µg por pocillo).

## **3.10.** Magnetofección de cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata

La magnetofección fue realizada de acuerdo a protocolos publicados previamente (Marchionni et al., 2009; Opazo et al., 2010) con algunas modificaciones. Brevemente, el medio de mantención de las neuronas de 12 DIV fue recuperado y almacenado en hielo. Las neuronas fueron lavadas en PBS 1X estéril y se adicionaron 400  $\mu$ L de medio Neurobasal. En paralelo, se formaron complejos no covalentes entre las partículas magnéticas (1,75  $\mu$ L, la mitad de los sugerido por el proveedor) y el material genético (0,8  $\mu$ g de GFP más 75 pmoles de miR-101b *mimic*) en 100  $\mu$ L de medio Neurobasal durante 20 min a temperatura ambiente. Las neuronas fueron incubadas con los complejos durante 15 min sobre una placa magnética y 45 min adicionales sin la placa magnética en estufa de cultivo. Finalmente, los complejos fueron reemplazados por el medio de cultivo recuperado previamente. El efecto de la magnetofección con miR-101b/GFP fue evaluado 48 h después por IF.

#### 3.11. Extracción, cuantificación y análisis de Proteínas mediante Western Blot

Posterior al estímulo con rWnt-5a los cultivos hipocampales fueron lavados con PBS  $Ca^{+2}Mg^{+2}$  en hielo y luego lisados con 150 µL de tampón de lisis *RIPA* (TRIS Cl 50 mM, NaCl 150 mM, dioxicolato de sodio al 0,5% y SDS al 0,1%) suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasas (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaF 50 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>7</sub> 300 µM). Después de 20 min en tampón de lisis y disrupción mecánica el lisado fue centrifugado por 10 min a 14.000 rpm a 4°C y el *pellet* fue descartado. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su cuantificación y preparación para WB.

Para la detección colorimétrica y cuantificación de proteína total, se utilizó un sistema comercial que se basa en el método del ácido bicinconínico (BCA) el cual es compatible con muestras que contienen detergente. 1  $\mu$ L de cada muestra fue mezclado con 200  $\mu$ L de los reactivos incluidos en el sistema comercial y 150 de H<sub>2</sub>O en pocillos de 0,32 cm<sup>2</sup> y se permitió el desarrollo de color durante 30 min a 37°C. En paralelo se realizó en la misma placa de 96 pocillos una curva de calibración con distintas concentraciones de BSA (desde 0.5  $\mu$ g hasta 4 $\mu$ g). La concentración fue estimada en un lector de placas de Elisa a una longitud de onda de 550 nm. El rendimiento promedio de las extracciones fue de aproximadamente 1  $\mu$ g/ $\mu$ L por muestra.

Entre 10 a 20 µg de proteína fueron resueltos en geles de poliacrilamida de 1,5 mm de espesor al 10% en condiciones denaturantes, para su posterior electrotransferencia a membranas de PVDF previamente activadas en metanol. Además se utilizó un estándar de peso molecular para la determinación del peso de la proteína de interés. Luego, las membranas fueron bloqueadas en PBS1X suplementado con BSA al 5% durante 1 h a temperatura

ambiente. Las proteínas fueron visualizadas mediante inmunodetección usando los anticuerpos primarios descritos en la tabla I. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución de bloqueo e incubados toda la noche a 4°C. Luego de varios lavados en PBS1X suplementado con Tween 20 al 0,05%, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados a HRP durante 1 h a temperatura ambiente. La detección de la proteína de interés se realizó mediante una reacción quimioluminiscente y autoradiografía en películas fotográficas. El análisis densitométrico de imágenes digitalizadas de las películas reveladas se realizó mediante el *plug in gel analyzer* incluído en el Programa *Image J (US National Institutes of Health (NIH)*, Bethesda, MD, USA). Los niveles de expresión fueron expresados como la razón de la intensidad de la banda proteína de interés respecto a la proteína de expresión constitutiva, GAPDH.

# 3.12. Estudios de Inmunofluorescencia

Posterior al estímulo con rWnt-5a los cultivos hipocampales fueron lavados con PBS  $Ca^{+2}Mg^{+2}$  en hielo y luego fijados en una solución fría de paraformaldehído-sacarosa al 4% durante 20 min a 4°C. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas en PBS1X- Triton-X100 al 0,2% durante 5 min a temperatura ambiente y luego bloqueadas con una solución de BSA al 1% en PBS  $Ca^{+2}Mg^{+2}$  durante 1 h, también a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con 20 µL de anticuerpo primario (tabla I) durante toda la noche a 4°C, en la modalidad de cubreobjeto invertido en cámara húmeda. Luego de varios lavados, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario respectivo (tabla I) durante 1 h a 37°C y protegidos de la luz. Finalmente los cubreobjetos fueron montados en un portaobjeto mediante el uso de la solución de montaje Fluoromont G durante toda la noche a temperatura ambiente.

## **3.13.** Microscopia Confocal y análisis de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia confocal Olympus LSM fluoview 1000 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Chile. Para el análisis de células individuales se tomaron imágenes a un aumento de lente objetivo de 60X con apertura numérica de 1,4 en presencia de aceite de inmersión.

El análisis de agregados de proteínas (*clusters*) se realizó utilizando el *plug-in analyze particles* del programa *Image J* sobre imágenes binarizadas y con reducción de ruido de fondo (*background*). El límite de rango de tamaño establecido para los agregados fue de 0.04-1  $\mu$ m<sup>2</sup> de acuerdo a trabajos previos (Farías et al., 2009). Se adquirieron imágenes de 10 campos para cada condición experimental, de tres experimentos independientes. Cada campo contiene los procesos de una neurona única, se seleccionan tres neuritas de cada neurona. El programa informa número de partículas (el cual fue normalizado por el largo de la dendrita en  $\mu$ m), área promedio e intensidad de fluorescencia de las partículas.

Para análisis referentes a espinas dendríticas de neuronas transfectadas con GFP, se adquirieron imágenes a lo largo del eje z cada 0,25  $\mu$ m (11 a 18 fotos por neurona) con el fin de obtener toda la información estructural. Estas imágenes fueron integradas en una proyección de máxima intensidad de fluorescencia y luego deconvolucionadas usando un algoritmo de deconvolución en ciego (*adaptive blind*) del programa AutoQuant X3 (Media Cybernetics. Rockville, MD, USA). Las imágenes deconvolucionadas fueron exportadas al programa Imaris (Versión 7.4.2, Bitplane. Saint Paul, MN, USA) para la reconstrucción de imágenes en 3D y el análisis de densidad de espinas dendríticas. Este programa permite realizar una detección semiautomática de las estructuras, definiendo dendritas y protrusiones, así como el largo de estas.

# 3.14. Análisis estadístico

Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) aplicando la prueba Mann-Whitney U-test ó ANOVA de una vía, seguido del post-test Bonferroni, según corresponda. Un valor de p<0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

#### 4. <u>RESULTADOS</u>

# 4.1.Análisis de expresión de miRNAs en neuronas hipocampales en cultivo, en respuesta al tratamiento con Foxy-5

Cultivos de neuronas hipocampales de rata, de 14 DIV fueron tratados con Foxy-5 (50  $\mu$ M) o un péptido control (50  $\mu$ M) durante 1 hora (n=3). Posteriormente, se realizó una extracción de RNA total y un posterior enriquecimiento en RNAs pequeños (<200 nt) con el fin de disminuir los falsos positivos que pueden generar los precursores de mayor tamaño. La cuantificación por espectrofotometría determinó una concentración promedio de 12,2 ng/ $\mu$ L en 100  $\mu$ L de eluído. Este rendimiento no permitía utilizar la cantidad mínima de RNAs pequeños recomendada por el proveedor para la obtención del cDNA (100 ng). Por este motivo se realizó un proceso de liofilización de las muestras con el fin de concentrarlas en un volumen final de 10  $\mu$ L. Este procedimiento concentró las muestras hasta 45.1 ng/ $\mu$ L en promedio (3.7 veces) sin afectar los parámetros de calidad de la muestra como la integridad de las bandas observadas en geles de acrilamida al 15% y la razón A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> y (Figura. 3A y Anexo 1).

Las muestras tratadas y control, que cumplían con buenos estándares de calidad, fueron utilizadas para evaluar la expresión de miRNAs por medio de PCR *array*. Se realizó una reacción de RT-PCR, en la cual se poliadenilaron los miRNAs y luego se convirtieron a cDNA usando un primer universal oligo dT. Este templado fue utilizado para realizar un PCR en tiempo real, usando SYBRgreen como fluoróforo reportero. El *master mix* fue alicuotado en placas de 96 pocillos los cuales se dividen en un set de *primers* específicos para miRNAs, genes de expresión constitutiva y controles internos de calidad del PCR, se analizaron 3 placas para un total de 264 miRNAs. Luego del PCR en tiempo real se realizó una curva de disociación (*melting curve*) la que como se esperaba, generó en todas las reacciones un producto único observable a temperaturas superiores a 70°C (Anexo 2). Otro control de calidad de la reacción de PCR corresponde al valor C<sub>t</sub> esperado para el promedio del control positivo el cual debe ser 20  $\pm$  2. El valor obtenido fue de 18,29  $\pm$ 0,06 demostrando la idoneidad de la reacción de PCR. Cabe mencionar, que este valor fue calculado al ajustar manualmente el valor umbral de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Los valores C<sub>t</sub> obtenidos, fueron analizados con la plataforma *on line* de Qiagen, *PCR Array* Data Analysis Web Portal, la cual normaliza los resultados respecto a los valores Ct de los genes de expresión constitutiva. De los 264 miRNA evaluados, un 8% no fue detectado, vale decir el valor  $C_t$  fue superior a 35 ciclos tanto en la muestras tratadas con Foxy5 así como en las muestras control (Figura 3B, grupo verde). Un 37% fue detectado en niveles bajos ( $C_t > 30$ ciclos) en ambas muestras (Figura 3B, grupo gris). Un 27% fue detectado en forma abundante, es decir sus valores C<sub>t</sub> fueron menores a 30 ciclos en ambas muestras (Figura 3B, grupo celeste) y finalmente el 28% restante correspondió a miRNAs que se detectaron abundantemente en una de las condiciones experimentales y en la otra condición su detección fue baja (Figura 3B grupo rojo). De acuerdo a las instrucciones del proveedor, para el cálculo de la variación en la expresión de miRNAs tratados con Foxy-5 respecto a la situación control, se consideraron solo los miRNAs detectados en forma abundante en al menos una de las muestras (grupos celeste y rojo en Figura 3B). Así, se determinaron cambios significativos en 34 miRNAs (p<0.05) de los cuales 3 aumentaron su expresión (miR-24, -146b and -153) y 31 disminuyeron su expresión (Figura. 3C).



Fig. 3. Foxy-5 regula la expresión de miRNAs en neuronas hipocampales en cultivo. A. Análisis en gel denaturante de acrilamida al 15% de muestras enriquecidas en RNAs pequeños (<200nt), post-liofilización (1 µg por carril). B. Porcentajes de expresión de los 263 miRNAs analizados en este estudio. Verde, corresponde a miRNAs no detectados. Gris, expresión baja. Celeste, expresión alta y Rojo, expresión alta en una de las muestras, control o tratadas. C. Cambios en la expresión de miRNAs de neuronas hipocampales de 14 DIV tratadas por 1 h con 50 µM de Foxy-5 (p<0.05, n = 3). Entre los 34 miRNAs regulados por el péptido mimético de Wnt-5a, destaca miR-101b como el más afectado.

Con el fin de comprender el rol de los miRNAs regulados por el tratamiento con Foxy-5, realizamos un análisis *in silico*, mediante herramientas que son capaces de predecir los posibles blancos de estos miRNAs así como su participación en diversos procesos biológicos (Figura 4A). Este análisis es importante, primero porque permite evaluar el posible impacto funcional de la modulación global de muchos miRNAs, los cuales tienden a funcionar en forma cooperativa. De este modo, es esperable que las funciones biológicas posiblemente afectadas por este conjunto de miRNAs, coincida con aquellos procesos en los cuales Wnt-5a ha sido previamente vinculado. En segundo término, la predicción genera una lista de posibles blancos que estudiados individualmente, puedan explicar parte del mecanismo que subyace a los efectos sinápticos de Wnt-5a.

