

Pontificia Universidad Católica de Chile Facultad de Ciencias Biológicas Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Mención Ciencias Fisiológicas

**TESIS DOCTORAL** 

# LA RUTA ENDOCÍTICA TEMPRANA-RECICLAJE REGULA LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB Y LA EXPRESIÓN GÉNICA REQUERIDA PARA LA ARBORIZACIÓN DENDRÍTICA INDUCIDA POR BDNF.

Andrés Enrique González Gutiérrez

Abril 2016



Pontificia Universidad Católica de Chile Facultad de Ciencias Biológicas Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Mención Ciencias Fisiológicas

# LA RUTA ENDOCÍTICA TEMPRANA-RECICLAJE REGULA LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB Y LA EXPRESIÓN GÉNICA REQUERIDA PARA LA ARBORIZACIÓN DENDRÍTICA INDUCIDA POR BDNF.

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como parte de los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Ciencias Fisiológicas por:

## Andrés Enrique González Gutiérrez

Directora de Tesis: Dra. Francisca Bronfman Cáceres Comisión de Tesis: Dra. Rommy von Bernhardi M. Dr. Rodrigo Iturriaga A. Dr. Andrés Couve C.

Abril 2016

Esta tesis está dedicada a las personas más bellas que he conocido: Tatiana, Inés, Enrique, Angelina, Constanza, Valentina, Ignacio, Blanca, Lucinda, Humberto y José.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra. Francisca Bronfman por su dedicación, guía, amistad y apoyo. Agradezco también a los integrantes de la comisión de tesis, que gracias a su aporte enriquecieron mi tesis doctoral. A la Dra. Úrsula Wyneken y a todos los compañeros de trabajo de la sección de Neurobiología de la Universidad Católica de Chile (Mónica Flores, Fidel Flores y Juan Muñoz).

Quiero además agradecer el apoyo y amistad de los queridos compañeros de laboratorio que he tenido a lo largo de los años: Oscar Lazo, Claudia Pissani, Claudia Escudero, Carolina Galleguillos, Carolina Cabeza, Juan Pablo Lezana, Yasmín Salvatore, Rocío Orellana y María José Rodríguez. Sin embargo, quiero dedicar en especial esta tesis a Aníbal Cáceres y a Guillermo Moya por su ayuda, colaboración y amistad que apoyaron de manera fundamental el desarrollo de la presente tesis.

Finalmente, agradecer el cariño y paciencia que me han brindado Tatiana Aleuy, Cristián Fuentes, Miguel Guarda y Alejandro Ramírez, Arturo Santibáñez, Francisco Lisboa, Ricardo Chaura, Alejandra Ponce, Rodrigo Osorio y Pamela Morales, cuya amistad (y hermandad) formada en 1999 no ha sido alterada por los años ni la distancia. Y no cambiará.

## ÍNDICE DE MATERIAS.

Índice de materias	ii
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	ix
Lista de abreviaturas	Х
Resumen	xiii
Abstract	XV
1 Introducción	1
1.1. Regulación de la morfología neuronal	1
1.2. Las neurotrofinas y sus receptores	2
1.3. Papel de BDNF y sus receptores TrkB y p75 en la morfología	
neuronal	6
1.4. Mecanismos de señalización que median la respuesta de	
BDNF/TrkB en neuronas	7
1.5- Regulación de la señal neurotrófica a través de la endocitosis	10
1.6- El endosoma de señalización como un mecanismo para el	
transporte de la señal neurotrofica	11
1.7- Rab GTPasas y su papel en endocitosis y señalización	14
1.8. Hipótesis	22
1.9. Objetivos	22
Objetivo General	22
Objetivos Específicos	22

2 ]	Materiales	23
<b>3</b> ]	Métodos	27
	3.1. Cultivo primario de neuronas hipocampales de rata	27
	3.2. Cultivo de células HEK293, producción de partículas adenovirales	
	e infección de neuronas hipocampales	28
	3.3. Marcaje de anticuerpos	31
	3.4. Extracción de proteínas y electroforésis en geles de poliacrilamida-	
	SDS	32
	3.5. Western blot	33
	3.6. Transfección de neuronas con plasmidios	34
	3.7. Inmunofluorescencia	35
	3.8. Análisis de Microscopía	36
	3.8.1. Protocolo de análisis de morfología neuronal	36
	3.8.2. Cuantificación de fluorescencia y controles realizados	37
	3.8.3. Cuantificación de co-localización	41
	3.9. Análisis de los niveles de RNA mensajeros (RNAm) en neuronas	
	hipocampales luego de la estimulación con BDNF	41
	3.9.1. Extracción de RNA	41
	3.9.2. Análisis de cambios en los niveles de RNAm de Rab5a y Rab11a	
	en neuronas hipocampales	42
	3.9.3. Análisis de cambios en los niveles de RNAm mediante Arreglos	
	de PCR	44
	3.10. Diseños experimentales	47
	- 3.10.1. Papel de Rab5, Rab11 y CREB en la ramificación dendrítica	
	inducida por BDNF	47
	3.10.2. Estudio de co-localización de TrkB junto Rab5 y Rab11	49
	3.10.3. Estudio del papel de Rab11 en el reciclaje de receptores TrkB	50

	3.10.4. Estudio del efecto de mutante Rab5DN en la internalización de
	receptores recombinantes TrkB-flag
	3.10.5. Efecto de la inhibición de la actividad de Rab5 en los niveles de
	Rab11 endógeno en neuronas hipocampales en cultivo
	3.10.6. Estudio de las rutas de transducción de señales requeridas para la
	activación de CREB en respuesta a la estimulación con BDNF
	3.10.7. Estudio del papel de la actividad de Rab5 y Rab11 en la
	activación de CREB por estimulación con BDNF
	3.10.8. Estudio del requerimiento de la actividad de Rab5 y Rab11 para
	la activación de rutas de transducción de señales rio abajo de
	BDNF/TrkB
	3.10.9. Estudio del papel de la actividad de Rab5 y Rab11 en la activación in
	situ de ERK 1/2 en respuesta a la estimulación con BDNF.
	a) Validación de anticuerpo anti-pERK1/2
	b) Papel de la actividad de Rab5 y Rab11 en la activación in situ
	de ERK 1/2 en respuesta a la estimulación con BDNF
	3.10.10. Análisis de los niveles de RNAm de <i>Rab5a</i> y <i>Rab11a</i> luego de la
	estimulación con BDNF
	3.10.11. Análisis de los niveles de proteína de Rab5a y Rab11a luego de
	la estimulación con BDNF. Papel de inhibidores de la
	transcripción génica y de la traducción de proteínas
	3.10.12. Estudio del papel de Rab11 en los cambios de expresión de genes en
	respuesta a la estimulación con BDNF
	3.11. Análisis estadístico
41	Resultados
	4.1. La GTPasa Rab5 co-localiza con receptores TrkB, regula la morfología
	neuronal y es requerida para aumentar la arborización dendrítica inducida
	por BDNF

4.2. La activi	dad de la GTPasa Rab11 regula el reciclaje de receptores TrkB y es
requerida	a para aumentar la arborización dendrítica inducida por BDNF
4.3. La activa	ación de CREB es requerida para aumentar la arborización
dendrítica	a inducida por BDNF
4.4. La activi	dad de Rab5 y Rab11 es requerida para la activación del factor de
transcrip	ción CREB inducida por BDNF
4.5. La activi	dad de las GTPasas Rab5 y Rab11 es requerida para la activación
sostenida	de TrkB, Akt y ERK1/2 en respuesta a la estimulación con
BDNF	
4.6. ERK1/2	es requerida para la activación de CREB en respuesta a
BDNF en	neuronas hipocampales
4.7. La activi	dad de Rab5 y Rab11 es requerida para la activación de
ERK1/2 6	en dendritas, soma y núcleo en respuesta a BDNF en
neuronas	hipocampales
4.8. BDNF ar	umenta los niveles de proteínas de Rab5a de una manera
dependier	nte de la transcripción, traducción y la vía mTOR
4.9. Rab11 re	egula los cambios de expresión de genes inducidos por la
estimulac	ión con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo
Discusión	
5.1. Neurona	s hipocampales en cultivo como modelo para estudiar los cambios
en la arb	orización dendrítica inducida por BDNF
5.2. Requerir	niento de la actividad de Rab5 y Rab11 en el aumento en la
arborizad	ción dendrítica inducida por BDNF en neuronas
hipocamp	pales en cultivo
5.3. La activi	dad de las GTPasas Rab5 y Rab11 es necesaria para la activación
de CREB	en neuronas hipocampales en cultivo
5.4. La activi	dad de las GTPasas Rab5 y Rab11 es requerida para
producir	la activación y transporte al núcleo de ERK1/2 en respuesta
a la estim	ulación con BDNF

5.5. BDNF es un regulador de los niveles de las GTPasas Rab5 y Rab11	
en neuronas hipocampales	136
5.6. La GTPasa Rab11 regula la transcripción de genes inducida por la	
neurotrofina BDNF en neuronas hipocampales	138
6 Conclusiones	143
7 Bibliografía	144

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig 1 Las neurotrofinas y sus receptores	4
Fig 2 Representación esquemática de la propuesta	20
Fig 3 Niveles de expresión de EGFP y de los mutantes Rab5DN y Rab11DN	30
Fig 4 Diseño experimental para evaluar cambios de la morfología neuronal inducidos por BDNF	49
Fig 5 Adquisición y análisis de imágenes para la determinación de los niveles de pCREB inducida por BDNF	53
Fig 6 Adquisición y análisis de imágenes para determinación de activación de CREB inducida por BDNF en neuronas expresando Rab5DN y Rab11DN	55
Fig 7 Estrategia experimental utilizada para determinar papel de Rab5 y Rab11 en la activación de ERK1/2 inducida por BDNF	59
Fig 8 Adquisición y análisis de imágenes para determinación de activación de ERK1/2 inducida por BDNF en presencia de mutantes de Rab5 y Rab11	60
Fig 9 Imágenes de microscopía de fluorescencia de neuronas hipocampales de rata en cultivo durante 9 días	65
Fig 10 TrkB co-localiza con la GTPasa Rab5 luego de la estimulación con BDNF, en dendritas y cuerpos celulares de neuronas hipocampales en cultivo	66
Fig 11 La presencia de mutante Rab5DN redujo la arborización dendrítica basal y disminuyó los efectos de BDNF en neuronas hipocampales en cultivo	68
Fig 12 La expresión de Rab5DN no disminuyó la internalización de receptores TrkB- flag en neuronas hipocampales en cultivo	69
Fig 13 La expresión de Rab5DN no disminuyó el crecimiento axonal y no disminuyó la viabilidad de neuronas hipocampales en cultivo	72
Fig 14 La expresión de mutante Rab5DN disminuye la expresión de Rab11 en neuronas hipocampales	74
Fig 15 TrkB co-localiza con Rab11 luego de la estimulación con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo.	76

Fig 16	Una fracción de receptores TrkB recicla a través de endosomas positivos para Rab11 tanto en el cuerpo celular como en las dendritas
Fig 17	La expresión de mutante Rab11DN bloquea el aumento en la arborización dendrítica inducido por la estimulación durante 48 hrs con la neurotrofina BDNF.
Fig 18	Expresión del mutante dominante negativo de CREB (CREBS133A) en neuronas hipocampales
Fig 19	La expresión de mutante CREBS133A previene el aumento en la arborización dendrítica y de puntos de ramificación inducido por BDNF
Fig 20	La expresión de mutante Rab5DN previno la activación de CREB (pCREB) producida por la estimulación con BDNF
Fig 21	La expresión de mutante Rab11DN previno la activación de CREB (pCREB) producida por la estimulación con BDNF
Fig 22	La expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN bloqueó la activación de CREB (pCREB) producida por la estimulación con BDNF
Fig 23	La expresión de mutante constitutivamente activo de Rab11 (Rab11CA) aumentó la activación de CREB (pCREB) producida por la estimulación prolongada con BDNF
Fig 24	La expresión de mutante constitutivamente activo de Rab11 (Rab11CA) aumentó la respuesta de neuronas hipocampales a bajas concentraciones de BDNF
Fig 25	La expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN disminuye la activación sostenida de TrkB, ERK1/2 y Akt en respuesta a BDNF, sin modificar su activación transitoria
Fig 26	La inhibición de la vía MAP quinasa (ERK 1/2) bloquea la activación de CREB inducida por BDNF
Fig 27	La inhibición de MEK1, quinasa que actúa río arriba de ERK1/2 disminuyó la activación de ERK1/2 (pERK1/2) en respuesta a BDNF
Fig 28	La expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN disminuyó la activación y translocación al núcleo de ERK1/2 (pERK 1/2) producido por la estimulación con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo

Fig 29 La estimulación de neuronas hipocampales por 4 y 12 horas con BDNF aumentó los niveles de RNAm de <i>Rab5a</i> , sin alterar los niveles de <i>Rab11a</i>	106
Fig 30 BDNF aumentó el contenido de proteína de Rab5a, que es dependiente de la transcripción y además de la traducción regulada por la vía mTOR	108
Fig 31 BDNF aumentó el contenido de proteína de Rab11a, que es dependiente de la traducción regulada por la vía mTOR	111
Fig 32 La expresión del mutante Rab11DN previene el incremento en la expresión del gen de respuesta temprana <i>Arc</i> inducido por la estimulación con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo	114
Fig 33 La estimulación por 4 horas con BDNF produce cambios de expresión de genes en neuronas hipocampales en cultivo	116
Fig 34 La actividad de Rab11 es requerida para la estimulación de la transcripción de genes con sitios CRE inducida por BDNF	119
Fig 35 Resumen ilustrativo de los resultados obtenidos y modelo propuesto	142

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1 Partidores utilizados para el análisis de los niveles de Rab5a, Rab11a, Arc y de los genes utilizados como normalizadores	43
Tabla 2 Protocolo seguido para el análisis de los cambios de expresión de genes mediante el sistema de Arreglo de PCR Rat cAMP/Ca <sup>2+</sup> PathwayFinder RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array	45
Tabla 3 Genes inducidos por la estimulación por 4 horas con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo y descripción de los elementos de respuesta presentes en sus promotores	117
Tabla 4 Breve descripción funcional de los genes inducidos por la estimulación con BDNF y regulados por la actividad de la GTPasa Rab11 en neuronas hipocampales en cultivo	120

### LISTA DE ABREVIATURAS.

Akt	:	Proteína quinasa Akt (también llamada PKB, proteína	
		quinasa B).	
BDNF	:	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro.	
BSA	:	Albúmina Sérica de Bovino.	
cAMP	:	Adenosín monofosfato cíclico.	
СВР	:	Proteína que se une a CREB (co-activador).	
CREB	:	Proteína que se une a elementos de respuesta a cAMP.	
CREBS133A	:	Mutante de la proteína CREB, que presenta sustitución del	
		aminoácido serina-133 por alanina.	
DIV	:	Días in vitro.	
DMEM	:	Medio de Eagle modificado por Dulbecco.	
DNA	:	Ácido desoxirribonucleico.	
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetracético	
EGFP	:	Proteína verde fluorescente mejorada.	
ERK1/2	:	Proteínas quinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2.	
FT	:	Factor de transcripción.	
GDP	:	Guanosín difosfato (Nucleótido difosfato).	
GFAP	:	Proteína fibrilar acídica de la glía.	
GTP	:	Guanosín trifosfato (Nucleótido trifosfato).	
GTPasa	:	Enzima que hidroliza GTP, liberando un grupo fosfato.	
HBSS	:	Solución salina de Hanks.	

MAP2	:	Proteína asociada a microtúbulos 2.
MEM	:	Medio mínimo esencial.
MSK1	:	Proteína quinasa activada por estrés y mitógenos 1.
NGF	:	Factor de crecimiento neural.
NT3	:	Neurotrofina-3.
NT4	:	Neurotrofina-4.
p75	:	Receptor de neurotrofinas p75.
PBS	:	Tampón fosfato salino.
pCREB	:	Factor de transcripción CREB fosforilado en serina-133.
PFA	:	Paraformaldehído.
РІЗК	:	Fosfatidilinositol-3 quinasa.
PLCγ	:	Fosfolipasa C-gamma.
qPCR	:	Reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real.
Rab11	:	Pequeña GTPasa monomérica de la familia Ras, Rab11.
Rab11CA	:	Mutante constitutivamente activo de la proteína Rab11.
Rab11DN	:	Mutante dominante negativo de la proteína Rab11.
Rab5	:	Pequeña GTPasa monomérica de la familia Ras, Rab5.
Rab5DN	:	Mutante dominante negativo de la proteína Rab5.
Rab5CA	:	Mutante constitutivamente activo de la proteína Rab5.
Rab7	:	Pequeña GTPasa monomérica de la familia Ras, Rab7.
RNAm	:	Ácido ribonucleico mensajero.
RNAr	:	Ácido ribonucleico ribosómico.

SDS : I	odecil sulfato de sodio.
---------	--------------------------

- **SNC** : Sistema nervioso central.
- **SNP** : Sistema nervioso periférico.
- **TBS** : Tampón Tris salino.
- **TrkA** : Tirosina quinasa transmembrana A, receptor para NGF.
- TrkB
   : Tirosina quinasa transmembrana B, receptor para BDNF y

   NT4.
- **TrkC** : Tirosina quinasa transmembrana C, receptor para NT3.

#### **RESUMEN.**

La neurotrofina BDNF y su receptor TrkB son expresados ampliamente en el sistema nervioso central y regulan la morfología neuronal mediante la inducción del crecimiento y ramificación de dendritas. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a los efectos de BDNF aún no han sido establecidos.

Un aspecto clave que regula la señalización de TrkB es su internalización y posterior tráfico intracelular, dado que determina la disponibilidad de TrkB en la superficie celular, los adaptadores intracelulares de señalización que une y su cinética de degradación. Estos procesos, en su conjunto, determinan la respuesta biológica a neurotrofinas. El tráfico endócitico de proteínas de superficie está regulado por las GTPasas monoméricas de la familia Rabs. Particularmente Rab5 y Rab11, regulan la endocitosis inicial y reciclaje de receptores. Es sabido que BDNF activa a TrkB tanto en dendritas como axones y las señales generadas en estas regiones distales deben propagarse hasta el núcleo activando factores de transcripción y así modificar la expresión génica. El trabajo de esta tesis se centró en estudiar si el tráfico post-endocítico regulado por Rab5 y Rab11 está involucrado en la duración de la señalización mediada por TrkB, teniendo consecuencias en la activación de factores de transcripción y la morfología neuronal.

Nuestra hipótesis postuló que: "Las GTPasas Rab5 y Rab11 son requeridas para la activación sostenida de la señalización neurotrófica y los posteriores cambios transcripcionales y morfológicos regulados por CREB e inducidos por BDNF".

Usando neuronas de hipocampo de rata en cultivo (9 DIV), en el presente trabajo hemos establecido que el sistema endosomal compuesto por las GTPasas monoméricas Rab5 y Rab11 es necesario para la señalización BDNF/TrkB, activación del factor de transcripción CREB y aumento en la expresión de genes relacionados con arborización dendrítica. Encontramos que la expresión de mutantes dominantes negativo de Rab5 y Rab11 redujo la activación de ERK1/2 y la posterior activación de CREB en el núcleo en respuesta a la estimulación con BDNF. Además, la activación de TrkB aumentó los niveles de proteína de Rab5a y Rab11a de una manera dependiente de la traducción y la actividad de la quinasa mTOR. También, encontramos que BDNF aumentó la transcripción de Rab5a. Esto podría permitir la existencia de un *feedback* positivo para la señalización neurotrófica de TrkB desde endosomas. Finalmente, además de ser requerido para la activación de CREB, hemos identificado a Rab11 como un regulador de la expresión génica de *c-Fos, Egr-1 y Arc* (entre otros), genes que están relacionados con el crecimiento y plasticidad neuronal y que son inducidos por BDNF, vinculando por primera vez a la actividad de Rab11 en los efectos transcripcionales promovidos por BDNF.

En resumen, nuestros resultados identifican nuevos componentes celulares requeridos rio arriba de la activación de CREB y posterior arborización dendrítica inducida por BDNF en neuronas del sistema nervioso central.

#### **ABSTRACT.**

The neurotrophin BDNF and its receptor TrkB are widely expressed in the central nervous system and regulate neuronal morphology by inducing dendritic growth and branching. However, the underlying cellular and molecular mechanisms have not yet been established.

The internalization and intracellular trafficking of the activated TrkB receptor is a key aspect regulating BDNF signaling, since it determines the availability of TrkB on the cell surface, the binding of intracellular signaling molecules to its cytosolic tale and its degradation kinetics. Together these processes determine the biological response to BDNF. The endocytic trafficking of surface proteins is regulated by the Rab family of monomeric GTPases. Particularly Rab5 and Rab11 regulate the initial endocytosis and recycling of receptors. It is known that BDNF activates TrkB in axons and dendrites and the local signaling generated in distal processes of neurons has to be propagated to the nucleus to modify gene expression.

The work of this thesis focused on studying whether post-endocytic trafficking regulated by Rab5 and Rab11 is involved in the duration of TrkB-mediated signaling, having consequences in the activation of transcription factors and neuronal morphology.

Our hypothesis postulated that: "The Rab5 and Rab11 GTPases are required for sustained activation of neurotrophic signaling and subsequent transcriptional and morphological changes regulated by BDNF ".