Usando el programa en línea TargetScan, obtuvimos un total de 3.703 posibles blancos de los miRNAs modulados por Foxy-5. De estos, 946 corresponden potenciales genes blancos de miRNAs aumentados y 2757 a potenciales genes blancos de miRNAs disminuidos en nuestras condiciones experimentales (Figura 4 B y C). Para entender el significado funcional de estos blancos, utilizamos el programa en línea Diana miRpath, el cual identifica procesos biológicos rio abajo de los miRNAs modulados. Dentro de los 15 procesos biológicos, más representados, tanto para miRNAs aumentados como disminuidos, se observa un enriquecimiento importante en vías relacionadas a varios tipos de cáncer (Figura 5), lo cual es consistente con el rol del ligando Wnt-5a en estas patologías (Kikuchi et al., 2012). Interesantemente, también se describen procesos biológicos relacionados a procesos de plasticidad sináptica, tales como la vía de las

Target	KEGG	Diana
scan5	pathways	mirpath

Β

Α

miRNAs Aumentados	Número de Genes	Número de Genes en KEEG
Unión	946	224
miR-146b	145	33
miR-153	485	116
miR-24	369	89

С

miRNAs	Número de	Número de
disminuidos	Genes	Genes en KEEG
Unión	2757	722
miR-101b	383	92
let-7a	592	159
miR-483	1	1
miR-342-3p	101	28
let-7e	592	159
miR-191	26	6
miR-376c	105	33
miR-185	86	24
miR-134	47	10
miR-92a	486	110
miR-125a-5p	414	106
miR-151-3p	40	10
miR-320	334	90
let-7c	592	159
miR-99b	31	11
miR-434-3p	63	16
miR-15b	670	168
miR-23b	540	136
let-7f	592	159
miR-192	55	11

**Fig 4. Análisis bio-informático de los miRNAs modulados por Foxy-5. A.** esquema de los programas *on line* utilizados para el análisis de blancos de miRNA y participación en procesos biológicos. **B.** Número de blancos predichos para los 3 miRNA que aumentaron su expresión. **C.** Numero de blancos predichos para los 31 miRNAs que disminuyeron su expresión. En negrita se destaca el número de blancos de miR-101b.



**Fig. 5. Predicción** *in silico* de procesos biológicos regulados por Foxy-5 vía miRNAs. La figura muestra los 15 procesos biológicos inscritos en la base de datos de KEGG *pathways* con mayor enriquecimiento de blancos de los miRNAs disminuidos por el tratamiento con Foxy-5.

MAP quinasas, adhesión focal, la vía mTor, guía axonal, regulación del citoesqueleto de actina y la vía de señalización Wnt (Figura 5) reforzando la idea de que la modulación de miRNAs contribuye a los efectos sinápticos de Wnt-5a.

#### 4.3. Análisis y validación de blancos río abajo de la señalización Wnt

Para poder establecer una relación causal entre la señalización mediada por Wnt-5a y la acción de los miRNAs, es necesario establecer y estudiar la expresión de algunos de los blancos predichos *in silico*. Con este fin, establecimos arbitrariamente 2 criterios de elección: en primer término, acotamos la búsqueda a blancos de miR-101b, el miRNA que presentó la mayor variación en su expresión en presencia de Foxy5 (Figura 3B), este miRNA posee 383 blancos, de los cuales 92 participan en procesos biológicos descritos en la base de datos KEEG *pathways* lo que acota el margen de búsqueda sustancialmente (Figura 4C). En segundo término, elegimos un blanco que previamente haya sido relacionado a procesos de plasticidad sináptica.

En base a esta estrategia, elegimos a ROCK2 una proteína con un rol importante en la regulación de la estructura y función de las espinas dendríticas (Govek et al., 2005; Niisato et al., 2005; Rex et al., 2009; Zhou et al., 2009; Murakoshi et al., 2011) y además posee un puntaje de predicción muy favorable, en base a las características de la posible interacción entre la región semilla de miR-101b y el sitio de unión en el 3'UTR de su mRNA. Estas características incluyen tipo de hibridación (8mer, 7mer-m8, 7mer-1A, 3'comp, etc), contribución local de AU, la posición del sitio de unión dentro del 3'UTR, la estabilidad termodinámica del duplete miRNA-blanco (como función del contenido A+U en la secuencia

semilla) y la abundancia del sitio de unión dentro del conjunto de 3'UTR y el nivel de conservación del sitio entre el 3'UTR de distintas especies (Figura 6).

Efectivamente, la predicción de la interacción entre miR-101b y el 3'UTR ROCK2 posee un puntaje (*Context score+*) de -0,29 el cual es incluso mejor que el puntaje de varios pares miRNA:mRNA descritos y validados en la literatura. Por ejemplo, miR-181a un miRNA enriquecido en sinaptosomas y modulado por dopamina, regula la expresión de la subunidad del receptor de glutamato tipo AMPA, GluA2 en neuronas dopaminérgicas (Saba et al., 2012). La predicción por la cual los autores deciden evaluar y validar esta interacción arroja un puntaje de -0,08 lo que constituye un valor menos favorable al de miR-101b:ROCK2, pues mientras más bajo el valor, la predicción es más favorable (Garcia et al., 2011).

Sin embargo, a pesar de las mejoras que se han realizado en los algoritmos para la identificación de blancos de miRNAs, existe una serie de factores que determinan una tasa de falsos positivos, que en el caso de TargetScan corresponde a un 22% aproximadamente (Hamzeiy et al., 2014). Si bien este valor es menor al de otros programas empleados para determinar blancos de miRNAs, este porcentaje exige una validación experimental. Para este fin, realizamos un experimento de ganancia de función de miR-101b en células HT22 con el fin de evaluar su efecto en la expresión de ROCK2 endógeno. Las células HT22 corresponden a una línea de neuronas hipocampales de ratón inmortalizadas. Estas células fueron elegidas pues el 3'UTR de ROCK2 de ratón es idéntico al de rata (Figura 6B, rno y mmu) y en consecuencia se espera que la predicción realizada usando como referencia el genoma de rata sea posible validarla en esta línea de ratón.

# Α

# Rat ROCK2 3' UTR

<b>4</b> + + + + + + +	0.1k 0.2	+++++++++++ k 0.3k	0.4k	••••• <del> ••••</del> 0 <b>.</b> 5k	•••••• 0.6k	•••• <u>+</u> ••••• 0.7k	•••••• 0.8k	0.9k	<del> </del> 1k	1.1k	<del>+ +</del> 1.2k
<b>Gene</b> Rat ROCK2	2 NM_004850 3′ UTR	length:1440									
Conserve	ed sites for nil	RNA families miR-	broadly conser 142-3p miR-138/138a ∎	wed among wiR- miR-	miR-12	35ab/135a-5n	miR-124/124a	b/506 miR-130ac/	301ab/301b/3	01b-3p/454/72	1/4295/3666
Key: Sites with high 8mer Sites with lowe 8mer	er probability of prefere 7mer-m8 7mer-1 er probability of prefere 7mer-m8 7mer-1	ential conservation A 3' comp* ntial conservation A 3' comp*				5546, 1554 66					

# B

# Conserved

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 515-522 of ROCK2 3' UTR	5'ACACAUAAACACAUUGUACUGUA         3' AAGUCAAUAGUGUCAUGACAU
Position 515-522 of ROCK2 3' UTR rno-miR-101b	5'ACACAUAAACACAUUGUACUGUA         3' AAGUCGAUAGUGUCAUGACAU

			510	520		530
no	a	-c	ACAIIII	GUACUGU	-AA-UACUG	CAAG-
lea	D	-11	AUAUA	GUACUCU	-AA-UACUG	CAAGA
)+ r	A	-11	AUAUA	CUACUCU	-AA-UACUG	CAACA
for 1	7	17	AUAUA	CUNCUCU	-AA-UACUG	CAAGA
	12	-0	MOMOR	GOACOCO	-AA-UACUG	CAAG-
lba	7	C	20202	CURCUCH	D D D U D CUIC	C3.3.C
be	A		ACACA	GUACUGU	-AAAOACOG	CAAG
mu	A2	40	ACAUU	GUACUGU	-AA-UACUG	CAAG-
po		-C	AGGUU		GA-UGUGU	CGAG-
cu	A	-C	ACACA	GUACUGU	-GA-UACUG	CAAG-
ar	A	-0	UUAUA	UAUAUAUAUA	AUCG-UACUG	CGAGA
leu	A	-G	CUGCA	GGG	-CU-UGCUG	CAGGA
fa	A	-U	AUAUAAU	JAGUACUGU	-AA-UACUG	CAAGA
'ca						
lca	A	-U	AUAUA	GUACUGU	-AA-UACUG	CAAGA
Bta	A	-CAC	ACAUA	GUACUGU	-AA-UACUG	CAAGA
no	A			GAAUUGU	-GA-UAUUG	CAGCA
af	AUAUGU	GU	AUAUA	GUACUGU	-AA-UACUG	CAAGA
te	ACACAC	AC	UCACA	GUACUGU	-CA-UUCUG	UAGG-
Ido	A	-U	AUGUA	GUACUGU	-AA-UACUG	CAAGA
an	A	-U	AUAUU	GUACUGU	-AA-UACUG	CAAGA
Ica	G	-U	ACAUU	GUACUGU	-AA-UGCUG	CAAGA
ga	A	-U	AUAUU	GUACUGU	-AA-UACUG	CAAGA
tr	G	-U	AUACU			CAAGA
				miR-101/1	01ab	
on	A	.u	AUAUA.		.AA.UACUG	CAAGA

С

seed match	site-type contri- bution	3' pairing contri- bution	local AU contri- bution	position contri- bution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length
8mer	-0.247	0.003	-0.078	0.016	0.011	0.007	-0.29	94	1.502
8mer	-0.247	0.003	-0.078	0.016	0.011	0.007	-0.29	94	1.502

**Fig. 6. ROCK2 es predicho** *in silico* **como un potencial blanco de miR-101b. A.** Esquema del 3'UTR de ROCK2 de rata y la posición de posibles interacciones con miRNAs conservados. **B.** Complementariedad de secuencias entre la región semilla de miR-101b y el MRE de ROCK2. A la derecha se muestra la conservación del MRE en distintos mamíferos. C. Predicción de la regulación de miR-101b sobre ROCK2 en base a la contribución de distintos parámetros. Después de 48 h posterior a la transfección de miR-101b, se evaluó la expresión de ROCK2 por medio de WB. Como se observa en la figura 7, los niveles endógenos de ROCK2 fueron disminuidos en forma dependiente de la concentración de miR-101b, indicando que la expresión de ROCK2 es controlada por este miRNA.

Para confirmar la eficacia de la acción del miR-101b *mimic*, analizamos los niveles de expresión de COX-2 (también conocida como prostaglandina-endoperóxido sintasa 2, PTGS2) una proteína blanco de miR-101b que previamente ha sido validada en varios modelos celulares incluido el neuronal (Strillacci et al., 2009; Vilardo et al., 2010; Hao et al., 2011; He et al., 2012). COX-2 posee en su 3' UTR un sitio de unión a miR-101b muy similar al de ROCK2, vale decir corresponde a un sitio de 8-mer el cual es conservado entre los mamíferos y su puntaje de predicción es -0.19 (Figura 8), levemente menos favorable al de ROCK2 (Figura 6). Como se esperaba, la ganancia de función de miR-101b en células HT22 generó una disminución significativa en los niveles de COX-2 en forma dependiente de la concentración de miR-101b (Figura 9), consistente con la predicción *in silico*, lo reportado previamente en la literatura y confirmando además la eficacia del miR-101b *mimic*.

La disminución en los niveles endógenos de ROCK2 producto de la ganancia de función de miR-101b, también fue observada mediante inmunofluorescencia en neuronas hipocampales de 14 DIV. Como se observa en la figura 10, la co-magnetofección de miR-101b/GFP genera una disminución en la intensidad de fluorescencia de ROCK2 en comparación a neuronas magnetofectadas solo con GFP.



**Fig. 7. Validación experimental de la regulación de miR-101b sobre ROCK2. A.** Western Blot análisis de ROCK2 sobre muestras de células HT22 transfectadas por 48 h con miR-101b *mimic* ó miRNA *mimic Negative Control* (75 pmoles). **B.** Análisis densitométrico del WB descrito en A. (\* p<0,05. n=4)



# Rat PTGS2 3' UTR

<b>€</b> k 0.1k 0.2k	0.3k 0.4k	0.5k	0.6k	<del></del>	******* k 0.9k	•••••• ••• 1k	1.1k	1.2k	1.3k	1.4k	1.5k	1.6k	1.7k	1.8k	1.9k	+++++  2k
Gene Rat PTGS2 NM_000963 3	Y UTR length:	2397														
Conserved sites for Key: Sites with higher probal Bar 7 mer-m Sites with lower probab Bar 7 mer-m	n niRNA fan R-26ab/1297/4 miR-194 illity of preferent a 7mer-1A illity of preferentia a 7mer-1A	ilies br 465 ial conserv 3' co al conserva 3' co	ation mp* mp*	onserved	mong ver	rtebrat	es					miR-1	-101/101; 43/1/21/ -144	ab 74770		



# Conserved

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 1599-1606 of PTGS2 3' UTR	5'UCAUUAUCAGCUGAG <mark>GUACUGUA</mark>
rno-miR-101a	3' AAGUCAAUAGUGUCAUGACAU
Position 1599-1606 of PTGS2 3' UTR	5'UCAUUAUCAGCUGAGGUACUGUA
rno-miR-101b	3 ' AAGUCGAUAGUGUCAUGACAU

AUUAUCAGCUGAGGUACUGUAUAUUA-CU
AUUGUCA-CUGACAUUUA-AUGGUACUGUAUAUUA-CU
AUUGUCA-CUGACAUUUA-AUGGUACUGUAUAUUA-CU
AUUGUUA-CUGACAUUUA-AUGGUACUGUAUAUUA-CU
CUUGUCAGCUGACACGUA-AUGGUACUGUAUAUUA-CU
AUUUCAG-CUGACAUUUG-AUGGUACUGUACU
AUUAUCAGCUGAGGUACUGUAUAUUA-CU
UGUAUCUAA-CU
ACUGUCAGCUGA-ACUUA-AUGGUACUGUAUAUUA-CL
AUUGUCAUCUAACAUUUCUGGUACUGUAUGUCA-CU
AUUGUCAGCUGACAUUUG-CUGGUACUGUAUACU
AUUGUCAGCUGACAUUUG-CUGGUACUGUAUACUA-CU
AUUGUCAGCUGACAUUUU-CUGGUACUGUGUAUUA-CU
AUUGUCAGUUGACAUUUU-CUGGUACUGUAUAUUAAUU
AUUGUCAGCUGACAUUUUUCUGGUACUGUAUAUUA-UL
AUUGUCAGCUGACAUUUUUCUUGUACUGUAUAUUAAUU
miR-101/101ab
AUUGUCA.CUGACAUUUUGGUACUGUAUAUUA.CU

С

seed match	site-type contri- bution	3' pairing contri- bution	local AU contri- bution	position contri- bution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length
8mer	-0.247	-0.039	-0.013	0.086	0.011	0.007	-0.20	85	2.158
8mer	-0.247	-0.029	-0.013	0.086	0.011	0.007	-0.19	84	2.158

**Fig. 8. COX-2 (PTGS2) es predicho** *in silico* **como un potencial blanco de miR-101b. A.** Esquema del 3'UTR de COX-2 de rata y la posición de posibles interacciones con miRNAs conservados. **B.** Complementariedad de secuencias entre la región semilla de miR-101b y el MRE de COX-2. A la derecha se muestra la conservación del MRE en distintos mamíferos. C. Predicción de la regulación de miR-101b sobre COX-2 en base a la contribución de distintos parámetros.



**Fig. 9. Validación experimental de la regulación de miR-101b sobre COX2. A.** Western Blot análisis de COX2 sobre muestras de células HT22 transfectadas por 48 h con miR-101b *mimic* miRNA ó miRNA *mimic Negative Control* (75 pmoles). B. Análisis densitómetrico del WB descrito en A. (\* p<0,05. n=4)



Fig. 10. miR-101b disminuye la expresión de ROCK2 en neuronas hipocampales en cultivo. A. Imágenes representativas de neuronas magnetofectadas en 12 DIV y analizadas por inmunofluorescencia en 14 DIV. Panel superior. Neuronas transfectadas con miRNA control más un plasmidio codificante de GFP. Panel inferior. Neuronas transfectadas con un miR-101b mimético más un plasmidio codificante de GFP. En rojo se muestra la señal de ROCK2 y en verde la de GFP. La flecha muestra la neurona trasfectada que en caso de miR-101b, se observa una disminución en los niveles de ROCK2. B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ROCK2 a nivel del soma. Mann–Whitney U-test. \*\* p<0.01. n=3.

### 4.4.Wnt-5a regula la expresión de ROCK2 en neuronas hipocampales

Luego de verificar que miR-101b es capaz de regular la expresión de ROCK2, decidimos evaluar si la disminución observada de miR-101b mediada por el péptido mimético de Wnt-5a, resulta en un aumento en la expresión de sus blancos en neuronas hipocampales de rata en cultivo. Para este fin realizamos estudios de WB en lisados de neuronas hipocampales de 14 DIV estimuladas por distintos tiempos con rWnt-5a (300 ng/mL). Como se observa en la Figura 11, la expresión de ROCK2 aumenta en forma dependiente del tiempo, siendo significativo luego de 60 min de estimulación. Esto es interesante considerando que coincide con el tiempo en el que se evaluó el cambio en la expresión de los miRNAs y se determinó la disminución de miR-101b.

Para determinar si el cambio en la expresión de ROCK22 es dependiente de un efecto transcripcional, evaluamos los niveles de mRNA de ROCK2 en neuronas tratadas por 1 hora con rWnt-5a por medio de RT-qPCR en tiempo real. El análisis no mostro cambios significativos en los niveles de mRNA de COX-2 (Figura 11C), sugiriendo que el aumento en los niveles proteicos, es dependiente de mecanismos post-transcripcionales, lo que es consistente con un aumento en la traducción mediante la disminución en la represión traduccional mediada por miR-101b.

En forma complementaria, evaluamos el cambio en la expresión de ROCK2 mediante inmunofluorescencia en neuronas hipocampales tratadas durante 1 h con rWnt-5a. Al igual que en los ensayos de WB, luego de 1 h de estimulación, observamos un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de ROCK2 a nivel del soma sin embargo la expresión de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) no se vio afectada (Figura 12). Se usó MAP2



**Fig. 11. Wnt-5a regula la expresión de ROCK2 mediante un mecanismo posttranscripcional en neuronas hipocampales. A.** Análisis de Western Blot de ROCK2 en neuronas hipocampales de 14 DIV tratadas con rWnt-5A (300 ng/mL) por distintos tiempos. **B.** Análisis densitometrico del WB mostrado en A. One-way ANOVA, seguido de Bonferroni's post-test. \* p<0.05. n=5. **C.** Análisis de la expresión del mRNA de ROCK2 por medio de real-time PCR en neuronas tratadas con rWnt-5a. Los resultados están normalizados a la expresión del mRNA de GAPDH. Mann–Whitney U-test. NS: no significativo. n=3.



Fig. 12. Wnt-5a regula la expresión y el *clustering* de ROCK2. A. Análisis de inmunofluorescencia de ROCK2 en neuronas hipocampales en cultivo. Panel superior. Imagen representativa de neuronas control de 14 DIV. Panel inferior. Imagen representativa de neuronas tratadas con rWnt-5a (300 ng/mL) por 1 h en 14 DIV. (ROCK2: verde, MAP2: rojo, Merge: amarillo. La barra de escala corresponde a 20  $\mu$ m). B. Magnificación de las dendritas marcadas con el cuadro amarillo en A. los *clusters* de ROCK2 se muestran en amarillo al sobre imponer una imagen binaria sobre la imagen original. (La barra de escala corresponde a 2  $\mu$ m). C. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio de ROCK2 a nivel del soma. Mann–Whitney U-test. \*p<0,05. n=4. D. Cuantificación de la densidad de *clusters* de ROCK2 (número de *clusters*/ $\mu$ m). Mann–Whitney U-test. \*\*p<0,01. n=4.

como referencia por marcar la estructura neuronal y además porque no es blanco de los miRNAs regulados por el péptido mimético de Wnt-5a. A nivel dendrítico, la señal de ROCK2 se encuentra principalmente localizada en el *shaft* y es posible distinguir algunos *clusters* (Figura 12). Luego del tratamiento con rWnt-5a, se observó un aumento significativo en el número de *clusters* de ROCK2, así como en la intensidad de la fluorescencia, lo que es consistente con un aumento en la expresión de la proteína. El área promedio de los *clusters* de ROCK2 no fue significativamente alterado.

#### 4.5. Wnt-5a regula la expresión de COX-2 en neuronas hipocampales

En la misma lógica de los experimentos realizados en células HT22, analizamos el efecto de Wnt-5a sobre la expresión de COX-2 en neuronas hipocampales, considerando que COX-2 es un blanco de miR-101b, previamente validado. Análisis de inmunofluorescencia y microscopia confocal demostraron que el tratamiento con rWnt-5a es capaz de inducir la expresión de COX-2. La localización de COX-2 en condiciones basales fue detectada principalmente en el núcleo lo que es consistente con la localización descrita previamente en neuronas corticales, donde mediante microscopia electrónica e *immunogold*, se determinó su localización a nivel de la superficie luminal de la membrana nuclear (Lee et al., 2006). Además se identifica una señal más débil a nivel citosólico (Figura 13A, panel superior). El tratamiento con rWnt-5a generó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de COX2, la cual que se distribuye por todo el compartimiento somatodendrítico (Figura 13A y B).

Para determinar si el cambio en la expresión de COX-2 es dependiente de un efecto transcripcional, evaluamos los niveles de mRNA de COX-2 en neuronas tratadas por 1 hora



Fig. 13. Wnt-5a regula la expresión de COX-2 por medio de un mecanismo posttranscripcional. A. Análisis de inmunofluorescencia de COX-2 en neuronas hipocampales en cultivo. Panel superior. Imagen representativa de neuronas control de 14 DIV. Panel inferior. Imagen representativa de neuronas tratadas con rWnt-5<sup>a</sup> (300 ng/mL) por 1 h en 14 DIV. (COX-2: azul,  $\beta$ III- tubulina: verde, Merge: celeste. La barra de escala corresponde a 20 µm). B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio de COX-2 a nivel del soma. Mann–Whitney U-test. \*\*p<0.01. n=4. C. Análisis de la expresión del mRNA de COX-2 por medio de realtime PCR en neuronas tratadas con rWnt-5a. Los resultados están normalizados a la expresión del mRNA de GAPDH. Mann–Whitney U-test. NS: no significativo. n=3.

con rWnt-5a por medio de RT-qPCR en tiempo real. El análisis no mostro cambios significativos en los niveles de mRNA de COX-2 (Figura 13C), sugiriendo que el aumento en los niveles proteicos, es dependiente de mecanismos post-transcripcionales, lo que es consistente con un aumento en la traducción mediante la disminución en la represión traduccional mediada por miR-101b.

## 4.6. Wnt-5a activa a ROCK2 en neuronas hipocampales

ROCK2 es una quinasa que genera cambios en el citoesqueleto por medio de la fosforilación de diversos sustratos. En ese sentido, decidimos evaluar si el tratamiento con rWnt-5a, además de generar un aumento en su expresión, también induce su actividad. Para este fin medimos el nivel de fosforilación de un blanco ampliamente usado para determinar la actividad de ROCK2, principalmente porque el residuo T853 de MYPT parece ser exclusivamente fosforilado por esta quinasa (Grassie et al., 2011). El tratamiento con rWnt-5a generó un aumento significativo en los niveles de fosforilación de MYPT, alcanzando su máximo nivel a los 15 min, para luego retornar a niveles basales (Figura 14) indicando que Wnt-5a es capaz de activar rápida y transientemente a ROCK2. Esta cinética de fosforilación es similar a la que Wnt-5a induce en CaMKII (Figura 14) durante la activación de la vía Wnt/Ca<sup>+2</sup>.