Using primary cultures of rat hippocampal neurons (9 DIV), we established that the endosomal system composed by the monomeric GTPases Rab5 and Rab11 is required for BDNF/TrkB signaling, activation of the CREB transcription factor and increased expression

of genes related to dendritic arborization. We found that expression of dominant negative mutants of Rab5 and Rab11 reduced the activation of ERK1/2 and subsequent activation of CREB in the nucleus in response to BDNF stimulation. In addition, TrkB activation increased protein levels of Rab5a and Rab11a in an mTOR kinase-dependent manner. Also, we found that BDNF increased transcription of Rab5a. This could allow the existence of a positive feedback for TrkB neurotrophic signaling from endosomes.

Finally, besides being required for the activation of CREB, we identified Rab11 as a regulator of gene expression of *c-Fos, Egr-1* and *Arc* among others genes that are associated with neuronal plasticity and growth and that are induced by BDNF, linking for the first time Rab11 activity and the transcriptional effects promoted by BDNF.

In summary, our results identify new cellular components required upstream of CREB activation and subsequent BDNF-induced dendritic arborization in neurons of the central nervous system.

#### 1. INTRODUCCIÓN.

#### 1.1. Regulación de la morfología neuronal.

El sistema nervioso es una estructura que presenta un alto grado de conectividad, la cual puede ser mantenida en base a la morfología polarizada que poseen las neuronas. Estas poseen dos dominios: la región somato-dendrítica, que desde un punto de vista funcional está encargada de recibir e integrar la información que proviene desde otras zonas del sistema nervioso y el axón, que se caracteriza por transmitir estas señales (Jan & Jan 2010, Lewis et al 2013). El grado de conectividad que logra una neurona está directamente relacionado con el área cubierta por ambos dominios, por lo que la morfología neuronal es un aspecto importante en la funcionalidad de la neurona. De hecho, se ha descrito que defectos en el desarrollo tanto de la región somato-dendrítica como del axón pueden contribuir al desarrollo de diversas patologías y desórdenes neurológicos (Kulkarni & Firestein 2012).

Los aspectos que pueden regular la morfología neuronal y en específico la estructura del árbol dendrítico han sido objeto de estudio, sumando hasta la fecha un considerable número de moléculas involucradas en el proceso. Desde un punto de vista global, los factores que regulan la morfología neuronal se pueden dividir en factores genéticos intrínsecos de la célula, que determinarán un patrón de ramificación básico de la neurona además de la participación de señales externas, cuyas acciones finalmente se superponen para dar forma a la neurona (Urbanska et al 2008).

Entre los factores intrínsecos que regulan la morfología, se encuentra los factores de transcripción (FT) que regulan la transcripción de genes requeridos para el crecimiento y ramificación de dendritas y axones. Hasta la fecha, la evidencia que sustenta la

participación de FTs se ha obtenido principalmente de estudios en *Drosophila Melanogaster*, identificando a factores de transcripción como *Hamlet*, *Cut* o *Abrupt* (Gao 2007, Parrish et al 2007). También existen evidencias que vincula la acción de factores de transcripción como reguladores de la arborización dendrítica en neuronas de vertebrados como *Neurogenin2* y *Dlx*, entre otros (Cobos et al 2007, Hand et al 2005).

Los factores extrínsecos están constituidos por diversos factores extracelulares como por ejemplo, factores de crecimiento que pueden regular la dinámica del citoesqueleto, la actividad neuronal, la activación de vías de señalización intracelular y la actividad de FTs (Urbanska et al 2008). Entre los factores extrínsecos reguladores de la morfología neuronal se encuentran las neurotrofinas, que a través de la unión a sus receptores pueden regular el crecimiento y ramificación tanto de dendritas como de axones, en neuronas del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). De esta forma, las neurotrofinas ejercen un papel clave en la formación y plasticidad del sistema nervioso (Park & Poo 2013).

#### **1.2.** Las neurotrofinas y sus receptores.

Las neurotrofinas regulan distintos aspectos del SNC y SNP, como la sobrevida, el desarrollo y la plasticidad neuronal. Este grupo de factores tróficos está compuesto por el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) y las Neurotrofinas 3 y 4 (NT3 y NT4). Estos factores ejercen su efecto biológico a través de su unión a dos tipos de receptores transmembrana, los receptores tirosina quinasa Trk (de *"tropomyosin-related kinase receptor"*) y el receptor de neurotrofinas p75 (p75). Los Trks unen preferentemente un tipo de neurotrofina: TrkA une NGF, TrkB une BDNF y NT4 y TrkC une NT3, lo que induce su autofosforilación y posterior activación de

vías de transducción de señales, que incluyen a las MAP quinasas (MAPK) (ERK1/2, ERK5, p38), fosfatidilinositol-3 la quinasa (PI3K), las GTPasas pequeñas Cdc42/Rac/RhoG, y la vía de la fosfolipasa C-gamma (PLC-γ) (Chao 2003, Huang & Reichardt 2001). El receptor p75 es miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral y a diferencia de los Trks, no posee actividad autocatalítica. Además de unir con similar afinidad a todas las neurotrofinas, es capaz de unir las formas inmaduras de las neurotrofinas, denominadas pro-neurotrofinas, entre otros ligandos (Roux & Barker 2002). La unión de p75 al ligando induce su interacción con diversos adaptadores intracelulares a través de su dominio citosólico, lo cual conduce tanto a sobrevida y crecimiento de neuritas, como a muerte celular e inhibición del crecimiento de axones (Ibanez & Simi 2012, Kraemer et al 2014). Esta diversidad de respuestas está determinada por la interacción de p75 con distintos ligandos, co-receptores y proteínas adaptadoras citoplasmáticas. Además, p75 es sometido a procesamiento proteolítico, proceso que podría estar regulando las respuestas generadas por el receptor (Skeldal et al 2011). En la Figura 1 se resume de manera ilustrativa a las neurotrofinas, sus receptores y acciones.



**Figura 1. Las neurotrofinas y sus receptores.** La unión de BDNF a su receptor TrkB, induce la dimerización y transfosforilación del receptor debido a la actividad tirosina (Y) quinasa en su porción intracelular. Por otro lado, el receptor p75 puede unir todas las neurotrofinas, a las formas inmaduras de éstas, las pro-neurotrofinas, y a otros péptidos. Se destaca en el esquema las vías de señalización intracelular que activan estos receptores y sus efectos en la fisiología de la neurona (Arthur et al 2004, Kraemer et al 2014, Reichardt 2006).

Las neurotrofinas son producidas por neuronas del SNC, SNP y por los órganos y tejidos inervados por ellas (Huang & Reichardt 2001, McAllister et al 1999, Thoenen 1995). Durante el desarrollo del sistema nervioso, las neurotrofinas regulan procesos fisiológicos tan diversos como la sobrevida (a través de los Trks) o muerte neuronal (a través de p75), migración, mielinización y extensión de procesos neuronales (axones y dendritas); en el adulto regulan procesos de neurogénesis, plasticidad sináptica y regeneración axonal, entre otros (Bath & Lee 2010, Bibel & Barde 2000, Huang & Reichardt 2001, Lu et al 2005). El papel esencial de las neurotrofinas y sus receptores en el desarrollo y mantención del sistema nervioso de los vertebrados queda en evidencia por la disrupción de su expresión (Snider 1994). Por ejemplo, la ausencia de *TrkB* produce la muerte de ratones luego de 24 a 48 horas luego de nacer (Klein et al 1993) y la ausencia de *BDNF* conduce a ratones de menor tamaño, que mueren luego de la segunda semana postnatal (Ernfors et al 1994). Además, la ausencia de p75 en ratones no es letal, pero produce serios defectos en el desarrollo vascular y nervioso del animal, por ejemplo una menor inervación de neuronas sensoriales (Lee et al 1992).

De particular interés para el desarrollo de la presente tesis es el papel regulador en la morfología neuronal ejercido por las neurotrofinas. En el SNC ha sido descrito que tanto BDNF, NT3 y NT4 pueden regular la morfología dendrítica en diversos modelos de estudio (Baker et al 1998, Imamura & Greer 2009). Además, tanto NT3 como NGF coordinan el crecimiento y ramificación de los axones de neuronas simpáticas durante el desarrollo (Glebova & Ginty 2005). Pero sin duda la neurotrofina más estudiada como regulador de la morfología neuronal es BDNF y su receptor TrkB. No obstante la gran cantidad de artículos que definen el papel de BDNF como regulador del crecimiento de axones y dendritas, los mecanismos que subyacen a los efectos morfológicos inducidos por BDNF aún no están completamente establecidos.

#### **1.3.** Papel de BDNF y sus receptores TrkB y p75 en la morfología neuronal.

BDNF es expresada en diversos tejidos y tipos celulares, pero es muy abundante en el SNC y particularmente en el hipocampo, el cerebelo y en la corteza cerebral (Pruunsild et al 2007). El receptor TrkB es el receptor para neurotrofinas con la expresión más ubicua en el SNC y de hecho, la mayoría de las neuronas centrales expresan este receptor (Yan et al 1997). Además, p75 es expresado ampliamente en el sistema nervioso hasta cierto punto del desarrollo, pero sus niveles disminuyen en la mayoría de las células al alcanzar la madurez. Sin embargo, sus niveles se incrementan drásticamente luego de daño o estrés celular (Ibanez & Simi 2012).

La relevancia de BDNF y sus receptores como reguladores de la morfología neuronal en el SNC, queda bien definida por estudios realizados en ratones nulos tanto para la neurotrofina como para TrkB y p75. En animales en que se realizó la deleción condicional de *BDNF* se produce una disminución significativa de la arborización dendrítica en neuronas de la corteza, del cuerpo estriado y del hipocampo (Gorski et al 2003, Rauskolb et al 2010). A su vez, la pérdida de TrkB en el SNC mediante la deleción condicional del receptor causa una retracción del árbol dendrítico, una disminución del volumen del cuerpo neuronal y neurodegeneración en la corteza cerebral (Xu et al 2000). Además, utilizando el mismo modelo experimental, la ausencia de TrkB en el hipocampo conduce a una disminución en el número de terminales pre-sinápticas y de sinapsis excitatorias formadas por las colaterales de Schaffer, que son axones que se proyectan hacia la zona CA1 del hipocampo (Luikart et al 2005). En contraste, la ausencia del receptor p75 en un modelo de estudio *in vitro* no produce una modificación mayor en la arborización dendrítica en neuronas piramidales del hipocampo, pero altera de manera significativa el número y tipo de espinas dendríticas en neuronas maduras (Zagrebelsky et

al 2005). En esta misma investigación se halló que sólo mediante la sobre-expresión del receptor se genera una disminución significativa de la arborización dendrítica. Recientemente, se describió que p75 regula la polaridad neuronal, observándose un aumento en los niveles del receptor en la neurita inmadura que posteriormente se convertirá en axón, sugiriendo una acción determinante de la morfología neuronal en neuronas del hipocampo (Zuccaro et al 2014). En suma, la evidencia actual sugiere que la regulación de la arborización dendrítica inducida por BDNF es mediada principalmente por su receptor TrkB en condiciones fisiológicas. Además, la señalización de BDNF a través de su receptor p75 estaría involucrada de manera importante en la maduración y refinamiento de los contactos sinápticos además de controlar la polarización de neuronas centrales durante el desarrollo. En el sistema nervioso maduro tendría un papel antagónico a los Trks, adquiriendo un papel relevante en la inhibición del crecimiento de axones luego de daño (Ibanez & Simi 2012). Los mecanismos que subyacen a estas acciones divergentes de p75 aún son objeto de intenso estudio.

# 1.4. Mecanismos de señalización que median la respuesta de BDNF/TrkB en neuronas.

A pesar de que las evidencias indican que la señalización BDNF/TrkB cumple un papel regulatorio en la morfología que alcanzan las neuronas, los mecanismos que subyacen a los efectos producidos por BDNF no han sido descritos completamente. Está establecido que la unión de BDNF a su receptor TrkB induce la dimerización y transfosforilación de variados residuos de tirosina (Y) en el receptor, entre los cuales destacan los residuos Y515 y Y816 que generan sitios de anclaje a las proteínas Shc/FRS y PLCγ-1, respectivamente (Figura 1). La fosforilación del residuo Y515 promueve la activación

tanto de la vía de señalización ERK1/2 a través de la cual se regula el crecimiento y la diferenciación celular, además de la ruta PI3K/Akt, a través de la cual se regula el crecimiento, sobrevida neuronal y la síntesis de proteínas (Figura 1) (Gottschalk et al 1999, Marsh et al 1993). La fosforilación del residuo Y816 recluta a PLCy-1, cuya actividad enzimática puede generar inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol, promoviendo aumentos de  $Ca^{2+}$  a nivel intracelular y la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Figura 1) (Minichiello 2009, Minichiello et al 2002). Estas rutas de señalización pueden conducir a cambios en la expresión génica a través de la activación de FTs, particularmente del FT CREB ("cyclic AMP response element (CRE)-binding protein") (Finkbeiner et al 1997), que mediante la activación de la ruta ERK1/2, es fosforilado por la proteína quinasa MSK1 en el residuo serina-133 (Figura 1) (Arthur et al 2004). La fosforilación de este aminoácido promueve la unión de co-activadores transcripcionales como CBP (de "CREB binding protein") o su parálogo P300 (Chrivia et al 1993). Esta interacción de CBP/P300 con CREB conduce al ensamblaje del complejo RNA polimerasa, promoviendo la transcripción de una gama amplia de genes relacionados con crecimiento y sobrevida neuronal (Finkbeiner et al 1997, Johannessen et al 2004).

CREB regula el crecimiento tanto de dendritas como de axones en condiciones fisiológicas como luego de daño (Finsterwald et al 2010, Gao et al 2004, Hannila & Filbin 2008, Spencer et al 2008). El papel de CREB en la regulación de la morfología neuronal quedó demostrado utilizando ratones nulos para el FT, lo cual condujo a una disminución de las proyecciones axonales que decusan en el cuerpo calloso (Rudolph et al 1998). Además, utilizando un modelo *in vitro*, la presencia de un dominante negativo de CREB disminuyó la complejidad del árbol dendrítico y el largo total de las dendritas, efecto inducido por la actividad eléctrica en neuronas corticales en cultivo (Redmond et al 2002). A pesar de que existe evidencia relevante que vincula la señalización BDNF/TrkB/CREB

como reguladores clave de la morfología neuronal, los efectores y eventos posteriores a la activación del receptor TrkB necesarios para la acción de BDNF no han sido determinados. Una investigación reciente ha identificado a la proteína cypin (proteína con actividad guanina desaminasa), como un elemento requerido para los cambios en la arborización dendrítica inducida por BDNF (Kwon et al 2011). Interesantemente, los niveles de cypin son modificados por BDNF y para ello se requiere la activación de CREB a través de la vía ERK1/2. Esta evidencia sugiere que los cambios morfológicos inducidos por BDNF pueden requerir cambios transcripcionales mediados por CREB en proteínas claves requeridas para modificar la estructura neuronal.

Para obtener mayores indicios de los mecanismos involucrados en la señalización BDNF/TrkB que promueve la arborización dendrítica, los modelos de estudio in vitro han sido de gran utilidad. En su mayoría, se basan en el cultivo de neuronas que provienen desde el hipocampo o la corteza de embriones de rata o ratón, desde donde se han identificado diversos elementos necesarios por la señalización BDNF/TrkB para producir cambios morfológicos. En estos modelos se ha logrado establecer de manera clara que las vías ERK1/2 y PI3K/Akt son requeridas para producir cambios en la arborización dendrítica inducida por BDNF durante el desarrollo, además de regular el número y forma de las espinas dendríticas en neuronas maduras (Dijkhuizen & Ghosh 2005, Horch & Katz 2002, Jaworski et al 2005, Kumar et al 2005). Además, Finsterwald y colaboradores mostraron que los aumentos inducidos por BDNF en la longitud y arborización dendrítica de neuronas corticales en cultivo requieren de la activación de la vía ERK1/2 y la fosforilación de CREB en el residuo serina-133 (Finsterwald et al 2010). Por otro lado, la reorganización del citoesqueleto de actina también es necesaria para la modificación de la estructura de neuronas corticales inducida por BDNF. Esto se lleva a cabo por la regulación de la actividad de la GTPasa Rac1 dependiente de TrkB, que fosforila y activa a Tiam1, regulador de la actividad de Rac1 (Miyamoto et al 2006). Además, en una investigación realizada por Zheng y colaboradores, se demostró que la inhibición de la internalización del complejo BDNF/TrkB mediada por clatrina bloqueó tanto la activación de Akt, como la extensión dendrítica total y los puntos de ramificación inducidos por la estimulación con BDNF (Zheng et al 2008), sugiriendo un papel importante del tráfico endocítico de receptores de neurotrofinas en la regulación de la morfología neuronal.

En suma, la evidencia indica que la señalización BDNF/TrkB promueve un aumento en la arborización dendrítica a través de la activación de ERK1/2 y PI3K/Akt. La activación de estas vías requiere de la internalización del complejo neurotrofina/receptor y cambios en la expresión de genes regulados por CREB, a través de mecanismos que no están totalmente detallados.

#### 1.5- Regulación de la señal neurotrófica a través de la endocitosis.

Un aspecto celular relevante que puede regular la señalización a través de receptores de neurotrofinas es su endocitosis y tráfico intracelular (Bronfman et al 2014). Varias líneas de investigación han aportado evidencia que indica una relación estrecha entre el proceso de endocitosis y tráfico endocítico y la señalización neurotrófica. Por ejemplo, utilizando como modelo de estudio la línea celular neuroendocrina PC12, Mobley y colaboradores demostraron que los receptores de neurotrofinas pueden establecer una señalización diferencial desde endosomas. Luego de su internalización, los receptores TrkA pueden interactuar con la GTPasa Rap1 en endosomas promoviendo una activación sostenida de ERK1/2 que es requerida para producir diferenciación neuronal (Wu et al 2001). La activación sostenida de ERK1/2 se define como la fosforilación de estas proteínas en respuesta a neurotrofinas (como NGF o BDNF) que puede mantenerse durante

horas, en contraposición a la activación transitoria de ERK1/2, como la inducida por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la cual se mantiene por un máximo de 30 minutos (Marshall 1995, Roskoski 2012). Este aspecto es relevante, dado que la activación sostenida de ERK1/2 es un evento requerido para producir su translocación al núcleo, donde podrá modificar la transcripción de genes (Dikic et al 1994). Además, la proteína PDZ-GEF1 (que activa a Rap1) se une al receptor TrkA en endosomas tardíos, produciendo la activación sostenida tanto de TrkA como Rap1, promoviendo el crecimiento de neuritas en células PC12 (Hisata et al 2007). Esta evidencia apoya el papel del sistema endosomal como regulador de la temporalidad de la señalización neurotrófica, que a su vez impacta directamente en el resultado de la señalización. En el caso del complejo BDNF/TrkB, se ha descrito que la inhibición de la endocitosis mediada por clatrina bloquea tanto la activación de la ruta PI3K/Akt como el aumento en la arborización dendrítica inducida por BDNF (Zheng et al 2008). En apoyo a la idea de que el tráfico de TrkB es requerido para la correcta señalización del receptor, el reciclaje del receptor TrkB dependiente del factor Hrs (de Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) es requerido para la activación sostenida de ERK1/2 (Huang et al 2009).

A partir de estas investigaciones se puede concluir que el tráfico endocítico de receptores de neurotrofinas puede ser un aspecto regulatorio importante que puede determinar la temporalidad de la activación de vías de señalización. Además, existe evidencia que sugiere que TrkB sigue señalizando luego de que es internalizado y que la señalización intracelular de TrkB sería necesaria para producir cambios morfológicos en neuronas del SNC.

1.6- El endosoma de señalización como un mecanismo para el transporte de la señal neurotrofica.

La endocitosis y el tráfico endocítico son procesos celulares claves para establecer la comunicación intracelular en las neuronas. En este sentido, señales generadas en lugares distantes del cuerpo celular como dendritas y axones deben ser conducidas por transporte retrógrado hacia el núcleo, donde se regulará la transcripción génica para generar respuestas que promueven el crecimiento, la plasticidad y sobrevida (Harrington & Ginty 2013). El transporte retrógrado de señales hacia el cuerpo celular depende del tráfico de vesículas a través de la red de microtúbulos, mediado por el motor molecular dineína (Panayotis et al 2015, Schiavo et al 2013).

Como fue mencionado anteriormente, los receptores de neurotrofinas son endocitados luego de la unión de su ligando, siendo destinados a diferentes rutas intracelulares por mecanismos que no están totalmente definidos. Inicialmente, la endocitosis del complejo receptor/neurotrofina se asumió como un mecanismo que disminuía la señalización neurotrófica. Sin embargo, actualmente está establecido que la internalización y tráfico post-endocítico de los receptores de neurotrofinas es una parte esencial en la señalización y función neuronal ya que puede determinar la disponibilidad de los receptores en la superficie celular, la ubicación y por lo tanto, la duración de la señalización neurotrófica (Bronfman et al 2007, Cosker & Segal 2014). Los mecanismos moleculares que regulan el transporte de la señal neurotrófica generada en lugares distales de la neurona ha sido foco de distintos estudios. La propuesta que ha presentado mayor respaldo experimental es la del denominado "endosoma de señalización", la cual se basa en evidencias halladas en neuronas del SNP, particularmente en neuronas simpáticas y sensoriales, en las cuales se ha descrito el requerimiento de la internalización y transporte de TrkA activado en el terminal axonal por NGF. Existen evidencias menos claras para la señalización retrógrada axonal en el SNC (Ginty & Segal 2002, Grimes et al 1996, Miller & Kaplan 2001, Ye et al 2003). Esta hipótesis propone que las neurotrofinas secretadas por la región inervada se unen a sus respectivos receptores en los terminales axonales y el complejo receptor-neurotrofina es internalizado por endocitosis, permaneciendo el ligando hacia el lumen de la vesícula constantemente unido al receptor, lo que conduce a una continua autofosforilación de éste y en consecuencia, una activación sostenida de vías de señalización relacionadas con el receptor. Además, diversos adaptadores se asocian en la porción citosólica del receptor, lo que produce un endosoma que contiene moléculas señalizadoras. Este endosoma compartimentaliza la señal neurotrófica y permite la movilización de señales iniciadas en el terminal axonal hasta el núcleo (Ginty & Segal 2002, Wu et al 2009, Zweifel et al 2005).