# 4.7.miR-101b participa en la regulación de la morfología de las espinas dendríticas inducidas por Wnt-5a

Trabajos previos de nuestro laboratorio han determinado que el tratamiento con Wnt-5a induce un aumento en la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales de 14 DIV (Varela-Nallar et al., 2010). Con el fin de determinar si la disminución de miR-101b


Fig. 14. Wnt-5A modula los niveles de fosforilación de MYPT sugiriendo un incremento en la actividad de ROCK2. A. Análisis de WB de pMYPT y pCaMKII en neuronas hipocampales de 14 DIV tratadas con rWnt-5a (300 ng/mL) en distintos tiempos. B. Análisis densitómetrico de los WB mostrados en A. Oneway ANOVA, seguido de Bonferroni's post-test. \* p<0.05 respecto al control tiempo 0, barra blanca. # p<0.05 respecto al control tiempo 0, barra negra. n=4 y 5 respectivamente.

inducida por Wnt-5a es necesaria para este efecto, realizamos experimentos de ganancia de función de miR-101b en neuronas hipocampales en cultivo. Para este fin, utilizamos Magnetofección pues ofrece una mayor eficiencia de transfección en neuronas en cultivo de más de 10 DIV y además un menor impacto en la morfología neuronal comparado con la transfección con lipofectamina. Las neuronas fueron magnetofectadas en 12 DIV y los efectos de la ganancia de función fueron evaluados 48 h después. Para identificar las neuronas que incorporaron el miRNA *mimic* o el miRNA control, co-transfectamos con un plasmidio que expresa GFP como ha sido reportado previamente (Codocedo et al., 2012; M Vargas et al., 2014).

Como se esperaba, el tratamiento por 1 h con rWnt-5a generó un aumento significativo en la densidad de las espinas dendríticas, sin afectar significativamente el largo promedio de dichos procesos (Figura 15 A y C). La ganancia de función durante 2 días de miR-101b, no género cambios significativos en la densidad de las espinas dendríticas ni el largo de las mismas, sugiriendo que el aumento en sus niveles no afecta la estructura sináptica al menos en la ventana de tiempo observada. Inesperadamente, la ganancia de función de miR-101b tampoco afecta el aumento en la densidad de las espinas dendríticas mediado por la estimulación de rWnt-5a sugiriendo que la disminución en los niveles de miR-101b, mediados por Wnt-5a no son necesarios para la inducción de nuevas espinas. Sin embargo, en neuronas con ganancia de función de miR-101b se observó un aumento significativo en el largo de las protrusiones posterior al tratamiento con rWnt-5a (Figura. 15 A y C), lo que sugiere que miR-101b participaría en el control de la morfología de las espinas y en consecuencia asociado a procesos de maduración sináptica.



Fig. 15. Wnt-5a aumenta la densidad de las espinas dendríticas y miR-101b participa en el control morfológico de las espinas inducidas. A. Imágenes representativas de las dendritas de neuronas magnetofectadas con GFP+miR control o GFP+miR-101b en 12 DIV y fijadas en 14DIV. Panel superior: sin tratamiento. Panel inferior: tratadas con rWnt-5A (300 ng/mL) por 1 h. B. Cuantificación de la densidad de espinas dendríticas (número de espinas/10µm). C. Cuantificación del largo de las espinas (µm). One-way ANOVA, seguido de Bonferroni's post-test. \* p<0,05 respecto al control. # p<0,05 respecto a miR-101b. n=4.

#### 5. Discusión

Wnt-5a es un factor sinaptogénico cuya expresión se ve aumentada durante el desarrollo y en consecuencia se ha sugerido que puede participar en procesos de mantención y función sináptica el sistema nervioso adulto (Inestrosa and Arenas, 2010). Estudios realizados en neuronas hipocampales han demostrado que Wnt-5a aumenta la densidad de las espinas dendríticas (Varela-Nallar et al., 2010), incrementa el tráfico de proteínas sinápticas (Farías et al., 2009; Cuitino et al., 2010) y modula la amplitud de la LTP en rebanadas de hipocampo (Cerpa et al., 2011; Vargas et al., 2014) en forma similar a la acción de otros factores sinaptogénicos como las neurotrofinas (Poo, 2001). Estudios recientes han determinado que los factores sinaptogénicos inducen cambios en la estructura y función sináptica por medio de la activación de diversas vías de señalización, incluyendo cambios en la expresión o actividad de varios miRNAs los que a su vez contribuyen a la mantención y consolidación de los cambios sinápticos (Chiu et al., 2014). Por ejemplo, en el caso de BDNF, el incremento en el volumen de las espinas dendríticas de neuronas hipocampales de rata son dependientes de la activación de la vía TrkB/mTOR, la cual por medio de un mecanismo aun no descrito regula la expresión de miR-134. Este miRNA regula a su vez la traducción de LIMK1 (LIM domain kinase 1) (Schratt et al., 2006), un importante mediador de la dinámica del citoesqueleto de actina.

En este trabajo, nosotros evaluamos la hipótesis que apunta a que el tratamiento con Wnt-5a genera cambios en los miRNAs neuronales y que esta modulación contribuye a los efectos post-sinápticos de este ligando. Para este fin utilizamos cultivos primarios de neuronas hipocampales con un muy bajo contenido glial, pues una serie de reportes previos señalan que frente a un mismo estímulo, algunos miRNAs responden en forma distinta en neuronas y glía (Ziu et al., 2011; Jovičić et al., 2013). Los cultivos neuronales de 14 DIV fueron tratados con Foxy-5, un hexapéptido formilado, ampliamente utilizado para la reproducción de los efectos biológicos de Wnt-5a (Säfholm et al., 2006, 2008; Jenei et al., 2009; Romanowska et al., 2009). Del mismo modo, trabajos recientes han demostrado que Foxy-5 reproduce los efectos del ligando Wnt-5a en neuronas hipocampales, tanto en cultivo como *in vivo* (Farías et al., 2009; Cuitino et al., 2010; Varela-Nallar et al., 2012; Vargas et al., 2014).

#### 5.1.Wnt-5a regula la expresión de miRNAs en neuronas hipocampales

En nuestras condiciones experimentales, el perfil de miRNAs obtenidos es coincidente con mediciones de miRNAs previamente realizadas en el hipocampo por otros grupos de investigación. Por ejemplo, miR-9 fue detectado con un valor C<sub>t</sub> promedio de 22,64 lo cual es consistente con los reportes que señalan que miR-9 es uno de los miRNAs más abundantemente expresado en el sistema nervioso central (Coolen et al., 2013) y lo mismo es observado para el resto de los miRNAs detectados en forma abundante. En el mismo sentido, el grupo de miRNAs no detectado que representan el 8% del total analizado (Figura 3B y Anexo 3), tampoco fue detectado en neuronas hipocampales mediante secuenciación masiva (Zovoilis et al., 2011) demostrando la consistencia de la detección realizada por medio de PCR *array*.

La incubación por 1 h con el péptido mimético de Wnt-5a, generó un cambio significativo en más de 30 miRNAs. Esto significa que la activación de las distintas vías de señalización rio abajo de Wnt-5a, rápidamente controlan tanto la expresión como el decaimiento (*decay*) de una serie de miRNAs neuronales, lo cual es absolutamente consistente

con su rol en la remodelación sináptica y con la actividad de otros factores sinaptogénicos. Por ejemplo, en neuronas hipocampales de rata, el tratamiento con dopamina aumenta en una hora de tratamiento la expresión de miR-181a como parte del mecanismo de plasticidad sináptica subyacente al control motivacional inducido por dopamina (Saba et al., 2012). Otro ejemplo interesante demostró que el tratamiento con serotonina disminuye en menos de una hora los niveles de miR-124 y -184 en neuronas sensoriales de *Aplysia Califórnica*, como parte del mecanismo responsable de la transición de memoria de corta a larga duración (Rajasethupathy et al., 2009).

Efectivamente, el metabolismo de los miRNAs en el sistema nervioso es bastante más rápido que en otros sistemas o tejidos. Un estudio realizado en retina de rata demostró que el cambio en las condiciones lumínicas genera cambios importantes en la expresión de varios miRNAs de los fotoreceptores en tan solo media hora (Krol et al., 2010a). Una profundización de estos hallazgos demostró que este rápido metabolismo también es observado en neuronas hipocampales de 15 DIV tratadas con glutamato (Krol et al., 2010a). Otro grupo determinó que la vida media de miRNAs enriquecidos en el cerebro, era de 1-3.5 h (Sethi and Lukiw, 2009) lo que contrasta con la situación en células no neuronales en las cuales los miRNAs, poseen en general un recambio muy lento con vidas medias que se extienden más allá de las 24 h (Gatfield et al., 2009).

Si bien la mayoría de los miRNAs regulados tras la activación de la vía Wnt, muestra una disminución en sus niveles, tres miRNAs aumentaron significativamente su expresión sugiriendo que el metabolismo estos dos grupos de miRNAs poseen distintos elementos de respuesta a Wnt.

Con el fin de entender el rol biológico de los miRNAs regulados por Wnt-5a, utilizamos herramientas bioinformáticas que permiten predecir sus mRNAs blancos así como su posible participación en diversos procesos biológicos. Este análisis determinó un enriquecimiento en procesos biológicos asociados a cáncer (Figura 5). Esto es importante, pues Wnt-5a ha sido relacionado al desarrollo y malignidad de varios tipos de cáncer; por ejemplo, Wnt-5a se encuentra aumentado en melanoma (Dissanayake et al., 2007), cáncer colorectal (Bakker et al., 2013), de páncreas (Bo et al., 2013), de pulmón (Wright et al., 2009; Huang et al., 2010b), de riñón (Wright et al., 2009) y gliomas (Yu et al., 2007; Kamino et al., 2011). La única excepción a esta correlación es la leucemia mieloide en la cual Wnt-5a se encuentra disminuida y se ha descrito una función como supresor de tumor (Deng et al., 2011). En consecuencia, esta correlación permite validar la predicción in silico de los blancos de miRNAs regulados por Wnt-5a, pues existe una asociación directa con funciones biológicas en las cuales Wnt-5a tiene un rol preponderante. Por otro lado, el enriquecimiento de blancos en diversos procesos biológicos, también arroja algunas vías con una clara relación en procesos de plasticidad sináptica, como MAP quinasas, adhesión focal, la vía mTor, guía axonal, regulación del citoesqueleto de actina y la vía de señalización Wnt, lo cual es absolutamente consistente con nuestra hipótesis de trabajo.

# 5.2. miR-101b como posible efector de Wnt-5a

De los miRNAs regulados luego del tratamiento con el péptido mimético de Wnt-5a, el que más veces disminuyó su expresión fue miR-101b. Este miRNA, ha sido ampliamente estudiado por su rol como supresor tumoral en varios tipos de cáncer (Strillacci et al., 2009; Hao et al., 2011; He et al., 2012). Resulta interesante constatar que así como Wnt-5a se encuentra aumentado en varios tipos de cáncer, los niveles de miR-101b se encuentran muy disminuidos. El mismo fenómeno es observable en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, en donde los niveles de miR-101b se encuentran reducidos (Hébert et al., 2008; Nunez-Iglesias et al., 2010; Wang et al., 2011), pero los de Wnt-5a aumentados (Li et al., 2011). Esta reducción observada en Alzheimer, ha sido vinculada al aumento en los niveles de APP (*Amyloid precursor protein*) el cual ha sido validado experimentalmente como un blanco de miR-101b (Vilardo et al., 2010; Long and Lahiri, 2011; Barbato et al., 2014). Otros blancos validados de miR-101b, vinculados a patologías del SNC son ataxina 1 (Lee et al., 2008) y la proteína FMR1 (*Fragile X Mental Retardation gene 1*) (Zongaro et al., 2013) lo que sugiere que el control de su expresión es importante para la mantención de la homeostasis neuronal.

Por otro lado, miR-101b también tiene el potencial de participar en la modulación de procesos sinápticos, pues un estudio previo realizado por el grupo de Kosik, determinó que miR-101b es un miRNA enriquecido en el hipocampo de rata y que se encontraba en cantidades similares tanto en el soma como en las neuritas (Kye et al., 2007). Estudios posteriores usando sinaptosomas demostraron que miR-101b se encuentra presente en la región post-sináptica (Zongaro et al., 2013).

Por estas razones estudiamos si la disminución en los niveles de miR-101b y en consecuencia la modulación de sus posibles blancos, son parte del mecanismo por el cual Wnt-5a es capaz de modular la región post-sináptica.

# 5.3. ROCK2 es un blanco de miR-101b

La mejor forma de comprender la función de un miRNA es identificar los blancos que regula. Esta identificación es compleja, pues las herramientas de predicción computacionales, generan listas enormes. Sin embargo, dentro de estas listas existen predicciones de mayor y menor probabilidad, las cuales en el caso del software TargerScan son dependientes de un gran número de factores que incluyen desde la estabilidad termodinámica de la interacción miRNA-mRNA hasta su conservación en mamíferos. De este modo, es posible descartar un gran número de posibles blancos, no obstante las listas siguen siendo de un tamaño considerable. En consecuencia, es necesario establecer algunos criterios que permitan una elección práctica y funcional a la hipótesis planteada. El primer criterio implica estudiar blancos que no hayan sido previamente validados. Esto tiene que ver con realizar un aporte novedoso y no simplemente una verificación de lo planteado previamente en la literatura. En ese sentido, descartamos a ataxina1, APP, FMR1 y al factor de transcripción EZH2 (Histonelysine N-methyltransferase) (Smits et al., 2010) pues una serie de trabajos ha demostrado experimentalmente que son un blanco de miR-101b. Sin perjuicio de lo anterior, verificar el efecto de la modulación de miR-101b sobre un blanco previamente descrito, ofrece la oportunidad de usarlo como control positivo y por este motivo realizamos mediciones de COX-2 el cual ha sido descrito como blanco de miR-101b en varios modelos celulares (Strillacci et al., 2009; Hao et al., 2011; He et al., 2012) incluido el de neuronas hipocampales (Vilardo et al., 2010). Finalmente, decidimos evaluar un blanco de miR-101b con el potencial de regular procesos de plasticidad sináptica, la cual como es conocido es altamente dependiente de la dinámica del citoesqueleto de actina.

ROCK2 posee un sitio de unión a miR-101b altamente conservado y además participa en prácticamente todos los procesos biológicos relevantes a procesos de plasticidad sináptica (Anexo 4A). Su vinculación a dichos procesos biológicos tiene que ver con el gran número de sustratos descritos en diversos sistemas, muchos de los cuales participan en el control del citoesqueleto de actina y en consecuencia de la morfología celular (Anexo 4B).

Las proteínas ROCK son una familia de serina/treonina quinasas de ~160 KDa. Se han descritos dos isoformas: ROCK1 (también conocida como ROK $\beta$  o p160ROCK) y ROCK2 (también conocida como ROK $\alpha$  o Rho quinasa) las cuales poseen un 65% de identidad en su secuencia aminoacídica y un 92% de identidad en sus dominios quinasa (Schofield and Bernard, 2013). Por este motivo, pocos estudios han demostrado roles distintivos para cada isoforma, sin embargo su expresión diferencial entre distintos tejidos indica que pueden participar en distintos procesos biológicos. Ambas isoformas poseen el mismo sitio de unión a miR-101b, sugiriendo que este miRNA podría regular tanto a ROCK1 como a ROCK2, sin embargo, estudios previos mediante análisis de *Northern* y *Western Blot* han demostrado que la expresión de ROCK1 es especialmente abundante en testículos, hígado y pulmón mientras que la de ROCK2 es abundante en músculo y cerebro (Riento and Ridley, 2003). Consistente con estas observaciones, no fue posible detectar a ROCK1 en lisados de neuronas hipocampales en cultivo mediante WB, por lo que decidimos validar la posible represión traduccional de miR-101b solo sobre ROCK2.

El método más directo para la verificación de la función de un miRNA en particular, consiste en la transfección de células con miRNA miméticos o miRNA competitivos, para luego evaluar cuantitativamente los niveles de la proteína blanco (Witkos et al., 2011; Gäken et al., 2012). Los miRNA miméticos, imitan la actividad de los miRNAs endógenos y pueden ser usados como dúplex tipo siRNA o vectores codificantes (Olejniczak et al., 2010). Para validar la represión traduccional de ROCK2, se utilizó un miRNA mimético que corresponde a un RNA pequeño doble hebra, pues la evidencia experimental ha demostrado que las cantidades de miRNA maduro generado a partir de estas especies son muy superiores a las generadas por vectores de expresión (Riley et al., 2012). En células HT22 la transfección con miR-101b mimético, generó una disminución en los niveles endógenos de ROCK2 en forma dosis dependiente, validando la predicción *in silico* y demostrando que miR-101b es capaz de controlar la expresión de ROCK2. Este fenómeno también fue observado para la proteína COX-2, demostrando la efectividad del miRNA mimético utilizado.

# 5.4. Wnt-5a modula la expresión y actividad de ROCK2 en neuronas hipocampales en cultivo

El efecto esperado de una disminución en los niveles de un miRNA en particular, es el aumento en los niveles proteicos de sus blancos. Considerando que Wnt-5a genera una disminución en los niveles de miR-101b, evaluamos el efecto de Wnt-5a sobre la expresión de ROCK2. Como esperábamos, se observó un aumento significativo en sus niveles de expresión. Este aumento fue evidente luego de una hora de estimulación con el ligando. Mediante análisis de inmunofluorescencia, además observamos que el aumento en los niveles de expresión ocurre tanto en el soma como en las dendritas. En el caso de ROCK2, se observa un aumento en el *clustering* dendrítico, lo que es consistente con un aumento detectado por WB, pero también podría reflejar un efecto a nivel del tráfico de la proteína, que pudiese translocar desde un *pool* citosólico hasta sitios discretos de señalización en la membrana celular. Esto es

consistente con reportes previos que indican que ROCK2 transloca a la membrana en células transfectadas con una forma constitutivamente activa de RhoA (Leung et al., 1995; Matsui et al., 1996) o cuando las células son tratadas con factores que activan RhoA (Sin et al., 1998; Royal et al., 2000).

Para evaluar si ROCK2 es parte del mecanismo de señalización de Wnt-5a en neuronas hipocampales de 14 DIV, medimos su nivel de activación mediante la fosforilación de una de sus proteínas blanco MYPT1. Como se observa en la figura 14, el tratamiento con Wnt-5a generó un aumento rápido y transitorio en el nivel de fosforilación de MYPT1 sugiriendo que Wnt-5a es capaz de activar a ROCK2. Como mencionamos previamente Wnt-5a señaliza principalmente mediante dos vías independientes de  $\beta$ -catenina, la vía PCP y la vías Wnt/Ca<sup>+2</sup>. Una de las ramas de la vía PCP involucra la activación de RhoA/ROCK, por medio de una proteína asociada a Dishevelled, Daam1 (Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1) la cual ha sido localizada en las sinapsis de neuronas hipocampales de 21 DIV (Salomon et al., 2008). A pesar de estas evidencias, no existen reportes previos que demuestren que Wnt-5a señalice por medio de ROCK2 en neuronas hipocampales adultas, en las cuales solo se ha explorado la rama que involucra a Rac/JNK (Farías et al., 2009). Interesantemente, la cinética de activación de ROCK2 observada, es similar a la que Wnt-5a induce en CaMKII (Figura. 14). Estudios recientes en espinas dendríticas de neuronas hipocampales, han demostrado que la activación de la vía RhoA/ROCK es dependiente de CaMKII, tras la estimulación con glutamato y la activación de receptores NMDA (Murakoshi et al., 2011). En consecuencia, Wnt-5a podría activar a ROCK2 por uno o más mecanismos y por lo tanto se requieren experimentos adicionales para poder determinar la naturaleza de esta activación en neuronas hipocampales en cultivo.

En la literatura existe una serie de trabajos que apuntan a que la actividad de ROCK2 estaría asociada a la pérdida de espinas dendríticas observada en una serie de patologías del sistema nervioso (Huang et al., 2008; Pozueta et al., 2013). Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que en condiciones normales, ROCK2 participa en la inducción y mantención de la plasticidad de espinas dendríticas asociado a la señalización mediada por glutamato y el incremento de calcio intracelular (Rex et al., 2009; Murakoshi et al., 2011). Estos aparentes roles opuestos de ROCK2 en la dinámica de las espinas dendríticas, pueden estar relacionados a modificaciones de ROCK2 reportados en varias modelos patológicos (Sebbagh et al., 2005; Sapet et al., 2006), incluido el Alzheimer (Pozueta et al., 2013) en donde el tratamiento con el péptido β-amiloide induce la pérdida de espinas por medio de la activación de capasa-2 y la generación de una forma constitutivamente activa de ROCK2 de ~130 KDa. La sobreactivación de ROCK2 podría generar un desbalance en la regulación del citoesqueleto de actina y explicar el colapso de las espinas dendríticas. Por otro lado, la activación de ROCK2 en condiciones homeostáticas puede regular el crecimiento y estabilidad de las espinas dendríticas, por medio de la activación de LIMK1 la cual a su vez fosforila e inhibe al factor depolimerizador de actina, cofilina (Rex et al., 2009; Schofield and Bernard, 2013). Como ya mencionamos, en nuestras condiciones experimentales, ROCK2 es activado en forma rápida y transitoria, lo cual es incompatible con la generación de una forma constitutivamente activa y en consecuencia, la actividad de ROCK2 mediada por Wnt-5a podría formar parte del mecanismo por el cual Wnt-5a regula el aumento en la densidad de las espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo.

#### 5.5. Wnt-5a aumenta la expresión de COX-2 en neuronas hipocampales en cultivo

COX-2, también conocida como Prostaglandina-Endoperóxido Sintasa 2 (PTGS2), es una enzima involucrada en la conversión del ácido araquidónico a prostanoides y su actividad ha sido normalmente asociada a procesos de injuria e inflamación. En el cerebro, COX-2 es expresado en poblaciones discretas de neuronas encontrándose enriquecido en la corteza e hipocampo (Yamagata et al., 1993).

Considerando el efecto de miR-101b sobre la expresión de COX-2, decidimos evaluar si Wnt-5a es capaz de regular su expresión en neuronas hipocampales en cultivo. Como esperábamos, el tratamiento por 1 h con rWnt-5a, genero un aumento significativo en los niveles de COX-2. Este aumento fue evidente a nivel somático así como en las dendritas y puede estar relacionado a un posible efecto pro-inflamatorio propuesto para Wnt-5a en microglia (Halleskog et al., 2012). Sin embargo, estudios recientes demuestran un posible rol de COX-2 relacionado a procesos de plasticidad sináptica (Chen et al., 2013), de modo que su regulación podría formar parte del mecanismo por el cual Wnt-5a regula la estructura postsináptica. Interesantemente, el aumento en los niveles proteicos de COX-2, no fue observado a nivel de su RNA mensajero, lo que sugiere que el mecanismo por el cual Wnt-5a regula su expresión es a nivel post-transcripcional, lo cual es compatible con el rol de miR-101b.

# 5.6. La disminución de miR-101b no es necesaria para el aumento en la densidad de las espinas dendríticas inducida por Wnt-5a, pero si para su desarrollo morfológico

Como señalamos previamente, la regulación de la estructura y función sináptica es fundamental para los procesos adaptativos como la memoria y el aprendizaje. La espina dendrítica constituye un sustrato estructural que da cuenta de la actividad sináptica, sobre todo en el hipocampo donde la proporción de sinapsis excitatorias y espinas dendríticas es prácticamente 1 a 1 (Nimchinsky et al., 2004). De este modo, mediciones de la densidad de espinas dendríticas provee un estimado adecuado de la actividad sináptica en este grupo de neuronas.

Es por ello, que resulta muy importante entender los mecanismos por los cuales una serie de factores sinaptogénicos, entre ellos Wnt-5a, son capaces de regular el número de espinas dendríticas y en consecuencia de la actividad sináptica. Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que tratamiento con rWnt-5a son capaces de aumentar la densidad de las espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo, luego de una hora de estímulo (Varela-Nallar et al., 2010). Sin embargo, un trabajo más reciente demostró que en cultivos organotípicos obtenidos a partir de rebanadas de hipocampo de rata, el tratamiento con Wnt-5a obtenido de medios condicionados, no aumentó la densidad de las espinas dendríticas, a pesar de que se observa un aumento en la transmisión sináptica (Cerpa et al., 2011). Nuestros resultados, que replican las condiciones experimentales usadas por Varela, confirman sus observaciones, pues el tratamiento con rWnt-5a elevó el número de espinas dendríticas en neuronas hipocampales en cultivo de 14 DIV. La diferencia con el trabajo realizado por Cerpa puede deberse a la influencia del contenido glial presente en rebanadas comparado con los cultivos que poseen un muy bajo contenido glial. Por otro lado, el uso de medios condicionados ofrecen una serie de interrogantes que incluyen la concentración efectiva de ligando empleada y la presencia de una serie de factores secretados no identificados, que pueden influir en el fenotipo final.