Estas evidencias halladas en neuronas simpáticas y sensoriales han demostrado que señales generadas a larga distancia pueden conducir a cambios transcripcionales necesarios para producir crecimiento, diferenciación y sobrevida neuronal. Por ejemplo, Ginty y colaboradores utilizando neuronas simpáticas en cultivos compartimentalizados (en los que existe una separación entre los cuerpos celulares y los axones) demostraron que la estimulación de las terminales axonales con NGF promueve la activación de CREB, la cual requiere tanto de la internalización del complejo NGF/TrkA como de la actividad catalítica tirosina quinasa del receptor (Riccio et al 1997). Utilizando una estrategia similar pero en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, Segal y colaboradores demostraron que la señalización retrógrada generada en el axón en respuesta a neurotrofinas puede ser distinta a aquella generada en el cuerpo celular; la estimulación de las terminales axonales con NGF promueve la activación de CREB en el núcleo y la sobrevida neuronal a través de un mecanismo que depende sólo de la activación de la MAP quinasa ERK5, en cambio la

respuesta a NGF en el cuerpo celular puede activar tanto a ERK1/2 como a ERK5, demostrando que el lugar de la acción de las neurotrofinas confiere una nueva forma de regulación de la respuesta (Watson et al 2001).

En estudios realizados en neuronas del SNC, utilizando neuronas corticales de ratón, se halló evidencia que sugiere el requerimiento del tráfico endocítico del receptor TrkB para regular la activación del factor de transcripción CREB y la morfología neuronal (Zhou et al 2012). En esta investigación, se identificó a la proteína snapin como un adaptador que asocia a endosomas de señalización TrkB positivos con el motor molecular dineína. Además mediante experimentos de pérdida de función, los autores mostraron que snapin es requerido para la arborización dendrítica inducida por BDNF en neuronas corticales. Si bien esta investigación no demuestra directamente la participación de un endosoma de señalización en los efectos inducidos por BDNF, aporta en la identificación de nuevos elementos requeridos para el transporte retrógrado de la señal BDNF/TrkB. Por otro lado, pone de manifiesto la carencia de estudios realizados en el SNC que brinden mayor información de los mecanismos moleculares requeridos para conducir la señal neurotrófica hasta el núcleo.

#### 1.7- Rab GTPasas y su papel en endocitosis y señalización.

Dado que el tráfico intracelular de receptores de neurotrofinas regula su señalización, un foco emergente de estudio ha sido establecer la relación entre la señalización neurotrófica y la actividad de la GTPasas monoméricas Rabs (Cosker & Segal 2014). Estas proteínas son parte de la súper-familia de GTPasas Ras, y se caracterizan por regular el tráfico vesicular, la fusión de vesículas y el tráfico endocítico de los receptores de transmembrana (Stenmark 2009, Zerial & McBride 2001). Además, regulan la

asociación de vesículas con motores moleculares a lo largo de microtúbulos y/o filamentos de actina (Kapitein & Hoogenraad 2011). Cada Rab GTPasa cicla entre una conformación unida a GDP (inactiva) y una conformación unida a GTP (activa) en la que es capaz de unir a efectores específicos (Stenmark 2009). La fusión de vesículas al endosoma temprano (o de destinación) está regulado por Rab5, el tráfico a lo largo de la ruta degradativa (endosoma tardío y lisosoma) está regulada por Rab7 y el reciclaje de receptores de membrana está regulado por Rab11 (Bucci et al 2010, Park et al 2004, Schlierf et al 2000, Stenmark 2009, Ullrich et al 1996, Wang et al 2008, Zerial & McBride 2001).

Investigaciones recientes muestran que la actividad de las Rabs es importante en el correcto desarrollo y funcionamiento del SNC: Rab 5, 7 y 11 participan en procesos que regulan la formación de las distintas capas de la corteza cerebral (Kawauchi et al 2010) y la expresión tanto de mutantes dominante negativo y constitutivamente activo de Rab11 en embriones de *Drosophila melanogaster* producen una desorganización y pérdida de la dirección de crecimiento de los axones (Bhuin & Roy 2009). Además, se ha comprobado que la pérdida de función de Rab5 produce una disminución de las ramificaciones dendríticas en neuronas sensoriales de este organismo (Satoh et al 2008).

Existe evidencia que demuestra una relación entre la señalización neurotrófica y la ruta endocítica a través del endosoma temprano-tardío. Un aumento de la actividad de Rab5 y Rab7 aumenta la degradación de TrkA, disminuyendo la señal neurotrófica. Por otro lado, se ha mostrado en células PC12, que TrkA en endosomas regula negativamente la actividad de Rab5, lo que produce una activación sostenida de las ERK1/2 y neuritogénesis (Liu et al 2007a, Saxena et al 2005). En motoneuronas, se mostró que las Rabs regulan el transporte retrógrado de TrkB y p75. Luego de ser endocitados, estos receptores se encontraron en vesículas positivas para Rab5, este paso resultó necesario para la destinación y transporte retrógrado de vesículas positivas para TrkB, p75 y Rab7

(Deinhardt et al 2006). Esta evidencia sugiere que Rab5 y Rab7 podrían actuar como reguladores clave del transporte retrógrado de la señal neurotrófica.

En el caso de TrkB, estudios recientes vinculan al tráfico a través del endosoma temprano como regulador de la señalización inducida por BDNF. Utilizando un modelo de neuronas hipocampales en cultivo, Fu y colaboradores (Fu et al 2011), demostraron que la proteína transmembrana retrolinkin puede regular el tráfico y la señalización BDNF/TrkB a través de la interacción con la proteína endophilin A1. Retrolinkin ha sido descrita como una proteína reguladora del tráfico retrógrado axonal (Liu et al 2007b) y endophilin A1 ha sido vinculada a la regulación de la endocitosis mediada por clatrina de receptores tirosina quinasa (Kjaerulff et al 2011). En la investigación llevada a cabo por el grupo de Liu, los autores demostraron el requerimiento tanto de retrolinkin como endophilin A1 para producir la activación sostenida de ERK1/2 y el crecimiento dendrítico inducido por la estimulación con BDNF (Fu et al 2011). Además, en este estudio se mostró que TrkB luego de su internalización se encuentra en endosomas tempranos positivos para la proteína APPL1, que es un efector de la GTPasa Rab5, lo cual sugiere el requerimiento del tráfico del receptor TrkB a través del endosoma temprano en la activación de vías de señalización inducidas por BDNF. Este endosoma temprano conteniendo APPL1 es requerido para conducir la señalización activada por EGF al núcleo en un modelo experimental utilizando líneas celulares (Miaczynska et al 2004). Además, APPL1 interactúa con TrkA, regulando su tráfico y la señalización ERK1/2 y Akt inducida por NGF para promover crecimiento de neuritas (Lin et al 2006, Varsano et al 2006).

Otro proceso endocítico involucrado en la regulación de la señalización neurotrófica es el tráfico a través de la ruta de reciclaje. En el año 2005, Lee y colaboradores demostraron utilizando neuronas corticales en cultivo que tanto los receptores TrkA como TrkB pueden reciclar (Chen et al 2005b). Entre los dos receptores,
TrkA es conducido de manera más eficiente a la ruta de reciclaje respecto a TrkB, debido a que posee una secuencia señal en la región juxtamembrana del receptor. Interesantemente, esta diferencia le permite al receptor TrkA mantener de manera sostenida la señalización PI3K/Akt en respuesta a la estimulación con NGF, aumentando la sobrevida celular en células PC12. Si bien TrkB carece de una señal específica para producir su reciclaje como el identificado en TrkA, el receptor es reciclado a la membrana plasmática en neuronas hipocampales y células PC12 (Chen et al 2005b). Este reciclaje puede ser regulado por la proteína Hrs, que regula de manera específica el reciclaje del receptor completo (denominado también TrkB.FL) y no la versión truncada (denominada TrkB.T1), la cual es expresada en neuronas y que carece de la porción intracelular que presenta actividad tirosina quinasa (Huang et al 2009). En línea con lo hallado para el receptor TrkA, el reciclaje del receptor TrkB dependiente de Hrs es requerido para mantener la activación sostenida de ERK1/2. La regulación de la señalización neurotrófica a través de la ruta de reciclaje puede tener efectos directos en la morfología neuronal. Por ejemplo, Kuruvilla y colaboradores utilizando cultivos neuronales compartimentalizados, mostraron que Rab11 (regulador de la ruta de reciclaje) es capaz de regular la destinación del receptor TrkA hacia el axón por medio de transcitosis, lo cual sería un mecanismo para aumentar la sensibilidad a NGF en neuronas simpáticas (Ascano et al 2009). Además, los autores demostraron que la alteración de la ruta de reciclaje regulada por Rab11 disminuyó el crecimiento axonal en respuesta a NGF. Al comienzo de la presente tesis, estudios realizados en nuestro laboratorio nos indicaron el requerimiento de la actividad de Rab11 en la arborización dendrítica inducida por BDNF en neuronas hipocampales (Lazo et al 2013). A su vez, demostramos una relación recíproca entre la señalización BDNF/TrkB y Rab11, dado que la estimulación con la neurotrofina puede aumentar la actividad de Rab11, tanto en dendritas como en el cuerpo celular de las neuronas. Investigaciones

posteriores, han identificado que Rab11 es requerida para distintos efectos fisiológicos del receptor TrkB (Huang et al 2013, Song et al 2015, Sui et al 2015).

Por otro lado, si bien existe evidencia que vincula a las GTPasas Rabs como reguladores del transporte de la señal neurotrófica generada en lugares distales de la neurona (Deinhardt et al 2006), esta evidencia es escasa y principalmente obtenida en modelos que utilizan neuronas del SNP, aunque existen algunos hallazgos obtenidos en neuronas del SNC. Por ejemplo, es conocido que en la enfermedad de Huntington (caracterizada por la mutación de la proteína Huntingtina, Htt) existe una disminución en el transporte retrógrado de vesículas positivas para BDNF, el cual depende del motor molecular dineína, y también se ha observado que Htt regula el reciclaje de membrana mediado por Rab11 (Gauthier et al 2004, Li et al 2009, Li et al 2010). Nueva evidencia demostró, utilizando neuronas del cuerpo estriado provenientes de un modelo murino de la enfermedad, la reducción tanto del transporte del complejo BDNF/TrkB como del aumento en la expresión del gen de respuesta temprana *c-Fos* dependiente de la señalización a través de ERK1/2 (Liot et al 2013). Este resultado destaca la importancia del transporte de la señalización BDNF/TrkB desde dendritas distales o axones la cual es requerida para promover cambios en la expresión de genes. En apoyo a esta idea, Jaffrey y colaboradores aportaron evidencias que sugieren el transporte de señales generadas por BDNF en las dendritas y que convergerían hasta el núcleo (Cohen et al 2011). En esta investigación, los autores demostraron, utilizando cultivos compartimentalizados, que la estimulación con BDNF en dendritas y no en axones de neuronas corticales puede promover la expresión de los genes de respuesta temprana Arc y c-Fos a través de la activación de TrkB y la ruta ERK1/2. Mayores detalles del mecanismo de transporte de la señal y cómo este puede influir en la localización y duración hasta el momento se desconocen. Otro punto desconocido hasta el momento es la función que pueden desempeñar las GTPasas Rabs en estos procesos, escenario que es plausible dada la acción reguladora que ejercen estas proteínas sobre el tráfico de vesículas. Un ejemplo de ello, son los resultados que muestran que mutaciones en la GTPasa Rab7 causantes de la enfermedad Charcot-Marie-Tooth tipo 2B (neuropatía periférica) producen una alteración en la señalización TrkA desde endosomas, encontrándose aumentada la señalización mediada por ERK1/2 sin modificar la activación de Akt en neuronas sensoriales (BasuRay et al 2010). En esta investigación, los autores mostraron que la expresión de mutantes de Rab7 produjo una alteración en la localización de ERK1/2 activado, que predominantemente se mantuvo en el citosol sin transportarse al núcleo, sugiriendo que las GTPasas Rabs podrían además de regular los niveles de activación de mediadores de señalización, controlar su localización.

Por otro lado, la regulación transcripcional y traduccional de las GTPasas Rabs ha sido un aspecto poco estudiado de estas proteínas. De los estudios existentes en la literatura, hay evidencia que indica que los niveles de algunas Rabs o sus efectores pueden ser modificados en respuesta a diversos estímulos. Por ejemplo, utilizando como modelo experimental líneas celulares, se encontró un aumento en los niveles de Rabaptin-5 y Rab11-FIP4, efectores de Rab5 y Rab11 respectivamente (Hu et al 2015, Wang et al 2009). En estos estudios se halló que los niveles de estos efectores se ven incrementados por la hipoxia y son mediados por el factor de transcripción HIF (de *Hypoxia Inducible Factor*). Además, los niveles de la GTPasa Rab7 pueden ser regulados por los factores de transcripción MYC y SOX10 (Alonso-Curbelo et al 2014), sugiriendo un papel regulatorio en los niveles de Rabs mediante la activación de factores de transcripción. En el caso de CREB, investigaciones recientes han mostrado que la expresión de *Rab25 y Rab27a* puede ser regulada por CREB (Rolewska et al 2014, Xue et al 2011). Si bien existen sitios de unión para CREB en los promotores de *Rab5 y Rab11* (denominadas CRE, de *cAMP response element*), este sólo hecho no implica que CREB regule directamente la

transcripción de estos genes (Zhang et al 2005). Sin embargo, utilizando un modelo de líneas celulares, se mostró que la activación de la vía cAMP/PKA por acidosis promovió la activación de CREB, que reguló la transcripción de *Rab11b* (Oehlke et al 2012). Es conocido que la neurotrofina BDNF puede regular los niveles de Rab3A (Thakker-Varia et al 2001), pero aún no ha sido estudiada una probable regulación transcripcional o traduccional de las GTPasas Rab5 y Rab11 por BDNF.



Figura 2. Representación esquemática de la propuesta.

En su conjunto, las evidencias presentadas sugieren que la endocitosis y tráfico del receptor TrkB a través de la ruta compuesta por el endosoma temprano (Rab5 positivo) y luego a través del endosoma de reciclaje (Rab11 positivo) promueven la activación sostenida (mayor a 1 hora, por ejemplo) de mediadores de la señalización de BDNF/TrkB

(como ERK1/2 y Akt). La activación sostenida de ERK1/2 es necesaria para su translocación al núcleo, en donde induce la activación de factores de transcripción como CREB. A su vez, la activación de CREB induce cambios en la expresión de genes necesarios para aumentar la arborización dendrítica, entre los que se pueden encontrar genes de respuesta temprana como Arc y c-Fos, además de otros de respuesta más tardía como cypin (72 horas), Rab5 y Rab11 (aún no determinados) (Figura 2).

## 1.8. Hipótesis

Las GTPasas Rab5 y Rab11 son requeridas para la activación sostenida de la señalización neurotrófica y los posteriores cambios transcripcionales y morfológicos regulados por CREB e inducidos por BDNF.

### 1.9. Objetivos

## **Objetivo General**

Determinar si la actividad de las GTPasas Rab5 y Rab11 es requerida para la activación sostenida de TrkB y los cambios morfológicos y de expresión de genes regulados por CREB en respuesta a la estimulación con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo.

## **Objetivos Específicos**

 Determinar si las GTPasas Rab5 y Rab11 son requeridas para aumentar la arborización dendrítica inducida por la estimulación con BDNF.

**2.**- Establecer si la actividad de Rabs 5 y Rab11 es necesaria para la activación del factor de transcripción CREB en respuesta a la estimulación con BDNF.

3.- Determinar si la estimulación con BDNF puede modificar los niveles de Rab5a y Rab11a.

**4.**- Evaluar si Rab11 favorece los cambios en la expresión de genes inducidos por la estimulación con BDNF.

#### **2. MATERIALES**

Para la preparación de cultivos primarios de hipocampo de rata, se utilizaron ratas hembra Sprague-Dawley de 18 días de preñez mantenidas en ambiente de temperatura y luz controlada (20-22 °C y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas) en el vivero de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los métodos y procedimientos que incluyen el uso de animales en la presente tesis fueron aprobados por el comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

En la preparación y tratamientos de cultivos celulares se utilizó medio mínimo esencial (MEM, 11700-077), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, 12800-017), solución salina de Hanks (HBSS, 14065-056), Neurobasal (21103-049), OptiMEM (11058-021), Lipofectamina-2000 (11668-027), glutamina, suplemento B27 (17504-044), suero de caballo (HS, 16050-122), antibiótico/antimicótico (15240-112), penicilina/estreptomicina (15140-148) y tripsina (15090-046) adquiridas en Invitrogen (Life Technologies, CA, EEUU). El suero fetal bovino (FBS) fue adquirido en Hyclone (SH30071.03, GE Healthcare Life Science). La poli-L-lisina (P2636), citosina-arabinósido y actinomicina D (A1410) fueron adquiridas en Sigma (MO, EEUU). La neurotrofina BDNF fue adquirida en Alomone (B-250, Jerusalén, Israel) y la proteína recombinante TrkB-Fc (proteína soluble, que une a BDNF en el medio extracelular) fue adquirida desde R&D Systems (688TK, MN, EEUU). El inhibidor PD98059 (PRV1191) fue adquirido en Promega. El inhibidor K252a (99533-80-9) fue adquirido en Santa Cruz Biotechnology. Los inhibidores cicloheximida (239763), LY294002 (440202) y rapamicina (553210) fueron adquiridos en Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

En la realización de soluciones utilizadas en inmunofluorescencia se utilizaron los reactivos glucosa, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

paraformaldehído y glicerol. Estos fueron adquiridos en Merck. La glicina, Mowiol 4-88 (475904), saponina (S4521), HEPES, Igepal y Tritón X-100 fueron adquiridos en Sigma. La albúmina sérica de bovino (BSA) libre de inmunoglobulinas se adquirió desde Jackson Immunoresearch Laboratories (001-000-161, PA, EEUU) y la mezcla de inhibidores de fosfatasas fue adquirida desde Pierce (88667, IL, EEUU).

Para la preparación de geles se utilizó acrilamida/bisacrilamida (1610154) y membranas de nitrocelulosa (162-0115) de BioRad, el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS, L4509), Tween-20 (P1379),  $\beta$ -mercaptoetanol (M6250) y la tinción Ponceau S (P7170) fueron adquiridos en Sigma. La mezcla de inhibidores de proteasas fue adquirida en Roche (11836153001).

Para las técnicas de inmunofluorescencia y Western blot, se utilizaron los siguientes anticuerpos desarrollados en conejo anti-Rab5 (ab18211, Abcam) y conejo anti-Rab11 (Zymed, 71-5300, Invitrogen, CA, EEUU). Los anticuerpos desarrollados en ratón anti-β-III tubulina (T8578), conejo anti-pTrkB (pTyr515, SAB4300255) y ratón anti-flag (M1, F3040) fueron adquiridos en Sigma. Los anticuerpos desarrollados en ratón anti-MAP2 fueron adquiridos en EMD Millipore (clon AP-20, MAB3418, MA, EEUU). Los anticuerpos desarrollados en conejo anti-pCREB (pSer-133, 87G3), ratón anti-CREB (86B10), conejo anti-pTrkA (pTyr-490, 9141), conejo anti-pAkt (pSer-473, 9271), conejo anti-pERK1/2 (pThr202/pThr204, 9101) y conejo anti-ERK1/2 (9102) fueron adquiridos en Cell Signaling Technology. Los anticuerpos desarrollados en conejo anti-Akt fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology (H-136). Los anticuerpos anti-TrkB (dirigidos al dominio intracelular del receptor) fueron desarrollados en conejos y amablemente donados por el Laboratorio de la Dra. Úrsula Wyneken (Universidad de Los Andes-Chile). Los

anticuerpos secundarios para Western blot conjugados a peroxidasa de rábano fueron adquiridos en BioRad (anticuerpos anti-conejo código 170-6515, anticuerpos anti-ratón código 170-6516, CA, EEUU).

Para realizar tinciones en células en cultivo, se utilizó la proteína transferrina conjugada al fluoróforo Alexa-647 (T23366), la tinción nuclear Hoechst 33258 (H1398) y los anticuerpos secundarios desarrollados en burro anti-ratón y anti-conejo conjugados a fluoróforos Alexa-488, Alexa-555 y Alexa-647 fueron adquiridos en Molecular Probes (Life Technologies, CA, EEUU). Para el marcaje de anticuerpos se utilizó BioGel P-30 (150-4150) y la columna para separación Bio-spin (732-6008) adquiridas desde Bio-Rad.