Considerando que en el mismo período de incubación, se observó una disminución importante en los niveles de miR-101b, evaluamos si está modulación es necesaria para la inducir el aumento en la densidad de las espinas dendríticas. La ganancia de función de miR-101b, no afecto el número de las espinas dendríticas, 48 h posteriores a la transfección. Esto sugiere que el aumento de miR-101b, no es suficiente para modular la dinámica de las espinas dendríticas en condiciones basales. También sugiere que la disminución observada en los niveles de ROCK2, como consecuencia de la ganancia de función de miR-101b, tampoco influye en la dinámica de las espinas dendríticas. Esto es consistente con reportes previos que muestran que en condiciones basales la inhibición farmacológica de ROCK2 no afecta la dinámica de las espinas dendríticas en neuronas hipocampales en cultivo (Rex et al., 2009; Pozueta et al., 2013). De hecho, un trabajo reciente, en el que utilizan sensores FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), demuestra que en condiciones basales no existe correlación entre la actividad de RhoA (activador rio arriba de ROCK2) y el volumen de la espina dendrítica (Murakoshi et al., 2011) avalando la idea de que en condiciones basales la inhibición de ROCK2 no afecta la dinámica de las espinas dendríticas de neuronas adultas.

Por otro lado, en neuronas transfectadas con miR-101b, el tratamiento con rWnt-5a generó un aumento similar en la densidad de espinas dendríticas al observado en neuronas control. Sin embargo, la longitud de las espinas observadas en esta condición (miR-101b+Wnt-5a) fue significativamente mayor al de neuronas control tratadas con Wnt-5a. Lo anterior sugiere que si bien la disminución de miR-101b no parece ser necesaria para la inducción de nuevas espinas, su disminución y en consecuencia el aumento de sus blancos podría estar involucrado en el control morfológico de dichas espinas. Varios estudios han demostrado que existe una gran correlación entre la morfología de las espinas y la fuerza de la

transmisión sináptica. Por ejemplo, se ha determinado una correlación directa entre el número de receptores AMPA y la proporción de espinas tipo *mushroom* (Matsuzaki et al., 2001). No obstante, las dimensiones que definen la identidad de la espina se encuentran por debajo de la resolución de los sistemas ópticos convencionales, la cual está limitada por el fenómeno de difracción (Nägerl et al., 2008). En la práctica, la resolución lateral de un sistema confocal como el utilizado en este trabajo es <200 nm (Nägerl et al., 2008) lo cual es insuficiente para obtener imágenes de detalles finos como el ancho del cuello de las espinas que varía entre 40 a 500 nm en las neuronas piramidales del CA1 (Harris and Kater, 1994). Por esta razón, las imágenes adquiridas con este sistema, no permiten una adecuada clasificación de los tipos de espinas pues dicha clasificación depende de la razón entre el ancho de la cabeza y el ancho del cuello de las espina. Por otro lado, el largo de las espinas varía de 0,5 a 2  $\mu$ m, según se ha determinado por microscopia electrónica (Hering and Sheng, 2001). En consecuencia, el largo, como parámetro morfológico puede ser claramente evaluado por microscopia de fluorescencia confocal.

El análisis del largo de las espinas, es muy útil para estimar el estado de madurez de las sinapsis. En general, las espinas tipo *stubby*, que corresponden al tipo más inmaduro, tienen un tamaño inferior a 1  $\mu$ m. Las espinas tipo *thin* y *mushroom* tienen un largo máximo de 2  $\mu$ m; finalmente, las estructuras tipo filopodio poseen largos mucho mayores a 2  $\mu$ m y pueden ser claramente distinguidas de los otros tipos de espinas. Como se observa en la Figura 14 el largo promedio de las espinas en 14 DIV corresponde a 1,31±0.08  $\mu$ m, lo cual es consistente con el largo esperado para un estadio maduro que favorece una mayor proporción de espinas tipo *thin* o *mushroom*. La ganancia de función de miR-101b o el tratamiento de Wnt-5a no generaron cambios significativos en el largo promedio de las espinas, sin embargo debido a las

limitaciones en la resolución no podemos descartar que dichas manipulaciones afecten procesos de maduración asociados al ancho de las espinas que pudiese reflejar una mayor o menor proporción de espinas *mushroom* y en consecuencia una menor o mayor transmisión sináptica. Interesantemente, en neuronas con ganancia de función de miR-101b, el tratamiento con Wnt-5a, si generó un aumento significativo en el largo promedio de las espinas, de modo que aumentaron las estructuras tipo filopodio. Esto sugiere que la disminución de miR-101b y en consecuencia la modulación de sus blancos, sería necesaria para el control de la morfología y en consecuencia de la maduración de las espinas inducidas por Wnt-5a.

En base a los resultados obtenidos, nosotros proponemos un modelo en el cual Wnt-5a activa a ROCK2, el cual podría participar en la modulación de las espinas dendríticas por medio de su rol en la regulación del citoesqueleto de actina. Adicionalmente, Wnt-5a regularía la expresión de una serie de miRNAs, entre ellos miR-101b, los cuales contribuirían al fenotipo final por medio de la regulación de la expresión de sus mRNAs blancos, como COX-2 y ROCK2 entre otros (Figura 16).



Fig. 16. Modelo hipotético de la acción de Wnt-5a en la región post-sináptica. Wnt-5a induce la activación de vías Wnt no canónicas como PCP y Wnt-Ca<sup>+2</sup> por medio de la interacción con receptores *Frizzled* en el compartimiento post-sináptico (Inestrosa and Arenas, 2010). Esta interacción permitiría la activación de ROCK2 en forma rápida y transitoria por medio de un mecanismo desconocido. La activación de ROCK2, puede contribuir en la dinámica de las espinas dendríticas por medio de su ampliamente descrito rol sobre el citoesqueleto de actina. Por otro lado, Wnt-5a regula la expresión de varios miRNAs, como miR-101b el cual controla la expresión de proteínas como ROCK2 y COX-2. La pérdida de regulación de la expresión de estas y otras proteínas reguladas por miR-101b podría dar cuenta de cambios en la morfología de las espinas dendríticas, observadas en neuronas con ganancia de función de miR-101b.

# 6. <u>Conclusiones</u>

Nuestros resultados muestran que:

- La activación de las vías de señalización mediada por Wnt-5a, induce cambios en la expresión de un grupo de miRNAs en neuronas hipocampales en cultivo.
- El análisis bio-informático, sugiere que los miRNAs regulados por Wnt-5a, en su conjunto, forman parte del mecanismo por el cual Wnt-5a regula varios procesos biológicos y patológicos.
- ROCK2 y COX-2 son blancos de miR-101b, el miRNA más afectado por la activación de las vías de señalización dependientes de Wnt-5a.
- 4. Wnt-5a aumenta los niveles de fosforilación del residuo T853 de MYPT, el cual corresponde a un sustrato específico de ROCK2. Esto sugiere, que Wnt-5a, es capaz de inducir la actividad de ROCK2 en forma rápida y transitoria. Tratamientos más prolongados, generan un aumento en la expresión de ROCK2 y COX-2, lo que es consistente con la disminución de su inhibidor, miR-101b.
- 5. La disminución de miR-101b no es necesaria para el aumento en la densidad de las espinas dendríticas inducido por Wnt-5a, sin embargo podría cumplir un rol en el control de la morfología de las espinas inducidas por Wnt-5a.

Por lo tanto nosotros concluimos que:

El ligando Wnt-5a, modula la expresión de miRNAs en neuronas hipocampales y que dicha regulación es parte del mecanismo por el cual Wnt-5a, modula la región postsináptica.

# 77

# 7. ANEXOS

# Anexo 1:

	ng/uL	260/280	Contraction of the second seco		ng/uL	260/280
Foxy5	8,4	1,86		Foxy5	40,7	2,04
Foxy5	12,4	1,89	PRI I	Foxy5	40,5	1,9
Foxy5	13,2	1,77		Foxy5	32	2,1
Control	13,6	1,74		Control	50,8	1,95
Control	14,3	1,61		Control	48,1	1,78
Control	11.3	1.73	0	Control	58.5	1.82

**Concentración de muestras de RNAs pequeños por liofilización.** Concentraciones obtenidas por espectrofotometría luego del enriquecimiento y liofilización. Se muestra la razón 260/280.

# Anexo 2:

Α

1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	miR-142-5p	miR-16	miR-142-3p	miR-21	miR-29b	let-7a	miR-126	miR-143	let-7b	miR-27a	let-7f	miR-9
	miR-26a	miR-24	miR-30e	miR-181a	miR-29a	miR-124	miR-144	miR-30d	miR-19b	miR-22	miR-122	miR-150
	miR-32	miR-140	miR-125b-5p	miR-141	miR-92a	miR-322	miR-191	miR-17-5p	miR-130a	miR-20a	miR-27b	miR-26b
ł	miR-146a	miR-200c	miR-99a	miR-19a	miR-23a	miR-30a	let-7i	miR-93	let-7c	miR-106b	miR-101a	miR-425
	miR-15b	miR-28	miR-18a	miR-25	miR-23b	miR-186	miR-29c	miR-7a	let-7d	miR-30c	miR-181b	miR-223
	miR-320	miR-374	let-7e	miR-151	miR-196b	miR-140*	miR-100	miR-103	miR-96	miR-194	miR-125a-5p	miR-423
	miR-376c	miR-195	miR-222	miR-28*	miR-128	miR-185	miR-30b-5p	miR-210	miR-375	miR-182	miR-196a	miR-10a-5p
1	miR-324-5p	miR-137	miR-378	miR-342-3p	Rnu6	U87	4.5S-V1	Y1	miRTC	miRTC	PPC	PPC





**Curva de disociación de los productos de PCR array. A.** Arreglo de miRNAs evaluados en la placa #1 del kit. **B.** Curva de disociación de los productos de PCR de los miRNAs descritos en A muestra *peaks* únicos a temperaturas superiores a 70°C de acuerdo a las sugerencias del proveedor.

# Anexo 3:

miRNA name	Real time PCR (ct)	Sequencing* (count)
miR-125b-5p	19,6	543006
miR-128	22,23	21861
miR-125a-5p	22,48	683348
miR-9	22,64	2298920
let-7c	23,09	1306836
let-7b	23,86	465603
miR-191	24,21	67191
miR-218	24,99	86764
let-7e	25	47947
let-7d	25,18	17218
	CF SYSTEM DE	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1

B

Α

miRNA name	Real time PCR (ct)	Sequencing <sup>*</sup> (count)
miR-133b	>35	17
miR-21*	>35	12
miR-147	>35	9
miR-196b	>35	7
miR-202	>35	5
miR-208	>35	5
miR-743b	>35	1
miR-875	>35	0
miR-742	>35	0
miR-568	>35	0

**Comparación de valores Ct obtenidos en este estudio versus valores de secuenciación en el hipocampo de ratón. A.** Valores de los 10 miRNAs más abundantes detectados en este estudio. **B.** Valores de 10 miRNAs no detectados en este estudio. \*Valores publicados en

#### Anexo 4:

#### KIGG Rattus norvegicus (rat) Gene name Rock2, ROCK-II, ROK Definition Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 Pathway rno04062 Chemokine signaling pathway rno04270 Vascular smooth muscle contraction rno04310 Wnt signaling pathway rno04350 TGF-beta signaling pathway rno04360 Axon guidance rno04510 Focal adhesion Leukocyte transendothelial migration rno04670 rno04810 Regulation of actin cytoskeleton rno05132 Salmonella infection

В

Α



**Procesos biológicos regulados por ROCK2. A.** Participación de ROCK2 en procesos biológicos de acuerdo a KEGG *pathways*. Flechas azules indican los procesos biológicos que coinciden con los procesos regulados por los miRNAs regulados por Foxy-5 descritos en la Fig. 5. **B.** Sustratos de ROCK2 y su rol en procesos asociados a la regulación del citoesqueleto de actina.

# 8. BIBLIOGRAFIA.

- Alvarez AR, Godoy JA, Mullendorff K, Olivares GH, Bronfman M, Inestrosa NC (2004) Wnt-3a overcomes beta-amyloid toxicity in rat hippocampal neurons. Exp Cell Res 297:186– 196.
- Alvarez VA, Sabatini BL (2007) Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. Annu Rev Neurosci 30:79–97.
- Anastas JN, Moon RT (2013) WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. Nat Rev Cancer 13:11–26.
- Angers S, Moon RT (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 10:468–477.
- Bakker ERM, Das AM, Helvensteijn W, Franken PF, Swagemakers S, van der Valk MA, Ten Hagen TLM, Kuipers EJ, van Veelen W, Smits R (2013) Wnt5a promotes human colon cancer cell migration and invasion but does not augment intestinal tumorigenesis in Apc1638N mice. Carcinogenesis 34:2629–2638.
- Banerjee S, Neveu P, Kosik KS (2009) A coordinated local translational control point at the synapse involving relief from silencing and MOV10 degradation. Neuron 64:871–884.
- Barbato C, Pezzola S, Caggiano C, Antonelli M, Frisone P, Ciotti MT, Ruberti F (2014) A lentiviral sponge for miR-101 regulates RanBP9 expression and amyloid precursor protein metabolism in hippocampal neurons. Front Cell Neurosci 8:37.
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136:215–233.
- Bo H, Zhang S, Gao L, Chen Y, Zhang J, Chang X, Zhu M (2013) Upregulation of Wnt5a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells. BMC Cancer 13:496.
- Budnik V, Salinas PC (2011) Wnt signaling during synaptic development and plasticity. Curr Opin Neurobiol 21:151–159.
- Cerpa W, Gambrill A, Inestrosa NC, Barria A (2011) Regulation of NMDA-receptor synaptic transmission by Wnt signaling. J Neurosci 31:9466–9471.
- Cerpa W, Godoy JA, Alfaro I, Farías GG, Metcalfe MJ, Fuentealba R, Bonansco C, Inestrosa NC (2008) Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons. J Biol Chem 283:5918–5927.