Para realizar la expresión de proteínas de fusión y versiones mutantes y nativas de proteínas, se utilizaron vectores plasmidiales y virales que se describen a continuación. El plasmidio para expresión del receptor TrkB-flag fue donado por el Dr. Francis Lee (Weill Cornell University, NY, EEUU), la versión nativa de Rab5 fusionada a EGFP (Rab5-EGFP) fue donada por el Dr. Victor Faúndez (Emory University, GA, EEUU), la versión dominante negativa (Rab11DN) y constitutivamente activa de Rab11 fusionada a EGFP fueron donadas por la Dra. Rejji Kuruvilla (John Hopkins University, MD, EE.UU), la versión mutante dominante negativa de CREB fusionada al epítope flag (CREBS133A) fue adquirida desde Addgene (*plasmid #* 22969)

Las partículas adenovirales que manejan la expresión del mutante dominante negativo de Rab5 fusionadas a EGFP (Rab5DN), fueron donados por el Dr. Victor Faúndez (Emory University, GA, EEUU), las partículas adenovirales que manejan la expresión de las versiones mutante dominante negativo y constitutivamente activo fusionadas a EGFP (Rab11DN y Rab11CA, respectivamente) fueron donados por la Dra. Rejji Kuruvilla (John Hopkins University, MD, EE.UU). Todos los adenovirus se amplificaron en nuestro laboratorio y posteriormente fueron purificados utilizando el Adenovirus Mini Purification Virakit<sup>TM</sup> (Virapur, CA, EEUU).

Para la comprobación de infecciones y transfecciones, se utilizó de manera rutinaria un microscopio de fluorescencia Olympus IX71 (Tokyo, Japón) equipado con cámara refrigerada QICAM fast (QImaging, BC, Canada) y software de captura Image-pro Express versión 5.1.0.12 (Media Cybernetics, Ma, EEUU). Para realizar estudios de colocalización y análisis en experimentos de inmunoendocitosis, se capturaron imágenes en sistema de microscopía confocal Olympus, que incluye un módulo de tres láseres conectado a un microscopio invertido (Olympus LSM FluoView 1000) y además se utilizó sistema de microscopía confocal Nikon que incluye un módulo de 4 láseres conectado a un microscopio invertido (SPECTRAL NIKON modelo ECLIPSE C2).

Para el análisis de imágenes se utilizó el software del NIH, ImageJ, versión 1.48v (disponible en http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html). Para el análisis de Sholl, la plataforma se cargó con el *plugin* "Sholl's Analysis", desarrollado por el laboratorio del Dr. Anirvan Ghosh (UCSD, CA, EEUU). Para el análisis estadístico se usó el software Prism, versión 5.01 (GraphPad Software, CA, EEUU).

## 3. MÉTODOS.

## 3.1. Cultivo primario de neuronas hipocampales de rata.

Para la preparación de cultivos primarios de hipocampo de rata (Kaech & Banker 2006), se obtuvieron embriones desde ratas Sprague-Dawley preñadas, las cuales fueron sacrificadas en cámara de CO<sub>2</sub> al 5% durante 15 minutos. De cada rata preñada, se obtuvieron entre 6 a 10 embriones que fueron decapitados en condiciones estériles bajo campana de flujo horizontal, se extrajeron los cerebros y se depositaron en placas petri con HBSS frío (sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> con 7,5% de NaHCO<sub>3</sub>) más antibióticos/antimicótico (100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina, 0,25 µg/ml anfotericina B). Se extrajeron las meninges y se disectó el hipocampo de cada hemisferio cerebral, que fue sometido a digestión enzimática con tripsina 0,25% disuelta en HBSS por 15 minutos a 37°C. Se eliminó la tripsina y el tejido se lavó 10 veces con HBSS frío, para luego ser mantenido en medio MEM/HS, que contenía 10% HS, 20% de glucosa, 2 mM de glutamina, antibióticos y antimicóticos disueltos en MEM. Los hipocampos fueron disociados pipeteando repetidamente (entre 5 a 10 veces) el tejido en MEM/HS a través de pipetas Pasteur cuyas puntas fueron reducidas progresivamente de diámetro por la llama de un mechero. Una vez obtenidas las células, se sembraron en medio MEM/HS (7000 células por cm<sup>2</sup> para experimentos de análisis morfológico y 15000 células por cm<sup>2</sup> para experimentos de biología molecular y bioquímica de proteínas) durante 4 horas para permitir la adhesión de las neuronas, y luego se cambió el medio por Neurobasal/B27 que contenía 2% de suplemento B27, 1 mM de glutamina y penicilina/estreptomicina disueltos en Neurobasal. Se realizó el cambio de 1/3 del medio de cultivo de cada placa por Neurobasal/B27 fresco cada 2 días. Al tercer día de cultivo, los medios de cultivo fueron suplementados con citosina arabinosa (0,5  $\mu$ M) para evitar la proliferación de células no neuronales. Este medio fue mantenido hasta que las neuronas fueron sometidas a tratamientos y estímulos entre los 7 y 9 DIV, según correspondió a cada experimento.

Para sembrar las neuronas, placas de Petri de 60 mm de diámetro (utilizadas para experimentos de biología molecular y bioquímica de proteínas) o cubreobjetos de 15 mm de diámetro (utilizados en inmunofluorescencia) fueron previamente tratados con el sustrato de adhesión poli-L-lisina. Los cubreobjetos fueron anteriormente tratados por 48 horas en ácido clorhídrico al 65%, lavados y autoclavados. Luego, tanto las placas de Petri como los cubreobjetos se incubaron por 24 horas con poli-L-lisina (1 mg/mL, disuelta en buffer borato 0,1% pH 8,5, conteniendo ácido bórico/tetraborato de Na<sup>+</sup>) a temperatura ambiente. En el caso de los cubreobjetos, la poli-L-lisina se utilizó una sola vez; en el caso de las placas de Petri, la poli-L-lisina se recicló y reutilizó por un máximo de tres veces.

# 3.2. Cultivo de células HEK293, producción de partículas adenovirales e infección de neuronas hipocampales.

Para llevar a cabo la amplificación de los diversos vectores adenovirales, se utilizaron células HEK293. Las células fueron cultivadas e infectadas en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 1 mM de glutamina más antibióticos/antimicótico (100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina, 0,25 µg/ml anfotericina B). Una vez alcanzado un efecto citopático completo debido a la infección (evidenciado por la pérdida de adhesión a las placas de cultivo), las células fueron centrifugadas y luego resuspendidas en medio de cultivo. Luego, las células fueron lisadas y se colectaron los virus, que fueron purificados mediante el sistema Adenovirus Mini Purification Virakit<sup>™</sup> (Virapur, CA, EEUU) siguiendo los protocolos del fabricante. Posteriormente se realizó la titulación para cada

preparación de virus utilizando células HEK293 que luego fue comprobada en neuronas hipocampales. El trabajo con los vectores adenovirales se realizó bajo condiciones de bioseguridad nivel 2, utilizando gabinete Labculture Class II, Type A2 (ESCO, Singapur).

Para estudiar la participación de las GTPasas Rab5 y Rab11, se realizó la expresión de estas GTPasas tanto en sus versiones nativas como mutantes fusionadas a EGFP además de la expresión de EGFP utilizada como control, mediante la infección con partículas adenovirales. Para ello, se utilizó un título viral equivalente al requerido para infectar al menos el 80% de las neuronas del cultivo (Figura 3). Este título viral se diluyó en medio Neurobasal/B27 y se agregó a las neuronas que fueron mantenidas durante 48 horas hasta realizar los experimentos (para el caso del mutante Rab5DN, una expresión al 100% de las células conduce a una disminución significativa en la sobrevida neuronal).



**Figura 3. Niveles de expresión de EGFP y de mutantes dominantes negativos (DN) de Rab5 y Rab11 luego de infección con adenovirus.** Imágenes representativas que muestran los niveles de expresión de EGFP y de los mutantes dominante negativo de Rab5 (Rab5DN) y de Rab11 (Rab11DN) en células vivas, logrados por la infección de neuronas con partículas adenovirales. En el panel izquierdo, se muestra la imagen correspondiente a EGFP y los respectivos mutantes, en el panel central se muestra la imagen de campo claro y en el panel derecho se muestra la superposición de las imágenes.

### 3.3. Marcaje de anticuerpos.

Para los ensayos de inmunoendocitosis del receptor TrkB, se realizó el marcaje o conjugación de anticuerpos dirigidos al epítope flag al fluoróforo Alexa-594 (A20004, Life Technologies, CA, EEUU). Para este procedimiento, se realizó la hidratación por 24 horas en solución PBS de BioGel P-30. Transcurrido este período, se transfirió el gel hidratado a un matraz kitasato con el fin de sacar la mayor cantidad de aire posible mediante succión con bomba de vacío. Se mantuvo esta succión por 10 minutos, con movimientos circulares ocasionales. Luego se retiró el sobrenadante cuidadosamente sin perturbar el gel y nuevamente se agregó aproximadamente la misma cantidad de PBS. Este procedimiento se repitió 3 veces y finalmente se depositó 1,5 mL de gel en columna Bio-spin que posteriormente fue utilizado para la purificación del anticuerpo conjugado.

Para la conjugación del anticuerpo anti-flag al fluoróforo Alexa-594, se tomó el volumen necesario de anticuerpo para tener una concentración final de 2,2 mg/mL de proteínas que fue incubada en solución que contenía el fluoróforo Alexa-594 (1 mg/mL) en una solución bicarbonato de sodio 100 mM pH 8,3 durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Finalizada esta incubación se depositó la solución en la columna Bio-spin conteniendo el gel previamente preparado que permite la purificación de moléculas entre 2500 a 40000 Dalton. La columna fue centrifugada por 10 minutos a 1100 x *g* y se colectó la solución en un tubo limpio. Finalmente se cuantificó la concentración de proteínas en la solución colectada. La dilución de anticuerpo a utilizar se estableció realizando una inmunoendocitosis en neuronas hipocampales vivas transfectadas con receptores TrkB-flag, sumado a una inmunofluorescencia en éstas mismas células una vez ya fijadas.

#### 3.4. Extracción de proteínas y electroforésis en geles de poliacrilamida-SDS.

Para la obtención de proteínas desde los cultivos neuronales, las células se lavaron con PBS tibio y posteriormente fueron lisadas en 60  $\mu$ L de solución de lisis conteniendo inhibidor de proteasas y fosfatasas (la solución de lisis y el tratamiento posterior de las muestras siempre se realizó en hielo). La solución de lisis contenía 150mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 2 mM de EDTA, 0,1% de SDS y 1% de Tritón X-100, suplementado con inhibidor de fosfatasas y de proteasas. El inhibidor de fosfatasas (88667, Pierce, Thermo Scientific) contenía 50 mM de fluoruro de Na<sup>+</sup>, 10 mM de β-glicerofosfato, 10 mM de pirofosfato de Na<sup>+</sup> y 1 mM de ortovanadato de Na<sup>+</sup>.

El lisado fue sometido a centrifugación (22000 rpm x 10 minutos a 4° C), se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la cantidad total de proteínas, mediante un ensayo colorimétrico con reactivos adquiridos desde BioRad (DC Protein Assay, reactivo A 500-0113, reactivo B 500-0114, reactivo S 500-0115) y utilizando una curva de concentraciones conocidas de BSA. Las muestras se mezclaron con solución de carga que contenía 0,25 M de Tris-HCl, pH 6,8, 10 % de glicerol, 5 %, de β-mercaptoetanol, 0,5 % de SDS y azul de bromofenol. Luego, se incubaron en placa calefactora durante 5 minutos a 95°C. Geles de poliacrilamida-SDS se prepararon a partir de soluciones madre al 30 % de acrilamida y al 0,8 % de bis-acrilamida. El gel separador o resolutivo y el gel concentrador, obtuvieron disolviendo el volumen de solución acrilamida-bisacrilamida se correspondiente en una solución conteniendo 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % de SDS y 0,125 M de Tris-HCl pH 6,8 y 0,1 % de SDS, respectivamente. Para identificar cambios en los niveles de GTPasas Rabs, se utilizaron geles al 12% de concentración. En el resto de los experimentos, todos los geles utilizados se prepararon al 10% de concentración. Las muestras se separaron mediante electroforésis realizada a 110 mV durante aproximadamente 4 horas.

## 3.5. Western blot.

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida-SDS fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 350 mA por 90 minutos a 4° C. Una vez finalizado este período, se verificó la correcta transferencia de las proteínas mediante tinción con Ponceau S al 0,1% en ácido acético al 5%. Luego de ser desteñida del colorante Ponceau S, la membrana fue incubada con TBS-Tween (10 mM de Tris-HCl, pH 8, 150 mM de NaCl, 0,1 % de Tween-20) y BSA (3 %) por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos cada vez y fueron incubadas con los respectivos anticuerpos en TBS-Tween más BSA al 5% durante toda la noche a 4°C. Las diluciones de los anticuerpos primarios utilizados para Western blots fueron las siguientes: anti-Rab5 (1:1000), anti-Rab11 (1:500), anti-β-III tubulina (1:1000), anti-pTrkB (1:1000), anti-pCREB (1:500), anti-CREB (1:1000), anti-pTrkA (1:1000), anti-pAkt (1:1000), antipERK1/2 (1:1000), anti-ERK1/2 (1:1000), anti-Akt (1:1000) y anti-TrkB (1:1000). Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 6 veces por 10 minutos cada vez e incubadas con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano en TBS-Tween más BSA (3%) por 1 hora a temperatura ambiente en un balancín. Los anticuerpos secundarios desarrollados en cabra anti-conejo y anti-ratón y conjugados a peroxidasa de rábano para reconocer los anticuerpos primarios anteriormente descritos se utilizaron a una dilución 1:5000. Finalmente, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 6 veces por 10 minutos cada vez. Para revelar las bandas se utilizaron los reactivos de detección por quimioluminiscencia "SuperSignal West Femto Substrate" y "Super *Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate"* (34095 y 34080, respectivamente, Thermo Scientific, IL, EEUU).

## 3.6. Transfección de neuronas con plasmidios.

Neuronas hipocampales fueron transfectadas con mutante dominante negativo de CREB (CREBS133A), el receptor recombinante TrkB fusionado al epítope flag (TrkBflag), Rab5 fusionada a EGFP, el mutante dominante negativo de Rab5 fusionado a EGFP (Rab5DN) y EGFP mediante el uso de Lipofectamina-2000, siguiendo básicamente las recomendaciones del fabricante pero con pequeñas modificaciones. Para cada pocillo de 15 mm de diámetro, las neuronas fueron deprivadas de medio Neurobasal/B27 (el cual es reservado) y se incubaron con 500 µL de OptiMEM durante 30 minutos a 37° C. Durante esta incubación, se efectuó la mezcla para cada placa de 49 µL de OptiMEM más 1 µL de Lipofectamina-2000 y la mezcla OptiMEM-DNA (0,5 µg de cada plasmidio, en volumen final de 50 µL) que se incubó por 5 minutos de manera separada y luego se unieron ambas preparaciones incubándolas durante 25 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó la preparación a cada pocillo y se mantuvo durante 2 horas a 37° C en estufa de cultivo. Finalmente, se retiró la solución de transfección, se agregó el medio Neurobasal/B27 previamente reservado (al cual se le añadió un 30% de medio Neurobasal/B27 fresco) y se mantuvieron las neuronas en estufa de cultivo a 37°C durante 48 horas hasta la realización de los experimentos. Por medio de esta metodología se logró un rendimiento de transfección del 20%.

### 3.7. Inmunofluorescencia.

Al final de cada tratamiento o procedimiento experimental, las neuronas mantenidas en cubreobjetos se lavaron con PBS (en el caso de detección de fosfoproteínas, desde este lavado en adelante el procedimiento se realizó en presencia de inhibidores de fosfatasas) y se fijaron a temperatura ambiente por 20 minutos en paraformaldehído (PFA) al 3% con sacarosa al 4% disueltos en PBS. Después de 3 lavados con PBS, las neuronas se incubaron con glicina 150 mM disuelta en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar en PBS, la células fueron permeabilizadas y bloqueadas simultáneamente con Tritón X-100 al 0,5% y BSA al 4% disueltos en PBS (para visualizar proteínas de localización citosólica) durante una hora.

A continuación, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios, disueltos en solución que contenía BSA al 2% y Tritón X-100 al 0,1% disueltos en PBS suplementado con 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> y 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (para anticuerpos dirigidos a proteínas localizadas en el núcleo) o BSA al 3% y saponina al 0,05% disueltos en PBS suplementado con 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> y 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (para anticuerpos dirigidos a proteínas citosólicas).

Los anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones fueron los siguientes: anti-MAP2 (1:200), anti-Rab11 (1:200), anti-GFAP (1:400), anti-Flag (1:400), anti-pCREB (1:750), anti-CREB (1:400) y anti-pERK1/2 (1:400).

Tras 3 lavados en PBS, se incubaron las células con anticuerpos secundarios fluorescentes (anticuerpos desarrollados en burro anti-conejo y anti-ratón conjugados al fluoróforo Alexa-488, Alexa-555 ó Alexa-647) disueltos en solución conteniendo BSA al

2% y Tritón X-100 al 0,1% disueltos en PBS suplementado con 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> y 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (para proteínas localizadas en el núcleo) o BSA al 3% y saponina al 0,05% en PBS suplementado con 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> y 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (para proteínas citosólicas). A continuación las muestras fueron lavadas 5 veces en PBS y luego una vez en agua tridestilada para finalmente ser montadas sobre portaobjetos conteniendo 15  $\mu$ L de Mowiol 4-88 (medio de montaje para cubreobjetos), secadas al aire y selladas.

### 3.8. Análisis de Microscopía.

## 3.8.1. Protocolo de análisis de morfología neuronal.

Para el análisis morfológico de la región somato-dendrítica de neuronas hipocampales en condiciones control o luego de la estimulación con BDNF, se adquirieron imágenes en microscopio confocal tomando capturas en el eje *z* con una separación de 0,5  $\mu$ m. Las imágenes fueron tomadas con una resolución de 1024x1024 pixeles y una profundidad de 8 bits. De ésta manera, se obtuvieron imágenes de fluorescencia tanto de las diversas proteínas exógenas expresadas en las neuronas utilizadas en la presente tesis (que están fusionadas a EGFP), como de la proteína MAP2, con el fin de identificar con claridad la extensión y ramificación de dendritas en la neurona. Una vez adquiridas las imágenes, fueron integradas utilizando el programa ImageJ en una imagen final considerando la suma de cada pixel. La imagen integrada correspondiente a MAP2 para cada tratamiento es transformada a una imagen binaria, que es sometida a análisis de Sholl. Este análisis consta en realizar una serie de círculos concéntricos desde el centro de la neurona (en nuestro estudio, se eligió realizar el primer círculo a 10  $\mu$ m desde el centro del cuerpo celular) con una separación determinada (en nuestro estudio de 5  $\mu$ m cada uno) hasta llegar al borde de la imagen (imágenes que abarcan en el eje *x* y el eje *y* una distancia

sobre 200 µm) (Sholl 1953). Al término del análisis, el programa entrega una lista de datos que refleja la cantidad de veces que un círculo intersecta a una dendrita (dado que está marcada para MAP2) en función de la distancia al soma, reflejando el grado de complejidad alcanzado por una neurona. De manera complementaria al análisis de Sholl, se determinaron los puntos de ramificación de cada dendrita, que se realizó contando manualmente para cada dendrita los puntos de ramificación que ésta presentaba. En el caso del análisis de Sholl, se determinaron diferencias significativas entre los grupos experimentales mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, utilizando la prueba de Bonferroni *a posteriori* para comparar pares de datos. En el caso de los puntos de ramificación, se establecieron diferencias significativas entre los grupos experimentales mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

## 3.8.2. Cuantificación de fluorescencia y controles realizados.

Para cada experimento de inmunofluorescencia realizado en esta tesis, se incluyeron controles en que las neuronas no se incubaron con el respectivo anticuerpo primario y además neuronas que no se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario. De ésta manera, en cada grupo experimental se pudo determinar la intensidad de fluorescencia promedio correspondiente a señales inespecíficas y a la autofluorescencia propia de las muestras, que posteriormente es restado de los valores de fluorescencia promedio obtenido en las muestras de interés. Además, estos controles se consideraron para establecer los parámetros de adquisición de imágenes en los microscopios de epifluorescencia y confocales utilizados en esta tesis. Para realizar la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las imágenes obtenidas en los diversos experimentos realizados en esta tesis, tanto por microscopía de epifluorescencia como por microscopía confocal, se procedió de la siguiente manera.

Para determinar el nivel de reciclaje de receptores TrkB-flag y la internalización de receptores TrkB-flag y de transferrina, se obtuvieron imágenes en microscopio confocal tomando capturas en el eje z con una separación de 0,25 µm. Las imágenes fueron tomadas con una resolución de 1024x1024 pixeles y una profundidad de 8 bits. Luego, estas imágenes se integraron considerando la suma de cada pixel. Para analizar estas imágenes, se delineó cada región de la neurona utilizando la imagen obtenida con el filtro que permite visualizar EGFP (488 nm), seleccionando el cuerpo celular completo (excluyendo el núcleo) o seleccionando 5 µm de dos o tres dendritas por cada neurona. Estas selecciones se transfirieron a las imágenes correspondientes a la señal de TrkB-flag. Luego, se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio de estas secciones. A estos valores, se les restaron los valores de intensidad de fluorescencia promedio dado por los valores obtenidos desde neuronas que no fueron tratadas con anticuerpos primarios. Una vez obtenidos estos datos, se normalizaron los valores de fluorescencia respecto al valor obtenido en las neuronas que expresaron EGFP (considerado con el valor de 1). Se establecieron diferencias significativas entre los grupos experimentales mediante la prueba t de Student para comparaciones entre 2 grupos y mediante análisis de ANOVA de 1 vía para comparaciones entre más de dos grupos experimentales.