- Chacón MA, Varela-Nallar L, Inestrosa NC (2008) Frizzled-1 is involved in the neuroprotective effect of Wnt3a against Abeta oligomers. J Cell Physiol 217:215–227.
- Chen R, Zhang J, Fan N, Teng Z-Q, Wu Y, Yang H, Tang Y-P, Sun H, Song Y, Chen C (2013) Δ9-THC-caused synaptic and memory impairments are mediated through COX-2 signaling. Cell 155:1154–1165.
- Chen Y, Sabatini BL (2012) Signaling in dendritic spines and spine microdomains. Curr Opin Neurobiol 22:389–396.
- Chhunchha B, Fatma N, Kubo E, Rai P, Singh SP, Singh DP (2013) Curcumin abates hypoxiainduced oxidative stress based-ER stress-mediated cell death in mouse hippocampal cells (HT22) by controlling Prdx6 and NF-κB regulation. Am J Physiol Cell Physiol 304:C636–55.
- Chiu H, Alqadah A, Chang C (2014) The role of microRNAs in regulating neuronal connectivity. Front Cell Neurosci 7:283.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. Neuropsychopharmacology 33:18–41.
- Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/β-catenin signaling and disease. Cell 149:1192–1205.
- Codocedo JF, Allard C, Godoy JA, Varela-Nallar L, Inestrosa NC (2012) SIRT1 Regulates Dendritic Development in Hippocampal Neurons. PLoS One 7:e47073.
- Codocedo JF, Rios J, Godoy JA, Inestrosa NC (2014) Are microRNAs the Molecular Link between Metabolic Syndrome and Alzheimer 's Are microRNAs the Molecular Link between Metabolic Syndrome and. J Nutr , Heal Aging.
- Colgan L a, Yasuda R (2014) Plasticity of dendritic spines: subcompartmentalization of signaling. Annu Rev Physiol 76:365–385.
- Coolen M, Katz S, Bally-Cuif L (2013) miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. Front Cell Neurosci 7:220.
- Cuitino L, Godoy JA, Farías GG, Couve A, Bonansco C, Fuenzalida M, Inestrosa NC (2010) Wnt-5a modulates recycling of functional GABAA receptors on hippocampal neurons. J Neurosci 30:8411–8420.
- Davis TH, Cuellar TL, Koch SM, Barker AJ, Harfe BD, McManus MT, Ullian EM (2008) Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. J Neurosci 28:4322–4330.

- De A (2011) Wnt/Ca2+ signaling pathway: a brief overview. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 43:745–756.
- Delay C, Mandemakers W, Hébert SS (2012) MicroRNAs in Alzheimer's disease. Neurobiol Dis 46:285–290.
- Deng G, Li ZQ, Zhao C, Yuan Y, Niu CC, Pan J, Si WK (2011) WNT5A expression is regulated by the status of its promoter methylation in leukaemia and can inhibit leukemic cell malignant proliferation. Oncol Rep 25:367–376.
- Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RH a, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature 432:231–235.
- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM (2014) MicroRNAs in Cancer. Annu Rev Pathol Mech Dis 9:287–314.
- Dimmeler S, Nicotera P (2013) MicroRNAs in age-related diseases. EMBO Mol Med 5:180–190.
- Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD, Shah K V, Hewitt KJ, Rosenthal DT, Indig FE, Jiang Y, Nickoloff BJ, Taub DD, Trent JM, Moon RT, Bittner M, Weeraratna AT (2007) The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. J Biol Chem 282:17259–17271.
- Farías GG, Alfaro IE, Cerpa W, Grabowski CP, Godoy JA, Bonansco C, Inestrosa NC (2009) Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons. J Biol Chem 284:15857–15866.
- Farías GG, Vallés AS, Colombres M, Godoy JA, Toledo EM, Lukas RJ, Barrantes FJ, Inestrosa NC (2007) Wnt-7a induces presynaptic colocalization of alpha 7-nicotinic acetylcholine receptors and adenomatous polyposis coli in hippocampal neurons. J Neurosci 27:5313–5325.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet 9:102–114.
- Fiore R, Khudayberdiev S, Christensen M, Siegel G, Flavell SW, Kim T-K, Greenberg ME, Schratt G (2009) Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. EMBO J 28:697–710.
- Flavell SW, Greenberg ME (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. Annu Rev Neurosci 31:563–590.

- Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res 19:92–105.
- Gäken J, Mohamedali AM, Jiang J, Malik F, Stangl D, Smith AE, Chronis C, Kulasekararaj AG, Thomas NSB, Farzaneh F, Tavassoli M, Mufti GJ (2012) A functional assay for microRNA target identification and validation. Nucleic Acids Res 40:e75.
- Gao X, Qiao Y, Han D, Zhang Y, Ma N (2012) Enemy or partner: relationship between intronic micrornas and their host genes. IUBMB Life 64:835–840.
- Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP (2011) Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs. Nat Struct Mol Biol 18:1139–1146.
- Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, Ruskeepää A-L, Oresic M, Esau CC, Zdobnov EM, Schibler U (2009) Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. Genes Dev 23:1313–1326.
- Gogolla N, Galimberti I, Deguchi Y, Caroni P (2009) Wnt signaling mediates experiencerelated regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. Neuron 62:510–525.
- Govek E-E, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. Genes Dev 19:1–49.
- Grassie ME, Moffat LD, Walsh MP, MacDonald JA (2011) The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1δ. Arch Biochem Biophys 510:147–159.
- Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. Nature 432:235–240.
- Habas R, Dawid IB, He X (2003) Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. Genes Dev 17:295–309.
- Hall AC, Lucas FR, Salinas PC (2000) Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. Cell 100:525–535.
- Halleskog C, Dijksterhuis JP, Kilander MBC, Becerril-Ortega J, Villaescusa JC, Lindgren E, Arenas E, Schulte G (2012) Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation. J Neuroinflammation 9:111.

- Hamzeiy H, Allmer J, Yousef M (2014) Computational Methods for MicroRNA Target Prediction. Yousef M, Allmer J, eds. Methods Mol Biol 1107:207–221.
- Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, Sohn SY, Cho Y, Zhang B-T, Kim VN (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell 125:887–901.
- Hao Y, Gu X, Zhao Y, Greene S, Sha W, Smoot DT, Califano J, Wu T-C, Pang X (2011) Enforced expression of miR-101 inhibits prostate cancer cell growth by modulating the COX-2 pathway in vivo. Cancer Prev Res (Phila) 4:1073–1083.
- Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. Annu Rev Neurosci 17:341–371.
- Havens M a, Reich A a, Duelli DM, Hastings ML (2012) Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. Nucleic Acids Res:1–15.
- He X-P, Shao Y, Li X-L, Xu W, Chen G-S, Sun H-H, Xu H-C, Xu X, Tang D, Zheng X-F, Xue Y-P, Huang G-C, Sun W-H (2012) Downregulation of miR-101 in gastric cancer correlates with cyclooxygenase-2 overexpression and tumor growth. FEBS J 279:4201– 4212.
- Hébert SS, Horré K, Nicolaï L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahtaroglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B (2008) Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. Proc Natl Acad Sci USA 105:6415–6420.
- Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. Nat Rev Neurosci 2:880–888.
- Huang K, Zhang J-X, Han L, You Y-P, Jiang T, Pu P-Y, Kang C-S (2010a) MicroRNA roles in beta-catenin pathway. Mol Cancer 9:252.
- Huang L, He Z, Guo L, Wang H (2008) Improvement of cognitive deficit and neuronal damage in rats with chronic cerebral ischemia via relative long-term inhibition of rhokinase. Cell Mol Neurobiol 28:757–768.
- Huang Y, Liu G, Zhang B, Xu G, Xiong W, Yang H (2010b) Wnt-5a regulates proliferation in lung cancer cells. Oncol Rep 23:177–181.
- Ibáñez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M (2008) Sequence relationships among C. elegans, D. melanogaster and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. PLoS One 3:e2818.

- Impey S, Davare M, Lasiek A, Fortin D, Ando H, Varlamova O, Obrietan K, Soderling TR, Goodman RH, Wayman GA (2010) An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. Mol Cell Neurosci 43:146–156.
- Inestrosa NC, Arenas E (2010) Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. Nat Rev Neurosci 11:77–86.
- Jenei V, Sherwood V, Howlin J, Linnskog R, Säfholm A, Axelsson L, Andersson T (2009) A t-butyloxycarbonyl-modified Wnt5a-derived hexapeptide functions as a potent antagonist of Wnt5a-dependent melanoma cell invasion. Proc Natl Acad Sci USA 106:19473– 19478.
- Jovičić A, Roshan R, Moisoi N, Pradervand S, Moser R, Pillai B, Luthi-Carter R (2013) Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes. J Neurosci 33:5127–5137.
- Kaech S, Banker G (2006) Culturing hippocampal neurons. Nat Protoc 1:2406–2415.
- Kamino M, Kishida M, Kibe T, Ikoma K, Iijima M, Hirano H, Tokudome M, Chen L, Koriyama C, Yamada K, Arita K, Kishida S (2011) Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2. Cancer sci 102:540–548.
- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res 28:27–30.
- Kawamata T, Tomari Y (2010) Making RISC. Trends Biochem sci 35:368–376.
- Kawamata T, Yoda M, Tomari Y (2011) Multilayer checkpoints for microRNA authenticity during RISC assembly. EMBO Rep 12:944–949.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell 115:209–216.
- Kikuchi a, Yamamoto H, Sato a, Matsumoto S (2012) Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. Acta Physiol (Oxf) 204:17–33.
- Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S (2011) New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. Int Rev Cell Mol Biol 291:21–71.
- Koleske AJ (2013) Molecular mechanisms of dendrite stability. Nat Rev Neurosci 14:536– 550.

- Konopka W, Kiryk A, Novak M, Herwerth M, Parkitna JR, Wawrzyniak M, Kowarsch A, Michaluk P, Dzwonek J, Arnsperger T, Wilczynski G, Merkenschlager M, Theis FJ, Köhr G, Kaczmarek L, Schütz G (2010) MicroRNA Loss Enhances Learning and Memory in Mice. J Neurosci 30:14835–14842.
- Krol J, Busskamp V, Markiewicz I, Stadler MB, Ribi S, Richter J, Duebel J, Bicker S, Fehling HJ, Schübeler D, Oertner TG, Schratt G, Bibel M, Roska B, Filipowicz W (2010a) Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. Cell 141:618–631.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010b) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Genet 11:597–610.
- Kulkarni VA, Firestein BL (2012) The dendritic tree and brain disorders. Mol Cell Neurosci 50:10–20.
- Kwak PB, Tomari Y (2012) The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. Nat Struc Mol Biol 19:145–151.
- Kye M-J, Liu T, Levy SF, Xu NL, Groves BB, Bonneau R, Lao K, Kosik KS (2007) Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. RNA 13:1224–1234.
- Lee J, Kosaras B, Aleyasin H, Han JA, Park DS, Ratan RR, Kowall NW, Ferrante RJ, Lee SW, Ryu H (2006) Role of cyclooxygenase-2 induction by transcription factor Sp1 and Sp3 in neuronal oxidative and DNA damage response. FASEB J 20:2375–2377.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75:843–854.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J 23:4051–4060.
- Lee Y, Samaco RC, Gatchel JR, Thaller C, Orr HT, Zoghbi HY (2008) miR-19, miR-101 and miR-130 co-regulate ATXN1 levels to potentially modulate SCA1 pathogenesis. Nat Neurosci 11:1137–1139.
- Leung T, Manser E, Tan L, Lim L (1995) A novel serine/threonine kinase binding the Rasrelated RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. J Biol Chem 270:29051–29054.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell 120:15–20.

- Li B, Zhong L, Yang X, Andersson T, Huang M, Tang S-J (2011) WNT5A signaling contributes to Aβ-induced neuroinflammation and neurotoxicity. PLoS One 6:e22920.
- Liu J, Li L, Suo WZ (2009) HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. Life Sci 84:267–271.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402–408.
- Long JM, Lahiri DK (2011) MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid-β precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. Biochem Biophys Res Commun 404:889–895.
- Lovestone S, Killick R, Di Forti M, Murray R (2007) Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. Trends Neurosci 30:142–149.
- Lugli G, Larson J, Martone ME, Jones Y, Smalheiser NR (2005) Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. J Neurochem 94:896–905.
- Lugli G, Torvik VI, Larson J, Smalheiser NR (2008) Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. J Neurochem 106:650–661.
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. Science 303:95–98.
- M Vargas L, Leal N, Estrada LD, González A, Serrano F, Araya K, Gysling K, Inestrosa NC, Pasquale EB, Alvarez AR (2014) EphA4 Activation of c-Abl Mediates Synaptic Loss and LTP Blockade Caused by Amyloid-β Oligomers. PLoS One 9:e92309.
- Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna J a (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. Science 311:195–198.
- Marchionni I, Kasap Z, Mozrzymas JW, Sieghart W, Cherubini E, Zacchi P (2009) New insights on the role of gephyrin in regulating both phasic and tonic GABAergic inhibition in rat hippocampal neurons in culture. Neuroscience 164:552–562.
- Martello G, Zacchigna L, Inui M, Montagner M, Adorno M, Mamidi A, Morsut L, Soligo S, Tran U, Dupont S, Cordenonsi M, Wessely O, Piccolo S (2007) MicroRNA control of Nodal signalling. Nature 449:183–188.
- Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. EMBO J 15:2208–2216.

- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Nat Neurosci 4:1086–1092.
- Murakoshi H, Wang H, Yasuda R (2011) Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. Nature 472:100–104.
- Nägerl UV, Willig KI, Hein B, Hell SW, Bonhoeffer T (2008) Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. Proc Natl Acad Sci U S A 105:18982–18987.
- Niehrs C (2012) The complex world of WNT receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 13:767–779.
- Niisato K, Fujikawa A, Komai S, Shintani T, Watanabe E, Sakaguchi G, Katsuura G, Manabe T, Noda M (2005) Age-dependent enhancement of hippocampal long-term potentiation and impairment of spatial learning through the Rho-associated kinase pathway in protein tyrosine phosphatase receptor type Z-deficient mice. J Neurosci 25:1081–1088.
- Nimchinsky EA, Yasuda R, Oertner TG, Svoboda K (2004) The number of glutamate receptors opened by synaptic stimulation in single hippocampal spines. J Neurosci 24:2054–2064.
- Nunez-Iglesias J, Liu C-C, Morgan TE, Finch CE, Zhou XJ (2010) Joint genome-wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation. PLoS One 5:e8898.
- Nusse R, Varmus H (2012) Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. EMBO J 31:2670–2684.
- O'Carroll D, Schaefer A (2013) General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. Neuropsychopharmacology 38:39–54.
- Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y, Tsukihara T (2009) A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. Science 326:1275–1279.
- Olejniczak M, Galka P, Krzyzosiak WJ (2010) Sequence-non-specific effects of RNA interference triggers and microRNA regulators. Nucleic Acids Res 38:1–16.
- Opazo F, Punge A, Bückers J, Hoopmann P, Kastrup L, Hell SW, Rizzoli SO (2010) Limited intermixing of synaptic vesicle components upon vesicle recycling. Traffic 11:800–812.
- Papadopoulos GL, Alexiou P, Maragkakis M, Reczko M, Hatzigeorgiou a G (2009) DIANAmirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways. Bioinformatics 25:1991–1993.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature 408:86–89.

Polakis P (2012) Wnt signaling in cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 4.

- Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. Nat Rev Neurosci 2:24–32.
- Pozueta J, Lefort R, Ribe EM, Troy CM, Arancio O, Shelanski M (2013) Caspase-2 is required for dendritic spine and behavioural alterations in J20 APP transgenic mice. Nat Commun 4:1939.
- Purro SA, Dickins EM, Salinas PC (2012) The secreted Wnt antagonist Dickkopf-1 is required for amyloid β-mediated synaptic loss. J Neurosci 32:3492–3498.
- Rajasethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, Betel D, Puthanveettil S V, Russo JJ, Sander C, Tuschl T, Kandel E (2009) Characterization of small RNAs in Aplysia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. Neuron 63:803–817.
- Rex CS, Chen LY, Sharma A, Liu J, Babayan AH, Gall CM, Lynch G (2009) Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. J Cell Biol 186:85–97.
- Riento K, Ridley AJ (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. Nat Rev Mol Cell Biol 4:446–456.
- Riley KJ, Yario T a, Steitz J a (2012) Association of Argonaute proteins and microRNAs can occur after cell lysis. RNA 18:1581–1585.
- Romanowska M, Evans A, Kellock D, Bray SE, McLean K, Donandt S, Foerster J (2009) Wnt5a exhibits layer-specific expression in adult skin, is upregulated in psoriasis, and synergizes with type 1 interferon. PLoS One 4:e5354.
- Rosso SB, Inestrosa NC (2013) WNT signaling in neuronal maturation and synaptogenesis. Front Cell Neurosci 7:103.
- Rottiers V, Näär AM (2012) MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. Nat rev Mol cell biol 13:239–250.
- Royal I, Lamarche-Vane N, Lamorte L, Kaibuchi K, Park M (2000) Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. Mol Biol Cell 11:1709–1725.

- Saba R, Störchel PH, Aksoy-Aksel A, Kepura F, Lippi G, Plant TD, Schratt G (2012) Dopamine-regulated microRNA MiR-181a controls GluA2 surface expression in hippocampal neurons. Mol Cell Biol 32:619–632.
- Säfholm A, Leandersson K, Dejmek J, Nielsen CK, Villoutreix BO, Andersson T (2006) A formylated hexapeptide ligand mimics the ability of Wnt-5a to impair migration of human breast epithelial cells. J Biol Chem 281:2740–2749.
- Säfholm A, Tuomela J, Rosenkvist J, Dejmek J, Härkönen P, Andersson T (2008) The Wnt-5a-derived hexapeptide Foxy-5 inhibits breast cancer metastasis in vivo by targeting cell motility. Clin Cancer Res 14:6556–6563.
- Salomon SN, Haber M, Murai KK, Dunn RJ (2008) Localization of the Diaphanous-related formin Daam1 to neuronal dendrites. Neurosci Lett 447:62–67.
- Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, Dignat-George F, Anfosso F (2006) Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. Blood 108:1868–1876.
- Schanen BC, Li X (2011) Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. Genomics 97:1–6.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 3:1101–1108.
- Schofield A V, Bernard O (2013) Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease. Crit Rev Biochem Mol Biol 48:301–316.
- Schratt G, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. Nature 439:283–289.
- Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E, Bréard J (2005) Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. J Exp Med 201:465–471.
- Sethi P, Lukiw WJ (2009) Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. Neurosci Lett 459:100–104.
- Shimogori T, VanSant J, Paik E, Grove EA (2004) Members of the Wnt, Fz, and Frp gene families expressed in postnatal mouse cerebral cortex. J Comp Neurol 473:496–510.
- Siegel G et al. (2009) A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. Nat Cell Biol 11:705–716.
- Siegel G, Saba R, Schratt G (2011) microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. Curr Opin Genet Dev 21:491–497.
- Simons M, Mlodzik M (2008) Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. Annu Rev Genet 42:517–540.
- Sin WC, Chen XQ, Leung T, Lim L (1998) RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. Mol Cell Biol 18:6325–6339.
- Slezak-Prochazka I, Kluiver J, de Jong D, Kortman G, Halsema N, Poppema S, Kroesen B-J, van den Berg A (2013) Cellular localization and processing of primary transcripts of exonic microRNAs. PLoS One 8:e76647.
- Smits M, Nilsson J, Mir SE, van der Stoop PM, Hulleman E, Niers JM, de Witt Hamer PC, Marquez VE, Cloos J, Krichevsky AM, Noske DP, Tannous BA, Würdinger T (2010) miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. Oncotarget 1:710–720.
- Sowers LP et al. (2013) Disruption of the non-canonical Wnt gene PRICKLE2 leads to autism-like behaviors with evidence for hippocampal synaptic dysfunction. Mol Psychiatry 18:1077–1089.
- Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, Paterini P, Piazzi G, Lazzarini G, Spisni E, Pantaleo MA, Biasco G, Tomasi V (2009) MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. Exp Cell Res 315:1439–1447.
- Varela-Nallar L, Alfaro IE, Serrano FG, Parodi J, Inestrosa NC (2010) Wingless-type family member 5A (Wnt-5a) stimulates synaptic differentiation and function of glutamatergic synapses. Proc Natl Acad Sci USA 107:21164–21169.
- Varela-Nallar L, Parodi J, Farías GG, Inestrosa NC (2012) Wnt-5a is a synaptogenic factor with neuroprotective properties against Aβ toxicity. Neurodegener Dis 10:23–26.
- Vargas JY, Fuenzalida M, Inestrosa NC (2014) In vivo activation of Wnt signaling pathway enhances cognitive function of adult mice and reverses cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. J Neurosci 34:2191–2202.
- Vilardo E, Barbato C, Ciotti M, Cogoni C, Ruberti F (2010) MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons. J Biol Chem 285:18344– 18351.
- Vo NK, Cambronne XA, Goodman RH (2010) MicroRNA pathways in neural development and plasticity. Curr Opin Neurobiol 20:457–465.

- Wang W-X, Huang Q, Hu Y, Stromberg AJ, Nelson PT (2011) Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter. Acta Neuropathol 121:193–205.
- Wayman GA, Impey S, Marks D, Saneyoshi T, Grant WF, Derkach V, Soderling TR (2006) Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. Neuron 50:897–909.
- Willert K, Nusse R (2012) Wnt proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol 4:a007864.
- Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak WJ (2011) Practical Aspects of microRNA Target Prediction. Curr Mol Med 11:93–109.
- Wright TM, Brannon AR, Gordan JD, Mikels AJ, Mitchell C, Chen S, Espinosa I, van de Rijn M, Pruthi R, Wallen E, Edwards L, Nusse R, Rathmell WK (2009) Ror2, a developmentally regulated kinase, promotes tumor growth potential in renal cell carcinoma. Oncogene 28:2513–2523.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. Neuron 11:371–386.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of premicroRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev 17:3011–3016.
- Yu JM, Jun ES, Jung JS, Suh SY, Han JY, Kim JY, Kim KW, Jung JS (2007) Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells. Cancer Lett 257:172–181.
- Zhang Y, Sun Y, Wang F, Wang Z, Peng Y, Li R (2012) Downregulating the canonical Wnt/β-catenin signaling pathway attenuates the susceptibility to autism-like phenotypes by decreasing oxidative stress. Neurochem Res 37:1409–1419.
- Zhao C, Avilés C, Abel RA, Almli CR, McQuillen P, Pleasure SJ (2005) Hippocampal and visuospatial learning defects in mice with a deletion of frizzled 9, a gene in the Williams syndrome deletion interval. Development 132:2917–2927.
- Zhou Z, Meng Y, Asrar S, Todorovski Z, Jia Z (2009) A critical role of Rho-kinase ROCK2 in the regulation of spine and synaptic function. Neuropharmacology 56:81–89.
- Ziu M, Fletcher L, Rana S, Jimenez DF, Digicaylioglu M (2011) Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury. PLoS One 6:e14724.
- Zongaro S, Hukema R, D'Antoni S, Davidovic L, Barbry P, Catania MV, Willemsen R, Mari B, Bardoni B (2013) The 3' UTR of FMR1 mRNA is a target of miR-101, miR-129-5p

and miR-221: implications for the molecular pathology of FXTAS at the synapse. Hum Mol Genet 22:1971–1982.

Zovoilis A, Agbemenyah HY, Agis-Balboa RC, Stilling RM, Edbauer D, Rao P, Farinelli L, Delalle I, Schmitt A, Falkai P, Bahari-Javan S, Burkhardt S, Sananbenesi F, Fischer A (2011) microRNA-34c is a novel target to treat dementias. EMBO J 30:4299–4308.