Para evaluar los niveles endógenos de Rab11a, se obtuvieron imágenes en microscopio confocal tomando capturas en el eje *z* con una separación de 0,5  $\mu$ m. Las imágenes fueron tomadas con una resolución de 1024x1024 pixeles y una profundidad de 8 bits. Luego, estas imágenes se integraron considerando la suma de cada pixel. Para analizar estas imágenes, se delineó cada región de la neurona utilizando la imagen obtenida con el

filtro que permite visualizar EGFP (488 nm), seleccionando el cuerpo celular completo (excluyendo el núcleo) o seleccionando 5  $\mu$ m de dos o tres dendritas por cada neurona. Estas selecciones se transfirieron a las imágenes correspondientes a la señal de Rab11a. Luego, se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio de estas secciones. A estos valores, se les restaron los valores de intensidad de fluorescencia promedio dado por los valores obtenidos desde neuronas que no fueron tratadas con anticuerpos anti-Rab11a. Una vez obtenidos estos datos, se normalizaron los valores de fluorescencia respecto al valor obtenido en las neuronas que expresaron EGFP (considerado con el valor de 1). Se establecieron diferencias significativas entre los grupos experimentales mediante la prueba *t* de Student.

En el experimento en que se evaluaron los niveles de activación de CREB (pCREB), se obtuvieron imágenes en microscopio de fluorescencia tomando imágenes con una resolución de 1024x1024 pixeles y una profundidad de 8 bits. Para analizar estas imágenes, se delineó el núcleo de la neurona utilizando la imagen que correspondía a la tinción nuclear Hoechst 33258 (cuya señal no influyó en los niveles de fluorescencia del fluoróforo Alexa-555, utilizado para identificar a pCREB). Esta selección se transportó a la imagen de pCREB y se determinó la intensidad de fluorescencia promedio y el área medida (que denominaremos F1). Además, se determinaron éstos parámetros en neuronas en que no fueron incubadas con anticuerpo primario (fluorescencia inespecífica dada por el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a fluoróforo Alexa-555, denominada F2). Por lo tanto, el valor de fluorescencia final obtenido corresponde a la resta de F2 al valor F1 (Intensidad de fluorescencia pCREB=F1-F2). Finalmente, los valores de intensidad de fluorescencia de pCREB graficados fueron normalizados respecto a las neuronas no tratadas con BDNF. Se establecieron diferencias significativas entre los grupos experimentales control (sin BDNF) y estimulados con BDNF mediante análisis de varianza

(ANOVA) de una vía, utilizando la prueba de Bonferroni *a posteriori*, y se utilizó la prueba t de Student para comparaciones entre pares de datos provenientes de células tratadas de la misma manera.

Para determinar los niveles de activación de ERK1/2 in situ (pERK1/2), se obtuvieron imágenes en microscopio confocal tomando capturas en el eje z con una separación de  $0.25 \,\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron tomadas con una resolución de  $1024 \times 1024$ pixeles y una profundidad de 8 bits. Luego, estas imágenes se integraron considerando la suma de cada pixel. Para analizar estas imágenes, se delineó cada región de la neurona utilizando la imagen obtenida con el filtro que permite visualizar EGFP o MAP2 (488 nm), delimitando el cuerpo celular completo (excluyendo el núcleo), seleccionando 5 µm de dos o tres dendritas por cada neurona o seleccionando el núcleo de la neurona que correspondió a la señal obtenida con la tinción nuclear Hoechst 33258 (cuya señal no influyó en los niveles de fluorescencia del fluoróforo Alexa-555, utilizado para identificar a pERK1/2). Estas selecciones se transfirieron a las imágenes correspondientes a la señal de pERK1/2. Luego, se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio de las regiones seleccionadas. A estos valores, se les restaron los valores de intensidad de fluorescencia promedio dado por los valores obtenidos desde neuronas que no fueron tratadas con anticuerpos antipERK1/2. Una vez obtenidos estos datos, se normalizaron los valores de fluorescencia respecto al valor obtenido en las neuronas que no fueron estimuladas con BDNF (considerado con el valor de 1). Se establecieron diferencias significativas entre los grupos experimentales control (sin BDNF) y estimulados con BDNF mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía, utilizando la prueba de Bonferroni a posteriori, y se utilizó la prueba t de Student para comparaciones entre pares de datos provenientes de células tratadas de la misma manera.

#### 3.8.3. Cuantificación de co-localización.

Para determinar el nivel de co-localización entre receptores TrkB-flag/Rab5-EGFP y TrkB-flag/Rab11-EGFP en respuesta a la estimulación con BDNF, se adquirieron imágenes utilizando microscopio confocal (Olympus LSM FluoView 1000) de una resolución de 2048x2048, tomando capturas en el eje *z* con una separación de 130 nm. Luego, las imágenes fueron analizadas y procesadas utilizando el programa ImageJ (Bolte & Cordelieres 2006), en que se realizó la deconvolución de las imágenes y luego se determinó el grado de co-localización entre TrkB-flag endocitado y la señal de Rab5-EGFP o Rab11-EGFP, calculando el Índice de co-localización de Manders (M1). Este índice corresponde a un coeficiente de sobreposición entre dos imágenes, adquiriendo un valor igual a 0 (M1=0), si corresponde a imágenes que no se sobreponen y adquiriendo un valor igual a 1 (M1=1), si en las imágenes comparadas existe un 100% de sobreposición. Es importante destacar que el valor "M1", corresponde a la proporción de la señal del canal rojo (para nuestro trabajo, corresponde a TrkB-flag) que coincide con la señal en verde (Rab5-EGFP o Rab11-EGFP). Se establecieron diferencias significativas mediante la prueba *t* de Student.

3.9. Análisis de los niveles de RNA mensajeros (RNAm) en neuronas hipocampales luego de la estimulación con BDNF.

### 3.9.1. Extracción de RNA.

Al finalizar los respectivos tratamientos, las neuronas hipocampales se separaron desde las placas de cultivo con una solución 25 nM de tripsina disuelta en PBS y fueron posteriormente lavadas con PBS estéril. Luego, se purificó el RNA total utilizando el protocolo descrito por el reactivo Trizol para el análisis de expresión de *Rab5* y *Rab11* por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (o qPCR) (Ambion RNA, Life Technologies) o siguiendo las instrucciones del *RNAeasy Mini kit* (Qiagen, Hilden, Alemania), para el análisis de expresión de genes mediante arreglos de PCR. Luego de cada extracción de RNA, se evaluó la calidad del material aislado, mediante gel de integridad compuesto por 1% agarosa, 20 mM de MOPS pH 7 y 2 M de formaldehído. Se analizó la relación entre las bandas correspondientes al RNAr 28s y 18s. Posteriormente, el RNAm extraído se cuantificó mediante espectrofotometría (Biophotometer D30, Eppendorf, Alemania) y se trató con DNAsa I (Promega, WI, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante.

# **3.9.2.** Análisis de cambios en los niveles de RNAm de *Rab5a* y *Rab11a* en neuronas hipocampales.

Una vez finalizado el aislamiento del RNA y del tratamiento con DNAsa I (luego del tratamiento, nuevamente se cuantificaron los niveles de RNA), se sintetizó cDNA mediante transcripción reversa utilizando la enzima M-MLV RT (Promega) a partir de 1  $\mu$ g de RNA con 0,5  $\mu$ g de *random primer*, en un volumen de reacción de 25  $\mu$ L. Luego, se prosiguió el protocolo de síntesis descrito por el fabricante del termociclador TC-312 (Techne). Una vez realizada la síntesis de cDNA, se prosiguió a realizar la amplificación del cDNA por qPCR. En primer lugar se estandarizaron los partidores para obtener una eficiencia cercana al 100%, utilizando las condiciones descritas por el protocolo de *Brilliant II SYBR Green QPCR* (Stratagen), referido al termociclador Mx3000P (Stratagene), para posteriormente realizar un análisis de 2<sup>-ΔΔCt</sup>. El volumen de

reacción está compuesto por 12.5 µL de 2x Brilliant II SYBR Green QPCR master mix, 200 nM de partidor forward, 250 nM de partidor reverse para los genes  $\beta$ -actina, TBP (TATA box binding protein) y Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) y 300 nM para PGK-1 (phosphoglycerate kinase 1), agua libre de nucleasas y 1,5 µL de cDNA, en 25 µL de volumen final. El protocolo de PCR fue de 15 minutos a 95 °C y luego 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos y 58 °C. Los partidores utilizados en esta tesis fueron diseñados utilizando el software on-line de NCBI, la herramienta Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\_LOC=BlastHome) y el software Primer3 v. 0.4.0. (Howard Hughes Medical Institute and by the National Institutes of Health, http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). Los partidores utilizados se describen en la Tabla 1.

Gen	Partidores utilizados (5' a 3')	Observaciones
Rab5a	GGCTAATCGAGGAGCAACAA	
	ACAAAGCGAAGCACCAGACT	
Rab11a	AAAGTTACCCTGCTGCCTGG	
	CTGCCAGGAAAGGAGACTGG	
Arc	GGAGGGAGGTCTTCTACCGT	Usado como control
	CTACAGAGACAGTGTGGCGG	positivo
$\beta$ -actina	CCCGCGAGTACAACCTTCT	Gen utilizado como
	CGTCATCCATGGCGAACT	normalizador
Tbp	CTGTTTCATGGTGCGTGACGAT	Gen utilizado como
	AAGCCCTGAGCATAAGGTGGAA	normalizador
Pgk-1	TGCTGGGCAAGGATGTTCTGTT	Gen utilizado como
	ACATGAAAGCGGAGGTTCTCCA	normalizador

**Tabla 1.** Partidores utilizados para el análisis de los niveles de *Rab5a*, *Rab11a*, *Arc* y de los genes utilizados como normalizadores.

Se realizó una curva de diluciones seriadas en diluciones en base 10 para realizar la curva de estandarización, además se realizó una curva de disociación para evaluar la formación de amplicones no deseados, utilizando el protocolo de PCR de 1 ciclo de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 30 segundos y 95 °C por 30 segundos. En segundo lugar, se amplificó el cDNA en duplicado utilizando el protocolo descrito anteriormente en la estandarización. Los niveles de expresión relativa de *Rab5a*, *Rab11a* y *Arc* se obtuvieron normalizando los datos obtenidos  $(2^{-\Delta\Delta Ct})$  respecto a los genes utilizados como normalizadores ( $\beta$ -actina) y las veces de cambio en la expresión de cada gen se obtuvo dividiendo el valor de expresión relativa obtenido en las muestras tratadas con BDNF respecto a las muestras tratadas con vehículo (BSA al 0,1% disuelto en Neurobasal). Se establecieron diferencias significativas mediante la prueba *t* de Student, comparando la condición control (vehículo) respecto a las muestras tratadas con BDNF.

#### 3.9.3. Análisis de cambios en los niveles de RNAm mediante Arreglos de PCR.

Luego de la extracción de RNA, se llevó a cabo la eliminación de DNA genómico siguiendo el protocolo de eliminación con DNAsa según el *RT2 First Strand Kit* (Qiagen), producto sugerido por el fabricante del Arreglo de PCR. Para ello, se realizó mezcla de eliminación de DNA genómico (denominada **solución a**, para cada punto experimental) compuesta por 1 µg de RNA más 2 µL de solución GE (que contiene DNAsa) en un volumen de 10 µL. Esta mezcla se incubó a 42 °C por 5 minutos, para luego ser enfriada en hielo. A su vez, se preparó la mezcla para realizar la transcripción reversa (denominada **solución b**), compuesta por 8 µL de solución BC3 (5x), 2 µL de solución control P2, 4 µL de solución de mezcla de transcripción reversa RE3 más H<sub>2</sub>0 libre de RNAsas para 15 minutos y luego a 95 °C por 5 minutos. Luego, se mezclaron 10  $\mu$ L de RNA libre de DNA (o **solución a**), 10  $\mu$ L de mezcla de transcripción reversa (o **solución b**) más 91  $\mu$ L de H<sub>2</sub>0 libre de RNAsas (volumen total de 111  $\mu$ L, que denominamos **solución c**). Además, se realizó la siguiente mezcla (que es utilizada por cada placa de 96 pocillos del arreglo de PCR): 1350  $\mu$ L de solución 2x RT2 SYBR Green mastermix, 102  $\mu$ L de **solución c** más 1248  $\mu$ L de H<sub>2</sub>0 libre de RNasas, formando un volumen total de 2700  $\mu$ L (que llamamos **solución d**). Posteriormente, se agregaron 25  $\mu$ L de **solución d** a cada pocillo de las placas de 96 pocillos del arreglo de PCR *Rat cAMP/Ca<sup>2+</sup> PathwayFinder RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array* (SABioscience, Qiagen, MD, EEUU). Luego, la placa conteniendo la **solución d** es sometida a la reacción de qPCR siguiendo los pasos descritos en la Tabla 2.

1 <sup>er</sup> Paso	95°C por 10 min	
2 <sup>do</sup> paso	40 ciclos	95°C por 15 seg
3 <sup>er</sup> paso	40 010105	60°C por 1 min
		95°C por 15 seg
Curve de disocie	25°C por 1 seg	
Cuiva de disocia	70°C por 15 seg	
		95°C por 1 seg

**Tabla 2.** Cuadro resumen del protocolo seguido para el análisis de los cambios de expresión de genes mediante el sistema de Arreglo de PCR Rat cAMP/Ca<sup>2+</sup> PathwayFinder  $RT^2$  Profiler PCR Array.

Los tres primeros pasos corresponden a la reacción de qPCR, siendo el tercer segmento la zona de amplificación donde se realizan 40 ciclos. El último segmento, corresponde a la curva de disociación utilizada para distinguir la especificidad de los productos de PCR. Los resultados obtenidos entregados por el equipo referido al termociclador Mx3000P (Stratagene), fueron utilizados posteriormente para realizar un análisis de los cambios de expresión de 84 genes que presentan promotores con elementos de respuesta a cAMP (CRE), a  $Ca^{2+}$  (CaRE) y a suero (SRE). Los niveles de expresión relativa de cada gen se obtuvieron normalizando los datos obtenidos respecto a 5 genes utilizados como normalizadores (Beta-actina, Beta-2 microglobulina, Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1, Lactato deshidrogenasa y Proteína ribosomal P1). Luego, este valor se normalizó respecto al valor obtenido en las neuronas que expresaron EGFP y que no fueron tratadas con BDNF (que adquiere el valor 1). Finalmente, las veces de cambio en la expresión de cada gen se obtuvo dividiendo el valor de expresión relativa obtenido en las muestras tratadas con BDNF respecto a las muestras tratadas con vehículo (BSA). Se establecieron diferencias significativas mediante la prueba *t* de Student, comparando la condición control (vehículo) respecto a las muestras tratadas con BDNF. Posteriormente, Se establecieron diferencias significativas mediante la prueba *t* de Student, comparando las neuronas que expresaron EGFP respecto a las neuronas que expresaron el mutante Rab11DN.

Además, se realizó el análisis de los niveles de expresión del gen *Arc* en las muestras (debido a que este gen está ausente de los 84 genes que contiene el Arreglo de PCR y es un conocido blanco transcripcional de BDNF). Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el apartado 3.9.2. de la sección de métodos.

# 3.10.1 Papel de Rab5, Rab11 y CREB en el aumento de la ramificación dendrítica inducida por BDNF.

Para estudiar el papel de Rab5, Rab11 y CREB en el aumento de la arborización dendrítica inducida por BDNF, utilizamos un modelo de estudio in vitro estandarizado en nuestro laboratorio y publicado previamente (Lazo et al 2013), en el cual neuronas hipocampales de 7 DIV son estimuladas por 48 horas con 50 ng/mL de BDNF. Al término de éste período, las neuronas exhiben un incremento significativo en la complejidad de su arborización dendrítica y sus puntos de ramificación. Para estudiar el papel de las proteínas Rab5 y Rab11, las neuronas fueron infectadas con partículas adenovirales que manejan la expresión de mutantes que presentan la sustitución de un aminoácido. En el caso de Rab5, el residuo serina-34 está sustituido por asparagina (S34N) y en el caso de Rab11 la serina-25 esta sustituida por asparagina (S25N). Esta sustitución conduce a que ambas GTPasas se mantengan predominantemente en un estado unido a GDP, lo cual produce que actúen como dominantes negativos (denominados en esta tesis como Rab5DN y Rab11DN, respectivamente). Otro mutante de Rab11 utilizado en esta tesis presenta la sustitución del residuo glutamina-70 por leucina (Q70L), que elimina la actividad GTPasa de la enzima, manteniéndose predominantemente en un estado unido a GTP. Esto produce que actúe como mutante constitutivamente activo (denominado en esta tesis como Rab11CA). Estos mutantes están fusionados a EGFP, lo que permite identificar las neuronas infectadas con las partículas adenovirales. Para determinar el papel de CREB, se transfectaron neuronas hipocampales con una versión mutante de CREB que presenta la sustitución del aminoácido serina-133 por un residuo de alanina (denominado en esta tesis como CREB S133A) fusionado al epítope flag. El residuo serina-133 es fosforilado en respuesta a la estimulación con BDNF y se ha demostrado que es requerido para inducir el crecimiento dendrítico inducido por BDNF en neuronas corticales (Finsterwald et al 2010). Por lo tanto, la sustitución del residuo produce que también actúe como mutante dominante negativo. Este mutante es identificado realizando una inmunofluorescencia para visualizar el epítope flag.

Utilizando este modelo de estudio, neuronas hipocampales de 7 DIV (al comienzo del día), fueron transfectadas con Lipofectamina-2000 para el caso de la transfección CREB S133A y EGFP o incubadas con vectores adenovirales en el caso de Rab5DN, de Rab11DN y EGFP. Luego de 12 horas (al finalizar el 7 DIV), las neuronas fueron estimuladas con 50 ng/mL de BDNF o BSA (0,1%, utilizada como control vehículo) en el medio de cultivo (Neurobasal sin B27) y mantenidas por 48 horas en estufa de cultivo. Al término del período de estimulación con BDNF, las células fueron fijadas y sometidas a inmunofluorescencia para marcar la proteína MAP2, cuya ubicación está restringida a la región somato-dendrítica y que ha sido utilizada en este tipo de estudios dado que permite la identificación clara de dendritas estructuralmente estables, sin confundirlas con axones u otro tipo de protrusiones (protocolo esquematizado en Figura 4). Posteriormente, las imágenes fueron sometidas a los análisis morfométricos descritos anteriormente (análisis de Sholl y puntos de ramificación).

Protocolo de estimulación de neuronas hipocampales con BDNF para análisis en cambios morfológicos



**Figura 4.** Diseño experimental utilizado para analizar los cambios morfológicos inducidos por BDNF.

### 3.10.2. Estudios de co-localización de TrkB junto a Rab5 y Rab11.

Neuronas hipocampales de 7DIV se co-transfectaron (mediante Lipofectamina-2000) con receptores TrkB fusionados al epítope flag (TrkB-flag) además de Rab5-EGFP o Rab11-EGFP. Luego de 48 horas, las neuronas se deprivaron de medio de cultivo durante 3 horas en **medio de depleción** (este medio fue utilizado como medio de depleción durante todos los experimentos mostrados en la presente tesis, que contenía medio Neurobasal sin B27 y suplementado con 200 ng/mL de TrkB-Fc, molécula que disminuye del medio extracelular el BDNF secretado de manera endógena por las neuronas). Posteriormente, se eliminó el medio de depleción y se incubaron las neuronas con anticuerpos anti-flag conjugados a fluoróforo Alexa-594 disueltos en medio Neurobasal a 4°C durante 30 min. Posteriormente, las neuronas fueron lavadas con medio Neurobasal tibio y se estimuló la internalización de TrkB-flag con BDNF (50 ng/mL) durante 0, 5 y 15 minutos. A continuación las neuronas se lavaron con PBS, se fijaron y se observaron por microscopía confocal.

#### 3.10.3. Estudio del papel de Rab11 en el reciclaje de receptores TrkB.

Neuronas hipocampales de 7 DIV, fueron co-transfectadas con receptores TrkBflag y EGFP o el mutante Rab11DN. Luego de 48 horas, las neuronas de 9 DIV fueron deprivadas de medio de cultivo durante 90 minutos e incubadas en medio de depleción a 37°C. Posteriormente, se eliminó el medio de depleción y las neuronas fueron lavadas e incubadas con anticuerpos anti-flag (producidos en ratones) conjugados a un fluoróforo (Alexa-594) disueltos en medio Neurobasal a 4° C. Después de 30 minutos, las células se lavaron con medio Neurobasal a 37°C y se estimularon con BDNF (50 ng/mL) durante 30 minutos. Después de la internalización de los receptores TrkB-flag, los anticuerpos que quedaron en la superficie celular se eliminaron lavando las neuronas 3 veces con EDTA 1 mM disuelto en PBS. Los receptores reciclados hacia la superficie de la célula fueron marcados por incubación durante 60 minutos con anticuerpos anti-ratón conjugados a un fluoróforo diferente (Alexa-647). Los niveles de receptores reciclados es proporcional a la señal detectada por el anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa-647 que reconoce el anticuerpo anti-flag cuando ha vuelto a la membrana plasmática desde endosomas de reciclaje. Finalmente, las neuronas se lavaron, se fijaron y se capturaron imágenes por microscopía confocal.

# 3.10.4. Estudio del efecto de mutante Rab5DN en la internalización de receptores recombinantes TrkB-flag.

Neuronas hipocampales de 7DIV se co-transfectaron con TrkB-flag además del mutante Rab5DN o EGFP. Luego de 48 horas, las neuronas se deprivaron de medio de cultivo y fueron mantenidas en medio de depleción durante 3 horas. Al término de este

período, se incubaron con anticuerpos anti-flag conjugados al fluoróforo Alexa-594 disueltos en medio Neurobasal, a 4°C durante 30 minutos. Posteriormente, las neuronas fueron lavadas con medio Neurobasal tibio y se estimuló la internalización de TrkB-flag con BDNF (50 ng/mL), disuelto en Neurobasal durante 15 minutos. A continuación, las neuronas se lavaron con PBS, se fijaron y se adquirieron imágenes por microscopía confocal. En estas imágenes, se analizó la intensidad de fluorescencia promedio en el cuerpo celular de las neuronas correspondiente a receptores TrkB-flag internalizados, como fue descrito anteriormente en la sección de métodos.

En otro grupo experimental, neuronas hipocampales de 7DIV se infectaron con partículas adenovirales que manejan la expresión de EGFP (usada como control) o el mutante Rab5DN. Luego de 48 horas, las neuronas fueron deprivadas de medio de cultivo y se incubaron con transferrina (100  $\mu$ g/mL) conjugada al fluoróforo Alexa-647 disuelto en Neurobasal, durante 90 minutos. Luego, las neuronas se lavaron, se fijaron y se obtuvieron imágenes por microscopía confocal. En estas imágenes, se analizó la intensidad de fluorescencia promedio en el cuerpo celular de las neuronas correspondiente a la proteína transferrina internalizada.

# **3.10.5.** Efecto de la inhibición de la actividad de Rab5 en los niveles de Rab11 endógeno en neuronas hipocampales en cultivo.

Neuronas hipocampales de 7DIV se infectaron con partículas adenovirales que manejan la expresión de EGFP (usada como control) o el mutante Rab5DN. Luego de 48 horas, las neuronas se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia para determinar los niveles de Rab11a mediante la tinción con un anticuerpo anti-Rab11. Luego, se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal tomando cortes en el eje z de 0,5 µm.

Posteriormente, las imágenes fueron integradas en una imagen final considerando la suma de cada pixel. En esta imagen final, se determinó la intensidad de fluorescencia promedio en el cuerpo celular (descartando el núcleo) y en 2 o 3 segmentos de 10 µm de dendritas primarias para cada célula analizada, por cada grupo experimental.

# **3.10.6.** Estudio de las rutas de transducción de señales requeridas para la activación de CREB en respuesta a la estimulación con BDNF.

Neuronas hipocampales de 9 DIV fueron deprivadas de medio de cultivo y se mantuvieron en medio de depleción durante 3 horas. Durante este período (1 hora antes de la estimulación con BDNF), algunas neuronas fueron incubadas con el inhibidor de la ruta ERK1/2, PD98059 (30  $\mu$ M), con el inhibidor de la ruta PI3K/Akt, LY294002 (10  $\mu$ M), con el inhibidor de la actividad tirosina quinasa del receptor TrkB, K252a (200 nM) o con el vehículo de los inhibidores (DMSO). Luego, las neuronas fueron estimuladas con BDNF 50 ng/mL (en presencia o ausencia de los inhibidores) durante 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron con PBS tibio en presencia de inhibidores de fosfatasas y se sometieron a inmunofluorescencia. Es importante destacar que desde el lavado con PBS en las células vivas hasta la incubación con anticuerpo secundario siempre estuvieron presentes los inhibidores de fosfatasas. Se realizó una inmunofluorescencia para detectar los niveles de fosforilación del residuo serina-133 del factor de transcripción CREB (pCREB) utilizando el anticuerpo anti-pCREB y además se utilizó el anticuerpo anti-MAP2, para delimitar la región somato-dendrítica. En los últimos lavados de la inmunofluorescencia, se incubaron las neuronas con el marcador nuclear Hoechst 33258 (1 µg/mL). Posteriormente, se adquirieron imágenes en microscopio de fluorescencia procediendo en primer lugar a localizar neuronas con una adecuada morfología
(adquiriendo imágenes visualizadas mediante filtro de 488 nm), luego se obtuvo la imagen con el filtro que permite visualizar la inmunotinción para pCREB (580 nm) y finalmente con el filtro que permite visualizar la tinción nuclear Hoechst 33258 (350 nm) (Figura 3 A-C). Para cuantificar la activación de CREB, se consideró la fluorescencia de pCREB asociada al núcleo delimitada con la tinción de Hoechst y se determinó el área y la intensidad de fluorescencia promedio de la región seleccionada (Figura 5 D-E).



**Figura 5.** Procedimiento de adquisición (**A-C**) y análisis (**D-E**) de imágenes para determinación de activación de CREB en respuesta a la estimulación con BDNF.

Además, se realizó un control de la actividad del inhibidor LY294002. Para ello, neuronas fueron deprivadas de medio de cultivo y se mantuvieron en medio de depleción durante 3 horas. Durante este período (1 hora antes de la estimulación con BDNF), algunas neuronas fueron incubadas con el inhibidor LY294002 (10 µM) o con su vehículo (DMSO). Luego, las neuronas fueron estimuladas con BDNF 50 ng/mL (en presencia o ausencia del inhibidor) durante 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron con PBS tibio en presencia de inhibidores de fosfatasas y fueron lisadas en 60  $\mu$ L de solución de lisis conteniendo inhibidor de fosfatasas y proteasas. El lisado fue sometido a los procedimientos descritos en la sección de métodos y las muestras resultantes fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Luego, 50  $\mu$ g de proteínas se utilizaron para analizar mediante Western blot los niveles de activación de TrkB (utilizando anticuerpo anti-pTyr515) y de Akt (utilizando anticuerpo anti-pSer473). Además, se evaluaron los niveles totales de las respectivas proteínas (TrkB total y Akt total).

## **3.10.7.** Estudio del papel de la actividad de Rab5 y Rab11 en la activación de CREB por estimulación con BDNF.

Neuronas hipocampales de 7 DIV se infectaron con partículas adenovirales que manejan la expresión de EGFP (usada como control) o las versiones mutantes Rab5DN, Rab11DN o Rab11CA. Luego de 48 horas (a los 9 DIV), las neuronas fueron deprivadas de medio de cultivo y mantenidas en medio de depleción durante 3 horas. Posteriormente, las neuronas fueron estimuladas con BDNF 50 ng/mL disuelto en Neurobasal a diferentes tiempos (entre 0 y 60 minutos) o a diferentes concentraciones (0, 0.5, 5 y 50 ng/mL de BDNF ó 0, 0.02, 0.2 y 2 nM de BDNF) durante 30 minutos. Luego, las células se lavaron con PBS tibio en presencia de inhibidores de fosfatasas, fueron fijadas y sometidas a inmunofluorescencia (con la presencia constante de los inhibidores de fosfatasas). Se realizó una inmunofluorescencia para detectar los niveles de fosforilación del residuo serina-133 del factor de transcripción CREB (pCREB) y además se delimitó el núcleo con la tinción Hoechst 33258 (1 µg/mL). Posteriormente, se adquirieron imágenes en microscopio de fluorescencia procediendo en primer lugar a localizar neuronas expresando EGFP o los mutantes de Rab5 y Rab11 (adquiriendo imágenes visualizadas mediante filtro

de 488 nm), luego se obtuvo la imagen con el filtro que permite visualizar la inmunotinción para pCREB (580 nm) y finalmente con el filtro que permite visualizar la tinción nuclear Hoechst 33258 (350 nm). (Figura 6 A-C). Para cuantificar la activación de CREB, se utilizaron todas las neuronas que expresaron EGFP o mutantes de Rab5 y Rab11 visualizadas en un campo determinado. Se consideró la fluorescencia de pCREB asociada al núcleo delimitada con la tinción de Hoechst y se determinó el área y la intensidad de fluorescencia promedio de la región seleccionada (Figura 6 D-E).



imagen de pCREB. Determinación de la intensidad de fluorescencia

**Figura 6.** Procedimiento de adquisición (A-C) y análisis (D-E) de imágenes para la determinación del papel de las GTPasas Rab5 y Rab11 en la activación de CREB en respuesta a la estimulación con BDNF.

Además, se llevó a cabo el estudio del papel de Rab5 y Rab11 en la activación de CREB luego de la estimulación con BDNF mediante Western blot. Para este grupo experimental, neuronas hipocampales de 7DIV se infectaron con partículas adenovirales que manejan la expresión de EGFP (usada como control) o las versiones mutantes Rab5DN y Rab11DN. Luego de 48 horas (9DIV), las neuronas fueron deprivadas de medio de cultivo y mantenidas en medio de deprivación por 3 horas. Finalizado este período, se realizó la estimulación de las células con BDNF 50 ng/mL o con vehículo (BSA al 0,1%) disuelto en Neurobasal por 30 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con PBS tibio en presencia de inhibidores de fosfatasas y fueron lisadas en 60 µL de solución de lisis conteniendo inhibidor de fosfatasas y proteasas. El lisado fue sometido a los procedimientos descritos en la sección de métodos y las muestras resultantes fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Luego, 50 µg de proteínas se utilizaron para analizar mediante Western blot los niveles de activación de pCREB y los niveles totales de CREB.

# 3.10.8. Estudio del requerimiento de la actividad de Rab5 y Rab11 para la activación de rutas de transducción de señales rio abajo de BDNF/TrkB.

Neuronas hipocampales de 7 DIV se infectaron con partículas adenovirales que manejan la expresión de EGFP (usada como control) o las versiones mutantes Rab5DN y Rab11DN. Luego de 48 horas (9DIV), las neuronas fueron deprivadas de medio de cultivo y se mantuvieron en medio de depleción por 3 horas. Posteriormente, se realizó la estimulación de las neuronas por 0, 5 y 120 minutos con BDNF 50 ng/mL disuelto en Neurobasal a 37° C. Luego, las células se lavaron con PBS tibio en presencia de inhibidores de fosfatasas y fueron lisadas en 60  $\mu$ L de solución de lisis conteniendo inhibidor de proteasas y fosfatasas. El lisado obtenido se sometió a los procedimientos descritos en la sección de métodos y las muestras resultantes fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Luego, 35  $\mu$ g de proteínas se utilizaron para analizar mediante Western blot los niveles de activación de las proteínas que se detallan a continuación. Se

evaluó la activación tanto de TrkB (evaluando los niveles de fosforilación de receptores Trk usando un anticuerpo policlonal general dirigido a la secuencia que contiene pTyr490 del receptor TrkA), Akt (evaluando los niveles de pSer473) y ERK1/2 (evaluando pThr202/pThr204). Además se evaluaron los niveles totales de éstas proteínas utilizando el anticuerpo anti-TrkB (anticuerpo policlonal desarrollado y donado por el Laboratorio de la Dra Ursula Wyneken, Universidad de Los Andes-Chile), anti-Akt, anti-ERK1/2 y anti βIIItubulina. La cuantificación de los resultados obtenidos se realizó estandarizando la intensidad de las bandas obtenidas con los anticuerpos fosfo-específicos respecto a la correspondiente. Luego, estos valores se expresaron normalizando los valores estandarizados respecto a los valores obtenidos desde las neuronas no tratadas con BDNF (neuronas control).

3.10.9. Estudio del papel de la actividad de Rab5 y Rab11 en la activación *in situ* de ERK 1/2 en respuesta a la estimulación con BDNF.

### a) Validación de anticuerpo anti-pERK1/2.

Previo a la evaluación del papel de Rab5 y Rab11 en los cambios en los niveles de pERK1/2 en respuesta a la estimulación con BDNF, se llevó a cabo la validación del anticuerpo anti-pERK1/2 en detectar cambios en los niveles de fosforilación de ERK1/2. Para esto, neuronas hipocampales de 9 DIV fueron deprivadas de medio de cultivo y se mantuvieron en medio de depleción durante 3 horas. Durante este período, algunas neuronas fueron incubadas con el inhibidor PD98059 (30  $\mu$ M, Promega) el cual bloquea la activación de la ruta ERK1/2 por unión a la proteína quinasa MEK1 en su forma inactiva, o

con su vehículo (DMSO). Luego, las neuronas fueron estimuladas con BDNF 50 ng/mL (en presencia o ausencia del inhibidor) durante 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron con PBS tibio en presencia de inhibidores de fosfatasas y se sometieron a una inmunofluorescencia (con la presencia siempre de los inhibidores de fosfatasas) utilizando el anticuerpo anti-pERK1/2 y además se utilizó el anticuerpo anti-MAP2, para delimitar la región somato-dendrítica. En los últimos lavados de la inmunofluorescencia, se incubaron las neuronas con el marcador nuclear Hoechst 33258 (1  $\mu$ g/mL). Luego, se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal, adquiriendo imágenes con secciones ópticas de 250 nm, que posteriormente se reconstruyeron en una sola imagen. En esta imagen, se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio tanto en el cuerpo celular como en el núcleo de las neuronas, siguiendo el protocolo detallado en la Figura 6.

# b) Papel de la actividad de Rab5 y Rab11 en la activación *in situ* de ERK 1/2 en respuesta a la estimulación con BDNF.

Neuronas hipocampales de 7DIV se infectaron con partículas adenovirales que manejan la expresión de EGFP (control) o Rab5DN o Rab11DN por 48 horas. Luego, las neuronas (9 DIV) fueron deprivadas de medio de cultivo y se mantuvieron en medio de depleción por 3 horas. Luego, se realizó la estimulación de las neuronas con BDNF 50 ng/mL disuelto en Neurobasal a 37° C durante 0, 15 y 60 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con PBS tibio en presencia de inhibidores de fosfatasas, los cuales se mantuvieron a lo largo de todo el procedimiento de inmunofluorescencia que se realizó posteriormente. Luego del lavado, las neuronas se fijaron para ser incubadas con un anticuerpo anti-pERK1/2 (pThr202/pTyr204) y visualizar la activación de ERK1/2 *in situ* 

por inmunofluorescencia. En los últimos lavados de la inmunofluorescencia, se incubaron las neuronas con la tinción nuclear Hoechst 33258 (1 µg/mL) (Figura 7).



**Figura 7.** Estrategia experimental utilizada para determinar papel de Rab5 y Rab11 en la activación de ERK1/2 inducida por BDNF

Luego se adquirieron imágenes en microscopio confocal: a partir del canal correspondiente al filtro verde (488 nm, EGFP y mutantes), se seleccionaron los niveles inferior y superior para realizar cortes en el eje *z* (cortes de 250 nm). Posteriormente, se tomaron en secuencia las imágenes correspondientes a la señal de EGFP y mutantes Rab5DN y Rab11DN (488 nm), las imágenes correspondientes a la señal de pERK1/2 (545 nm) y las imágenes para la señal de la tinción Hoechst 33258 (350 nm) (Figura 8 A-C). Para analizar estas imágenes, a partir de la imagen tomada utilizando filtro verde (488 nm, EGFP y mutantes), se seleccionó en el caso del soma todo el contorno del cuerpo celular descartando al núcleo y las dendritas. En el caso de las dendritas, se seleccionaron 2 o 3 dendritas por célula tomando 5  $\mu$ m de dendrita de longitud y en el caso del núcleo, se utilizaron las imágenes adquiridas para la señal de la tinción Hoechst 33258. Todas estas selecciones se traspasaron a la imagen de pERK1/2 (por separado) y se realizó el análisis de la intensidad de fluorescencia promedio de la región escogida. (Figura 8 D-F).



**Figura 8.** Procedimiento de adquisición (A-C) y análisis (D-E) de imágenes para determinar el papel de Rab5 y Rab11 en la activación *in situ* de ERK1/2 en respuesta a la estimulación con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo.

# 3.10.10. Análisis de los niveles de RNAm de *Rab5a* y *Rab11a* luego de la estimulación con BDNF.

Neuronas hipocampales de 8-9 DIV fueron deprivadas de medio de cultivo y mantenidas en medio de depleción durante 1 hora. Posteriormente, las neuronas fueron estimuladas con BDNF 50 ng/mL o con su vehículo (BSA al 0,1%) disuelto en Neurobasal durante 4 o 12 horas. Luego, se analizaron los cambios en los niveles de expresión de RNAm de *Rab5a*, *Rab11a* y de *Arc* (utilizado como control positivo de la estimulación con BDNF) como fue descrito en la sección de métodos.

3.10.11. Análisis de los niveles de proteína de Rab5a y Rab11a luego de la estimulación con BDNF. Papel de inhibidores de la transcripción génica y de la traducción de proteínas.

Neuronas hipocampales de 8 DIV fueron deprivadas de medio de cultivo y mantenidas en medio de depleción durante 1 hora. Posteriormente, las neuronas fueron estimuladas con BDNF 50 ng/mL o con su vehículo (BSA al 0,1%) disuelto en Neurobasal durante 24 horas. Luego, las neuronas fueron lisadas y se evaluó mediante análisis de Western blot los niveles de Rab5a, Rab11a y ßIII-tubulina, siguiendo los protocolos descritos en la sección de métodos. En un segundo grupo experimental, neuronas hipocampales de 8 DIV fueron deprivadas de medio de cultivo y mantenidas en medio de depleción durante 1 hora. Durante este período, algunas neuronas fueron incubadas en presencia del inhibidor de la transcripción actinomicina D (molécula que se une al complejo de iniciación de la transcripción produciendo un bloqueo de la acción de la RNA polimerasa, 5 µM 30 minutos antes de la estimulación con BDNF) o su vehículo (DMSO) o con el inhibidor de la traducción cicloheximida (molécula que interfiere la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, produciendo el bloqueo de la elongación traduccional, 25 µM, 1 hora antes de la estimulación con BDNF). Posteriormente, las neuronas fueron estimuladas con BDNF 50 ng/mL o con su vehículo (BSA al 0,1%) disuelto en Neurobasal durante 24 horas. Luego, las neuronas fueron lisadas y se evaluó mediante análisis de Western blot los niveles de Rab5a, Rab11a y βIII-tubulina, siguiendo los protocolos descritos en la sección de métodos. Además, en un tercer grupo experimental, neuronas hipocampales de 8-9 DIV fueron deprivadas de medio de cultivo y mantenidas en medio de depleción durante 1 hora. Durante este período, algunas neuronas fueron incubadas en presencia del inhibidor de la quinasa mTOR, rapamicina (200 nM) o con su vehículo (etanol). Luego, las neuronas fueron estimuladas con BDNF 50 ng/mL o con su vehículo (BSA al 0,1%) disuelto en Neurobasal durante 4 o 12 horas. Al finalizar la estimulación, las neuronas fueron lisadas y se evaluó mediante análisis de Western blot los niveles de Rab5a, Rab11a y  $\beta$ III-tubulina, siguiendo los protocolos descritos en la sección de métodos.

Posteriormente, se cuantificaron los niveles relativos de Rab5a y Rab11a por análisis de densitometría relativa a los niveles de βIII-tubulina (proteína que no mostró variaciones en respuesta a los tratamientos realizados en nuestro modelo de estudio).

## 3.10.12. Estudio del papel de Rab11 en los cambios de expresión de genes en respuesta a la estimulación con BDNF.

Neuronas hipocampales de 7 DIV se infectaron con partículas adenovirales que manejan la expresión de EGFP (usada como control) o la versión mutante Rab11DN. Luego de 48 horas (a los 9 DIV), las neuronas fueron deprivadas de medio de cultivo y mantenidas en medio de depleción durante 1 hora. Posteriormente, las neuronas fueron estimuladas con BDNF 50 ng/mL o con su vehículo (BSA al 0,1%) disuelto en Neurobasal durante 4 horas. Luego, se analizaron los cambios en la expresión de diversos genes utilizando el sistema *Rat cAMP/Ca<sup>2+</sup> PathwayFinder RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array* (SABioscience, Qiagen, MD, EEUU), como fue descrito en la sección de métodos.

### 3.11. Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Graphpad Prism versión 5.01 para Windows. Los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar. Los niveles de diferencias estadísticamente significativas (p<0,05; p<0,01; p<0,001) se indican en cada figura, las que fueron determinadas para comparaciones entre dos poblaciones por la prueba *t* de Student y para comparaciones entre múltiples poblaciones mediante la prueba de ANOVA, utilizando la prueba de Bonferroni *a posteriori* para comparar pares de datos.

### **4. RESULTADOS**

## <u>Objetivo 1. Determinar si las GTPasas Rab5 y Rab11 son requeridas para aumentar la arborización dendrítica inducida por la estimulación con BDNF.</u>

Para llevar a cabo los objetivos propuestos en la presente tesis, se eligió utilizar como modelo de estudio neuronas en cultivo *in vitro* provenientes del hipocampo de embriones de rata con 18 días de gestación, el cual ha sido utilizado ampliamente para llevar a cabo estudios en neuronas del sistema nervioso central (Kaech & Banker 2006). Los cultivos utilizados (mantenidos durante 9 días *in vitro*) se caracterizaron por presentar prácticamente sólo neuronas, lo cual fue determinado realizando estudios de inmunofluorescencia identificando las neuronas como células con marca positiva para la proteína asociada a microtúbulos de neuronas MAP2 (99  $\pm$  1%, en Figura 9, izquierda). Esporádicamente, se identificaron células no neuronales con marca positiva para la proteína de filamentos intermedios GFAP (<1%), la cual es un marcador de astrocitos (Figura 9, derecha). Este resultado indica que en las condiciones de aislamiento y mantención en que se realiza el cultivo se obtienen prácticamente sólo neuronas desde los hipocampos de cerebro de rata.



Figura 9. Imágenes de microscopía de fluorescencia de neuronas hipocampales de rata en cultivo durante 9 días. Cultivos celulares preparados desde hipocampos de embriones de rata que fueron fijados a los 9 días in vitro (9 DIV) y marcados utilizando anticuerpos contra la proteína MAP2 (en verde) y GFAP (rojo), además, se identificó el núcleo de las células utilizando la tinción Hoechst 33258 (azul). Las imágenes muestran que a los 9 DIV los cultivos están compuestos prácticamente sólo por neuronas (99%, imagen de la izquierda) y ocasionalmente se halló células no neuronales positivas para GFAP (en rojo, como indica la flecha en imagen de la derecha) y que a su vez no muestran marca positiva para MAP2. Barra indica 20  $\mu$ m.

### 4.1.- La GTPasa Rab5 co-localiza con receptores TrkB, regula la morfología neuronal y es requerida para aumentar la arborización dendrítica inducida por BDNF.

Desde el punto de vista clásico del tráfico intracelular, el material que conforma el endosoma de reciclaje (donde se localiza Rab11) corresponde, entre otros, a endosomas provenientes desde el endosoma temprano, el cual es formado principalmente por fusión de material endocitado desde la membrana plasmática. La proteína clave que regula la fusión del material endocitado formando el endosoma temprano es Rab5, la cual ha sido descrita como una proteína que actúa previo a Rab11 en la ruta de reciclaje de la proteína transferrina hacia la membrana plasmática (Ullrich et al 1996). Nos propusimos estudiar si receptores TrkB luego de su internalización inducida por la unión a BDNF transitan a través de una ruta en que se encuentra Rab5.



Figura 10. TrkB co-localiza con la GTPasa Rab5 luego de la estimulación con BDNF, en dendritas y cuerpos celulares de neuronas hipocampales en cultivo.

(A) Neuronas hipocampales de 7DIV se co-transfectaron con receptores TrkB fusionados al epítope flag (TrkB-flag) además de Rab5-EGFP. Luego de 48 horas, las neuronas se incubaron con anticuerpos anti-flag (en rojo) a 4°C durante 30 minutos. Luego se estimuló la internalización de TrkB con BDNF (50 ng/mL) durante 5 y 15 minutos y a continuación las neuronas se fijaron y se observaron por microscopía confocal. En ausencia de BDNF, los receptores TrkB se localizan en la periferia del cuerpo celular y Rab5 se encuentra a nivel intracelular. Después de la estimulación con BDNF, una población de receptores TrkB presenta una distribución intracelular y co-localiza con Rab5, como muestra la cuantificación utilizando el índice de correlación de Manders (**B**, N=30 neuronas desde 3 experimentos independientes. \*\*:. P <0,01; \*\*\*, p <0,001 ). Barra en **A** indica 10  $\mu$ m.

Como muestra la Figura 10, en las neuronas que no fueron estimuladas con BDNF, los receptores TrkB se encuentran de manera dispersa en la periferia del cuerpo celular de las neuronas. Además, Rab5-EGFP se distribuye mayormente en el cuerpo celular, aunque es posible hallarlo distribuido tanto en dendritas como en los axones. Luego de la estimulación con BDNF por 5 minutos, una porción de receptores TrkB internalizados aumenta su co-localización con Rab5-EGFP, siendo más evidente este aumento en dendritas que en somas. Luego de 15 minutos de estimulación con BDNF, la proporción de receptores TrkB que co-localiza con Rab5 en dendritas se mantiene, pero aumenta significativamente la cantidad de receptores que co-localizan con Rab5 en somas, respecto a la co-localización determinada a los 5 minutos de estimulación con BDNF. Esta observación sugiere que a través del tiempo, receptores TrkB internalizados en dendritas podrían ser transportados hasta el cuerpo celular.

Luego, evaluamos el efecto de la disminución de la actividad de Rab5 en la arborización dendrítica inducida por BDNF en neuronas hipocampales. Para ello, llevamos a cabo experimentos utilizando cultivos hipocampales de 7 DIV que fueron estimulados por 48 horas con BDNF, expresando EGFP o el mutante Rab5DN desde el día 7 hasta el día 9 en cultivo. La expresión de Rab5DN produjo un drástico cambio en la morfología de la región somato-dendrítica, en comparación con neuronas que sólo expresan EGFP (Figura 11A). El análisis de Sholl (Figura 11B) mostró que la expresión del mutante Rab5DN produjo una reducción significativa de la complejidad de la arborización dendrítica basal (entre los 25 y 50 µm desde el centro de la neurona) y sus puntos de ramificación  $(7 \pm 0,7)$  en comparación con neuronas que expresan sólo EGFP  $(12 \pm 0,7)$ , Figura 11C). Además, la expresión de Rab5DN produjo que las neuronas exhibieran un menor incremento en la arborización dendrítica y en el número de puntos de ramificación en respuesta a la estimulación con BDNF respecto a las neuronas que sólo expresan EGFP (los puntos de ramificación en neuronas que expresaron EGFP aumentaron 2,1 + 0,1 veces luego de estimulación con BDNF, en cambio las neuronas que expresaron Rab5DN aumentaron  $1,7 \pm 0,1$  veces en respuesta a BDNF).



### Figura 11.- La presencia de mutante dominante negativo de Rab5 (Rab5DN) redujo la arborización dendrítica basal y disminuyó los efectos de BDNF en neuronas hipocampales en cultivo.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas con vectores adenovirales para transducir la expresión de mutante dominante negativo de Rab5 fusionado a EGFP (Rab5DN) o sólo EGFP como control y luego estimuladas con BDNF por 48 hrs. Luego de fijarlas, se realizó una inmunofluorescencia para MAP2, se obtuvieron imágenes utilizando microscopía de fluorescencia y se sometieron a un posterior análisis morfométrico. (**B**) El análisis de Sholl muestra que la arborización dendrítica basal disminuyó significativamente en neuronas que expresan Rab5DN comparado con las neuronas control que sólo expresan EGFP. (**C**) Además, las neuronas que expresan Rab5DN exhiben un menor incremento en su ramificación dendrítica en respuesta a BDNF comparado con las neuronas que expresan sólo EGFP. (N= 27-34 neuronas desde 3 experimentos independientes. \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001).

A nivel intracelular, Rab5 se encuentra principalmente asociado a las membranas del endosoma temprano. Pero además se localiza de manera soluble en el citosol y también asociada a la membrana plasmática, lo cual dependerá si se encuentra unida a GTP. Si bien no es una función ampliamente descrita, existe evidencia que indica que la actividad de Rab5 es requerida para la internalización de receptores de la membrana plasmática, como los receptores AMPA (Brown et al 2005) o receptores purinérgicos P2X4 (Stokes 2013). Con el fin de determinar si la expresión del mutante Rab5DN podría disminuir la internalización de TrkB u otro receptor como el de transferrina, se evaluó el efecto de la expresión del mutante Rab5DN en la internalización de receptores recombinantes TrkB-flag y de tranferrina fluorescente, comparando esta situación con neuronas control, expresando EGFP.



# Figura 12.- La expresión de mutante dominante negativo de Rab5 (Rab5DN) no disminuyó la internalización de receptores TrkB-flag en neuronas hipocampales en cultivo.

(A-B) Neuronas hipocampales de 7DIV se co-transfectaron con receptores TrkB fusionados al epítope flag (TrkB-flag) además del mutante Rab5DN o EGFP. Luego de 48 hrs, las neuronas se incubaron con anticuerpos anti-flag (en rojo) a 4°C durante 30 min. Luego se estimuló la internalización de TrkB con BDNF (50 ng/mL) durante 15 minutos y a continuación las neuronas se fijaron y se observaron por microscopía confocal. Posteriormente, en las imágenes obtenidas se cuantificó la intensidad de fluorescencia correspondiente a TrkB-flag, delineando regiones de interés utilizando la imagen de EGFP/Rab5DN, que se transfirieron a las imágenes correspondientes a la señal de TrkBflag, cuantificando la intensidad de fluorescencia promedio de estas secciones. En las neuronas que expresaron EGFP y Rab5DN, en ausencia de BDNF los receptores TrkB se localizan principalmente en la periferia de las células. Después de la estimulación con BDNF, la distribución a nivel intracelular de TrkB aumenta significativamente, como muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia realizada en el soma de las neuronas (C). Esta distribución no es alterada por la presencia del mutante Rab5DN. N=17-25 neuronas desde 3 experimentos independientes. \*\*\*, p <0,001. Barra indica 10 μm. (**D**) Neuronas hipocampales de 7DIV se co-transfectaron con EGFP o Rab5DN. Luego de 48 hrs, las neuronas se incubaron con la proteína transferrina conjugada a un fluoróforo (Alexa-647, en la imagen en rojo) durante 90 minutos a 37° C. Luego las neuronas se fijaron y se obtuvieron imágenes por microscopía confocal. (E) La cuantificación de la intensidad de fluorescencia tanto en somas como en dendritas indicó que la expresión del mutante Rab5DN no alteró de manera significativa la internalización de transferrina (N=54-61 dendritas y 16 somas desde 3 experimentos independientes. N.S., p>0,05). Barra indica 10 µm.

Como se muestra en la Figura 12A y B, en las neuronas que expresaron EGFP y el mutante Rab5DN y que no fueron estimuladas con BDNF el receptor TrkB-flag mostró una distribución hacia la periferia del soma, probablemente correspondiente a receptores localizados en la membrana plasmática. Luego de la estimulación con BDNF se produjo un aumento significativo en la señal de fluorescencia a nivel perinuclear correspondiente al receptor TrkB-flag tanto en neuronas que expresaron EGFP (aumento de 1,7  $\pm$  0,2 veces respecto a neuronas EGFP no estimuladas, Figura 12A), así como las que expresaron el mutante Rab5DN (aumento de 1,8  $\pm$  0,1 veces respecto a neuronas no estimuladas, Figura 12B), sugiriendo que la expresión del mutante Rab5DN no disminuye la internalización de TrkB luego de la estimulación con BDNF (Figura 12C). También se evaluó la

internalización de la proteína transferrina, que es internalizada junto a su receptor de membrana tanto por procesos dependientes e independientes de clatrina y que es utilizada habitualmente para identificar tanto el tráfico a través del endosoma temprano como la ruta de reciclaje, en neuronas expresando EGFP o el mutante Rab5DN. Como se ve en la Figura 12D, las neuronas que expresaron EGFP o el mutante Rab5DN mostraron niveles similares de internalización de transferrina tanto en soma como en dendritas. Si bien la cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio muestra una tendencia hacia la disminución de la internalización de transferrina en las neuronas que expresaron Rab5DN respecto a neuronas que expresaron EGFP, esta disminución no fue estadísticamente significativa (Figura 12E, p>0,05). En suma, los resultados obtenidos sugieren que la presencia del mutante Rab5DN no disminuye la internalización de receptores TrkB inducida por la unión de BDNF ni tampoco la de otro receptor como es el de transferrina. Por lo tanto, la actividad de Rab5 es requerida para mantener la morfología neuronal basal y además para aumentar la arborización dendrítica en respuesta a BDNF, probablemente a través de la regulación de la señalización intracelular inducida por la estimulación neurotrófica y no por una disminución en la internalización del receptor. Es importante destacar que la expresión del mutante Rab5DN no disminuyó de manera evidente el crecimiento ni ramificación de axones ni tampoco la viabilidad de las neuronas, ya que los núcleos de las neuronas se ven similares a los que exhiben neuronas expresando EGFP (ausencia de núcleos apoptóticos, que si se evidencian cuando se expresa el mutante constitutivamente activo de Rab5, Rab5CA) y la cantidad de proteínas obtenidas desde lisados de células expresando Rab5DN no presenta diferencias respecto a neuronas expresando EGFP, sugiriendo que al término del período experimental, la cantidad de neuronas sigue siendo similar independiente de la condición experimental (dado que se comienza con el mismo número de células por placa) (Figura 13).



Figura 13.- La expresión del mutante dominante negativo de Rab5 (Rab5DN) no disminuyó el crecimiento ni ramificación axonal y no disminuyó la viabilidad celular. (A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas con vectores adenovirales para transducir la expresión de Rab5DN fusionado a EGFP (Rab5DN) por 48 hrs. Luego se obtuvieron imágenes utilizando microscopía de fluorescencia. (B) En neuronas expresando EGFP, Rab5DN o el mutante constitutivamente activo de Rab5 (Rab5CA) se realizó la tinción del núcleo con Hoechst33258 (azul) para determinar la presencia de núcleos apoptóticos. (C) Cuantificación de proteínas desde lisados de neuronas que expresaron por 48 horas EGFP o los mutantes Rab5DN y Rab11DN.

Investigaciones recientes han determinado que la actividad de Rab5 es requerida en procesos que van más allá de la fusión de vesículas y posterior formación del endosoma temprano. En el año 2012, el grupo de Marino Zerial describió que la disminución de los niveles de Rab5 en ratones, condujo a una alteración del sistema endolisosomal completo (Zeigerer et al 2012). En este artículo, se produjo la disminución de las 3 isoformas de Rab5 (Rab5a, b y c) mediante siRNAs y entre otros hallazgos, se determinó que la ausencia de Rab5 condujo a una disminución de las estructuras correspondientes a endosomas tempranos, tardíos y lisosomas. Interesantemente, la ausencia de Rab5 produjo

una moderada disminución de los niveles de Rab11 en muestras provenientes de hígado (disminución cercana al 15%), sugiriendo que la ausencia de Rab5 también podría alterar la composición del endosoma de reciclaje.

Para determinar si la presencia del mutante Rab5DN podría disminuir los niveles de Rab11 en nuestro modelo, neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas con partículas adenovirales que manejan la expresión del mutante Rab5DN y EGFP. Luego de 48 horas, se evaluaron los niveles endógenos de Rab11a mediante inmunofluorescencia (Figura 14A). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio en las imágenes obtenidas indicó que la expresión del mutante Rab5DN produjo una disminución significativa de la señal correspondiente a Rab11, en comparación con los niveles detectados en neuronas que expresaron EGFP (Figura 14B). Esta disminución fue más acentuada en las dendritas (disminución en promedio de 61%) que en el soma (donde disminuyó en promedio 32%). Por lo tanto, este resultado sugiere que la actividad de Rab5 podría regular la expresión de Rab11 y de esa manera la funcionalidad del endosoma de reciclaje, en neuronas hipocampales. Dado que nosotros hemos demostrado que el endosoma de reciclaje positivo para Rab11 regula el aumento en la arborización dendrítica inducida por BDNF (ver Figura 17 y Lazo et al 2013), estos datos sugieren que los efectos de la actividad de Rab5 en la arborización dendrítica podrían deberse, en parte, a la disminución de los niveles de Rab11.



## Figura 14. La expresión de mutante Rab5DN disminuye la expresión de Rab11 en neuronas hipocampales.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas con vectores adenovirales para transducir la expresión de mutante Rab5DN o sólo EGFP como control. Luego de 48 hrs las neuronas fueron fijadas y se evaluaron los niveles de Rab11a mediante inmunofluorescencia (en las imagines en color rojo). (B) La cuantificación de los niveles de Rab11a tanto en dendritas como en somas mostró que las neuronas que expresaron el mutante Rab5DN presentaron una disminución significativa de los niveles endógenos de Rab11a, en comparación con neuronas que expresaron EGFP. N=86-82 dendritas y 26 somas de 3 experimentos independientes; \*, p<0.05; \*\*\*, p<0.001. Barra indica 10  $\mu$ m.

# 4.2.- La actividad de la GTPasa Rab11 regula el reciclaje de receptores TrkB y es requerida para aumentar la arborización dendrítica inducida por BDNF.

Rab11 ha sido descrita clásicamente como una proteína reguladora del tráfico a través de la ruta de reciclaje (Ullrich et al 1996). Ha sido establecido que el receptor TrkB es un receptor que posterior a su internalización inducida por la unión del ligando, puede reciclar de vuelta a la membrana plasmática por mecanismos que aún no están totalmente establecidos, pero que requieren de la actividad tirosina quinasa del receptor además de la presencia de la proteína Hrs (de hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), una proteína asociada a endosomas (Chen et al 2005b, Huang et al 2009). Por ello, se propuso determinar si en neuronas hipocampales la GTPasa Rab11 presenta un papel regulador del reciclaje de receptores TrkB. Previamente, determinamos si TrkB colocaliza con la GTPasa Rab11 luego de la estimulación con BDNF, como ya fue descrito por nuestro laboratorio (Lazo, 2013). Utilizando la misma metodología realizada en esta tesis para determinar la co-localización de TrkB y Rab5 (Figura 10), determinamos que luego de 15 minutos de estimulación con BDNF, receptores TrkB-flag aumentan su colocalización con Rab11-EGFP en dendritas (Índice de correlación de Manders en neuronas sin estimular:  $0,373 \pm 0,038$ ; luego de estimulación con BDNF:  $0,669 \pm 0,032$ ), ratificando los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio y además sugiriendo que luego de la estimulación con BDNF, los receptores TrkB podrían transitar a través de una ruta regulada por Rab11 (Figura 15).



Figura 15. TrkB co-localiza con Rab11 luego de la estimulación con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo.

(A) Neuronas hipocampales de 7DIV se co-transfectaron con receptores TrkB fusionados al epítope flag (TrkB-flag) además de Rab11-EGFP. Luego de 48 horas, las neuronas se incubaron con anticuerpos anti-flag (en rojo) a 4°C durante 30 minutos. Luego se estimuló la internalización de TrkB con BDNF (50 ng/mL) durante 15 minutos y a continuación las neuronas se fijaron y se observaron por microscopía confocal. En ausencia de BDNF, los receptores TrkB se localizan en la periferia del cuerpo celular y Rab11 se encuentra a nivel intracelular. Después de la estimulación con BDNF, una población de receptores TrkB presenta una distribución intracelular y co-localiza con Rab11, como muestra la cuantificación utilizando el índice de correlación de Manders ( $\mathbf{B}$ , N=25 neuronas desde 3 experimentos independientes. \*\*\*, p <0,001).

A continuación, se determinó si TrkB recicla a través de un mecanismo que depende de la actividad de Rab11. Previamente, se realizaron los controles técnicos para este experimento. La estimulación con BDNF produce la internalización de los receptores TrkB-flag unidos al fluoróforo (Figura 16A, además ver Figura 10, 12 y 15). Además, se observó que la señal de fluorescencia correspondiente a los receptores localizados en la membrana plasmática (Figura 16B, izquierda arriba) es eliminada completamente si las neuronas son lavadas con PBS/EDTA (Figura 16B, derecha arriba), lo cual fue confirmado además por la incubación con anticuerpos para detectar el receptor en neuronas permeabilizadas (Figura 16B, abajo en azul). Una vez determinado que mediante esta metodología es posible marcar los receptores TrkB-flag en la membrana plasmática con anticuerpos en células vivas y que esta marca puede ser eliminada con lavados con EDTA, se procedió a estudiar el posible papel de Rab11 en el reciclaje de receptores TrkB. Como muestra en la Figura 16C y 16D la expresión de Rab11DN disminuyó se significativamente el reciclaje de los receptores TrkB en el cuerpo celular (reducción de 33%) y en dendritas (reducción de 60%), en comparación con las neuronas que expresan EGFP.



### Figura 16. Una fracción de receptores TrkB recicla a través de endosomas positivos para Rab11 tanto en el cuerpo celular como en las dendritas.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron transfectadas con receptores recombinantes TrkB fusionados al epítope flag (TrkB-flag). 48 horas después (9 DIV), se marcaron los receptores TrkB-flag en la membrana plasmática con anticuerpos anti-flag (producidos en ratones) conjugados a un fluoróforo por 30 minutos y luego se incubaron las neuronas con BDNF para inducir la endocitosis del receptor. En la imagen de la izquierda, se muestran los receptores en la periferia del cuerpo celular en neuronas sin estimular. La aplicación de BDNF por 30 minutos produce la internalización del receptor (en la imagen de la derecha). (B) Además, se probó la efectividad de la eliminación del remanente de anticuerpos antiflag no internalizados por medio de lavados con PBS/EDTA 1 mM. En la imagen superior izquierda, se muestran los receptores en la periferia del cuerpo derecha, se muestran neuronas estimuladas con BDNF y que fueron tratadas con PBS/EDTA. Posteriormente, estas neuronas fueron fijadas, permeabilizadas y se realizó una inmunofluorescencia para detectar los niveles totales del receptor (imágenes inferiores, en azul).

(C) Para determinar la participación de Rab11 en el reciclaje de receptores TrkB, neuronas de 7 DIV fueron co-transfectadas con EGFP o Rab11DN-EGFP y TrkB-flag. Después de 48 horas, las neuronas se incubaron durante 90 minutos en medio de depleción para evitar la acción de factores tróficos endógenos. Luego, las neuronas fueron lavadas con PBS frío e incubadas con anticuerpos anti-flag (producidos en ratones) conjugados a un fluoróforo (Alexa 594). Después de 30 minutos, las células se lavaron con PBS a 37° C y se estimularon con BDNF (50 ng/mL) durante 30 minutos. Después de la internalización de los receptores TrkB-flag, los anticuerpos que quedan en la superficie celular se eliminaron lavando las neuronas 3 veces con PBS/EDTA 1 mM. Los receptores reciclados en la superficie de la célula fueron marcados por incubación durante 60 minutos con anticuerpos anti-ratón conjugados a un fluoróforo diferente (en la imagen en azul). Los niveles de receptores reciclados es proporcional a la señal del anticuerpo anti-flag detectada de vuelta en la membrana plasmática. Finalmente, las neuronas se lavaron, se fijaron y las imágenes fueron capturadas por microscopía confocal. Barra indica 10 µm.

(**D**) La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los experimentos descritos en **C**, muestran que la expresión de Rab11DN disminuyó significativamente el reciclaje de los receptores TrkB en el cuerpo celular y en dendritas, en comparación con las neuronas que expresan EGFP. La cuantificación se realizó en n=18-33 cuerpos celulares y 40-62 dendritas, de 3 experimentos independientes. \*: p <0,01 y \*\*\*: p <0,0001.

Posteriormente, se evaluó si la GTPasa Rab11 podría regular el aumento en la arborización dendrítica inducida por BDNF. Siguiendo la misma metodología utilizada para determinar el papel de Rab5, se expresó en neuronas hipocampales el mutante Rab11DN o EGFP y se evaluaron los cambios morfológicos. Las neuronas que expresaron EGFP (usadas como control) y que fueron estimuladas con BDNF muestran un incremento

en la complejidad de la arborización dendrítica (Figura 17A), como muestra el análisis de Sholl y del número de ramificaciones en la Figura 17B y C.



Figura 17.- La expresión de mutante Rab11DN bloquea el aumento en la arborización dendrítica inducido por la estimulación durante 48 hrs con la neurotrofina BDNF. (A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas con vectores adenovirales para transducir la expresión del mutante Rab11DNo EGFP y luego estimuladas con BDNF por 48 hrs. Luego de fijarlas, se realizó una inmunofluorescencia para MAP2, se obtuvieron imágenes utilizando microscopía confocal y se sometieron a un posterior análisis morfométrico. (B) El análisis de Sholl muestra que la estimulación con BDNF produce un incremento significativo de la arborización dendrítica en neuronas que expresaron EGFP, efecto que es bloqueado de manera significativa por la presencia del mutante Rab11DN (n=16 neuronas por condición provenientes de 3 experimentos independientes; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001). (C) Además, la expresión del mutante Rab11DN bloqueó el aumento en los puntos de ramificación exhibida por las dendritas en respuesta a la estimulación con BDNF (\*\*\*, p<0,001).

La expresión del mutante Rab11DN no redujo la arborización dendrítica basal ni los puntos de ramificación luego de 48 horas de expresión, en comparación con las neuronas que expresaron sólo EGFP (Figura 17B y C). Sin embargo, Rab11DN bloqueó de manera significativa el incremento en la complejidad de la arborización dendrítica inducida por la estimulación con BDNF (Figura 17B y C). Este resultado comprueba la evidencia hallada previamente y además confirma la reproducibilidad de esta metodología para el estudio de la morfología neuronal en los efectos inducidos por BDNF (Lazo et al 2013).

Como resumen de este primer objetivo podemos decir que la estimulación con BDNF de neuronas hipocampales induce, en una primera instancia, la internalización de TrkB en endosomas postivos para Rab5 (endosoma temprano) tanto en el soma como en dendritas. Luego, una porción del receptor recicla de una manera dependiente de Rab11 en ambos compartimentos celulares (soma y dendritas). Además, el tránsito del receptor por esta ruta temprana-reciclaje desencadena los eventos necesarios para aumentar la arborización dendrítica inducida por BDNF.

### <u>Objetivo 2. Establecer si la actividad de Rab5 y Rab11 es necesaria para la activación del factor de transcripción CREB en respuesta a la estimulación con BDNF.</u>

4.3.- La activación de CREB es requerida para aumentar la arborización dendrítica inducida por BDNF.

Como fue descrito anteriormente, existen investigaciones que han indicado que la activación de CREB, por fosforilación en el residuo serina-133, es un paso clave en los cambios morfológicos inducidos por BDNF en neuronas del SNC (Finsterwald et al 2010). Por lo tanto, se evaluó si en nuestro modelo experimental también la activación de CREB es un paso necesario para modificar la morfología neuronal. Para llevar a cabo este experimento, se transfectaron neuronas hipocampales con una versión mutante dominante negativo de CREB que presenta la sustitución del aminoácido serina-133 por un residuo de alanina (CREB S133A) fusionado a un epítope flag.

Como muestra la Figura 18, las neuronas que expresaron el mutante CREBS133A fueron identificadas mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos dirigidos al epítope flag. La proteína mutante se expresó mayormente en el núcleo de neuronas hipocampales luego de 48 horas de realizada la transfección.



## Figura 18. Expresión del mutante dominante negativo de CREB (CREBS133A) en neuronas hipocampales.

Con el objetivo de evaluar el papel de CREB en los cambios morfológicos en respuesta a la estimulación con BDNF, se expresó en neuronas hipocampales una versión mutante dominante negativa de CREB que presenta la sustitución del aminoácido serina-133 por un residuo de alanina (CREB S133A) fusionada a un epítope flag, la que posteriormente se identificó por inmunofluorescencia (en rojo, utilizando anticuerpos anti-flag). Además se transfectó la proteína fluorescente verde (EGFP) y se delimitó el núcleo mediante la tinción con Hoechst 33258 (Hoe, en azul). Barra indica 10  $\mu$ m.

Luego de estandarizar la transfección del mutante CREB S133A, se evaluó el papel de CREB en los cambios morfológicos inducidos por BDNF. Como muestra la Figura 19A (panel superior), las neuronas que expresaron EGFP y que fueron estimuladas con BDNF muestran un incremento significativo en la complejidad de su arborización dendrítica y en el número de ramificaciones que muestran sus dendritas. La presencia del mutante CREB S133A no disminuyó la arborización dendrítica basal de las neuronas al compararlas con neuronas que expresan EGFP ni disminuyó el número de puntos de ramificación. Sin embargo, la presencia de CREB S133A previno el aumento en la arborización dendrítica y del número de puntos de ramificación inducidos por la estimulación con BDNF observados en neuronas controles expresando EGFP (Figura 19A, panel inferior), mostrando que la fosforilación del residuo serina-133 en CREB es un evento requerido para los cambios morfológicos inducidos por BDNF en neuronas hipocampales (Figura 19B y 19C).



Figura 19. La expresión de mutante dominante negativo de CREB (CREBS133A) previene el aumento en la arborización dendrítica y de puntos de ramificación inducido por BDNF.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron transfectadas para conducir a la expresión de mutante dominante negativo de CREB (CREBS133A) que presenta la sustitución del residuo de serina 133 por una alanina y que además está fusionado al epítope FLAG o sólo EGFP como control y luego estimuladas con BDNF por 48 hrs. Luego de fijarlas, se realizó una inmunofluorescencia para MAP2, se obtuvieron imágenes utilizando microscopía confocal y se sometieron a un posterior análisis morfométrico. (**B**) El análisis de Sholl muestra que las neuronas que expresan CREB S133A exhiben un menor incremento en su ramificación dendrítica en respuesta a BDNF comparado con las neuronas que expresan sólo EGFP. Además, el mutante CREB S133A disminuyó el número de puntos de ramificación que presentan sus dendritas, respecto a neuronas que expresaron EGFP (N= 18 neuronas por condición desde 3 experimentos independientes. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001).

# 4.4.- La actividad de Rab5 y Rab11 es requerida para la activación del factor de transcripción CREB inducida por BDNF.

Para evaluar la participación de Rab5 y Rab11 en la activación de CREB dependiente de BDNF, se utilizó el mismo modelo experimental que el efectuado para determinar el papel de Rab5 y Rab11 en el aumento de la arborización dendrítica inducida por BDNF (Figura 4). Solo que esta vez, las neuronas (9DIV) fueron estimulas por distintos tiempos con BDNF (15-60 minutos) y posteriormente se realizó una inmunofluorescencia para detectar la fosforilación de CREB en el residuo serina-133 (pCREB) utilizando un anticuerpo fosfo-específico. El procedimiento utilizado para la adquisición y análisis de las imágenes están detallados en la Figura 6. Los resultados obtenidos indicaron que las neuronas controles (expresando EGFP) sin estímulo mostraron un bajo nivel de señal correspondiente a pCREB (Figura 20A). Como era de esperarse, el tratamiento con BDNF por 15 minutos produjo un incremento significativo en la señal de pCREB nuclear, la cual fue mantenida a los 30 y a los 60 minutos de estimulación. En cambio, la activación de pCREB mediada por BDNF fue completamente prevenida por la expresión del mutante Rab5DN en todos los tiempos de estimulación (Figura 20B).



Figura 20. La expresión de mutante Rab5DN previno la activación de CREB (pCREB) producida por la estimulación con BDNF.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas por 48 hrs con vectores adenovirales para transducir la expresión de mutante dominante negativo de Rab5 fusionado a EGFP (Rab5DN) o EGFP, y fueron estimuladas durante 0 (control), 15, 30 y 60 min con BDNF (50 ng/mL). Luego, las neuronas se fijaron y se evaluaron los niveles de fosforilación de CREB en el residuo serina-133 (pCREB, en rojo), mediante microscopía de fluorescencia. Para definir el núcleo, se utilizó Hoechst 33258 (azul). (B) La cuantificación de pCREB en el núcleo indicó que la expresión de Rab5DN disminuye significativamente la activación de CREB en respuesta a BDNF, en comparación con las neuronas que expresaron EGFP (N=42-62 células por condición desde 3 experimentos independientes; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0.01. Barra indica 10  $\mu$ m.

Resultados similares fueron obtenidos con la expresión del mutante Rab11DN. Nuevamente, las neuronas controles que expresan EGFP mostraron un incremento en la señal correspondiente a pCREB luego de 15-60 minutos de estimulación con BDNF, este efecto fue suprimido por la expresión del mutante Rab11DN (Figura 21A y 21B).



Figura 21. La expresión de mutante Rab11DN previno la activación de CREB (pCREB) producida por la estimulación con BDNF.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas por 48 hrs con vectores adenovirales para transducir la expresión de mutante dominante negativo de Rab11 fusionado a EGFP (Rab11DN) o EGFP, y fueron estimuladas durante 0 (control), 15, 30 y 60 min con BDNF (50 ng/mL). Luego, las neuronas se fijaron y se evaluaron los niveles de fosforilación de CREB en el residuo serina-133 (pCREB, en rojo), mediante microscopía de fluorescencia. Para definir el núcleo, se utilizó Hoechst 33258 (azul). (B) La cuantificación de pCREB en el núcleo indicó que la expresión de Rab11DN disminuye significativamente la activación de CREB en respuesta a BDNF, en comparación con las neuronas que expresaron EGFP (N=54-112 células por condición desde 4 experimentos independientes; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001. Barra indica 10  $\mu$ m.

Además de los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia, estudiamos el papel de Rab5 y Rab11 en la activación de CREB inducida por BDNF mediante Western blot. Los resultados obtenidos indican que las neuronas controles que expresan EGFP y que no fueron estimuladas con BDNF presentan una activación basal del FT (tenue banda que migra hasta los 43 kDa) (Figura 22A). La expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN previno la fosforilación de CREB en respuesta a la estimulación con BDNF (Figura 22A y B), obteniendo el mismo resultado que con la técnica de immunofluorescencia. Al mismo tiempo, en estas muestras se evaluaron los niveles de CREB total (se identificó una banda que migró en el peso molecular esperado de 43 kDa) Los niveles de CREB no cambiaron por la expresión durante 48 horas de los mutantes Rab5DN y Rab11DN al comparar con neuronas controles que expresaron EGFP (Figura 22A y B).


Figura 22. La expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN bloqueó la activación de CREB (pCREB) producida por la estimulación con BDNF.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas por 48 hrs con vectores adenovirales para transducir la expresión de los mutantes Rab5DN, Rab11DN o EGFP y fueron estimuladas durante 30 min con BDNF (50 ng/mL). Luego, las neuronas fueron lisadas y se analizaron los niveles de fosfo-CREB (pCREB) y CREB total mediante Western blot. (B) La expresión de ambos mutantes Rab5DN y Rab11DN disminuyó significativamente la activación de CREB inducida por BDNF, en comparación con las neuronas que expresaron EGFP (Cuantificación de 4 experimentos independientes; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01).

Para estudiar con mayor profundidad el papel de Rab11 en la activación de CREB inducida por BDNF, se evaluó el efecto de la expresión de un mutante constitutivamente activo de Rab11 (Rab11CA) (Ren et al 1998). Neuronas hipocampales (9 DIV) se estimularon con BDNF por 15-60 minutos. Luego, se determinaron los niveles de pCREB, como fue descrito previamente para los mutantes Rab5DN y Rab11DN (Figura 6). Como se muestra en la Figura 23 (y anteriormente en la Figura 20 y 21), las neuronas controles que expresaron EGFP mostraron un aumento en la intensidad de fluorescencia correspondiente a pCREB en el núcleo luego del tratamiento con BDNF. La expresión del mutante Rab11CA no modificó de manera significativa el aumento en la señal correspondiente a pCREB luego de la estimulación con BDNF por 15 y 30 minutos en comparación con neuronas controles (Figura 23B). Sin embargo, las neuronas que expresaron Rab11CA mostraron una mayor respuesta a BDNF a los 60 minutos de estimulación (aumento de 1,8  $\pm$  0,09 veces respecto a neuronas no estimuladas), en comparación con las neuronas controles que expresaron EGFP (aumento de 1,5  $\pm$  0,08 veces respecto a neuronas no estimuladas).



Figura 23. La expresión de mutante constitutivamente activo de Rab11 (Rab11CA) aumentó la activación de CREB (pCREB) producida por la estimulación prolongada con BDNF.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas por 48 hrs con vectores adenovirales para transducir la expresión del mutante constitutivamente activo de Rab11 fusionado a EGFP (Rab11CA) o EGFP, y fueron estimuladas durante 0 (control), 15, 30 y 60 min con BDNF (50 ng/mL). Luego, las neuronas se fijaron y se evaluaron los niveles de fosforilación de CREB en el residuo serina-133 (pCREB, en rojo), mediante microscopía de fluorescencia. Para definir el núcleo, se utilizó Hoechst 33258 (azul). (B) La cuantificación de pCREB en el núcleo indicó que la expresión de Rab11CA no altera la activación de CREB en respuesta a tiempos cortos de estimulación con BDNF (15 y 30 minutos), en comparación con las neuronas que expresaron EGFP. Sin embargo, las neuronas que expresaron Rab11CA presentan mayores niveles de pCREB en el núcleo luego de 60 minutos de estimulación con BDNF, en comparación con neuronas que expresaron EGFP (N=30-85 células por condición desde 4 experimentos independientes; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0.001). Barra indica 10  $\mu$ m.

Este resultado sugiere que la presencia del mutante Rab11CA podría conducir a una mayor sensibilidad a la estimulación con BDNF. Para evaluar esta posibilidad se realizó un experimento de activación de CREB a concentraciones limitantes de BDNF por 15 minutos (0.5, 5 y 50 ng/mL ó 0.02, 0.2 y 2 nM de BDNF) y se evaluaron cambios en la intensidad de pCREB en el núcleo. Los resultados mostraron que la expresión del mutante Rab11CA incrementó la activación de CREB a bajas concentraciones de BDNF (0,5 y 5 ng/mL), lo que no fue observado en neuronas controles que expresan EGFP. A mayores concentraciones de BDNF (50 ng/mL), no se observaron diferencias en la intensidad de pCREB en el núcleo entre neuronas que expresan Rab11CA y controles EGFP (Figura 24).



Figura 24. La expresión de mutante constitutivamente activo de Rab11 (Rab11CA) aumentó la respuesta de neuronas hipocampales a bajas concentraciones de BDNF.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas por 48 hrs con vectores adenovirales para transducir la expresión del mutante constitutivamente activo de Rab11 fusionado a EGFP (Rab11CA) o EGFP, y fueron estimuladas durante 30 minutos con concentraciones ascendentes de BDNF (0-50 ng/ml). Posteriormente, las neuronas se fijaron y se evaluaron los niveles de fosforilación de CREB en el residuo serina-133 (pCREB, en rojo), mediante microscopía de fluorescencia. Para definir el núcleo, se utilizó Hoechst 33258 (azul). (B) La cuantificación de estos experimentos indicó que la expresión de Rab11CA produjo que las neuronas exhibieran un incremento significativo en los niveles de pCREB luego de la estimulación con bajas cantidades de BDNF (0,5 y 5 ng/mL), lo cual no fue observado en las neuronas que expresaron EGFP. A mayores concentraciones de BDNF (50 ng/mL), no se observaron diferencias entre ambos grupos experimentales (N = 38-50 neuronas desde 3 experimentos independientes; \*\*\*, p<0,001. Barra indica 10  $\mu$ m.

Este resultado se suma a los hallados en nuestro laboratorio (Lazo et al 2013), en que utilizando un modelo de estudio idéntico al del presente estudio, la sola expresión de Rab11CA por 48 horas produjo un incremento en los niveles de TrkB en dendritas y un aumento en la arborización dendrítica que dependió de los niveles endógenos de BDNF. Sumando estas evidencias, los datos obtenidos apoyan un modelo en el que la movilización de receptores TrkB hacia las dendritas dependen de la actividad de Rab11, lo cual conduce a una mayor sensibilidad a cantidades limitadas de BDNF.

En resumen, los datos obtenidos tanto por inmunofluorescencia como por Western blot muestran que la actividad de las GTPasas Rab5 como Rab11 es requerida para la activación del factor de transcripción CREB producida por la estimulación con BDNF. Además, el incremento de la actividad de la GTPasa Rab11 promovería la activación de CREB por mayores tiempos y aumentaría la sensibilidad de TrkB a cantidades limitadas de BDNF. Con el fin de estudiar la participación de Rab5 y Rab11 en la señalización inducida por BDNF, se evaluaron los niveles de expresión y activación tanto del receptor TrkB, como la activación de 2 rutas de señalización activadas por el receptor TrkB como son la vía PI3K/Akt y ERK 1/2 en neuronas hipocampales (9 DIV) mediante Western blot. La activación (evaluada por los niveles de fosforilación de las proteínas) de TrkB, Akt y ERK 1/2 en respuesta a BDNF fue evaluada a 2 tiempos: un tiempo corto de estimulación (5 minutos) para evaluar la activación temprana y un tiempo mayor de estimulación (120 minutos), para evaluar la activación sostenida de estas proteínas. Para determinar la participación de Rab5 y Rab11, en neuronas hipocampales de 7 DIV se expresaron los mutantes Rab5DN y Rab11DN además de EGFP (situación control) por 48 horas.

Como muestra la Figura 25, las neuronas controles que expresaron EGFP y que fueron estimuladas con BDNF por 5 minutos mostraron un aumento en los niveles de fosforilación de TrkB, Akt y ERK1/2. Esta activación temprana inducida por la estimulación con BDNF no se vio disminuida por la presencia de los mutantes Rab5DN y Rab11DN (Figura 25). Sin embargo, la presencia de ambos mutantes dominante negativo disminuyó la activación sostenida del receptor y de los mediadores Akt y ERK1/2, respecto a las neuronas que expresaron EGFP. Es importante destacar que la expresión de Rab5DN y Rab11DN no disminuyó los niveles totales de TrkB, Akt ni ERK1/2 (Figura 25). Por lo tanto, los datos sugieren que la mantención por tiempos prolongados de la señalización intracelular inducida por BDNF requiere del tráfico regulado por la actividad de Rab5 y Rab11.



# Figura 25. La expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN disminuye la activación sostenida de TrkB, ERK1/2 y Akt en respuesta a BDNF, sin modificar su activación transitoria.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron infectadas con particulas adenovirales para transducir la expresión de EGFP además de las versiones mutantes dominante negativo de Rab5 y Rab11. 48 horas después las neuronas se estimularon con BDNF (50 ng/mL) durante 0 (neuronas control), 5 y 120 minutos para luego ser lisadas y sometidas a análisis por Western blot. La presencia de Rab5DN y Rab11DN disminuyó la activación tanto de TrkB (evaluando los niveles de fosforilación de receptores Trk usando un anticuerpo general dirigido a la secuencia que contiene pTyr490 del receptor TrkA), Akt (evaluando los niveles de pSer473) y ERK1/2 (evaluando pThr202/pTyr204) a los 120 minutos de estimulación con BDNF (activación sostenida) sin afectar la activación de éstas proteínas a los 5 minutos de estimulación con BDNF (activación transiente). (B) La cuantificación de los resultados obtenidos en los western blots se realizó estandarizando la intensidad de las bandas obtenidas con los anticuerpos fosfo-específicos respecto a la intensidad de las bandas obtenidas con los anticuerpos que reconocen la proteína total correspondiente. La 5 experimentos independientes realizada mediante cuantificación de análisis densitométrico mostró una disminución de la activación tanto de TrkB, Akt y ERK1/2 a los 120 minutos de estimulación con BDNF sin afectar la activación de éstas proteínas a los 5 minutos de estimulación con BDNF (\*, p<0.05).

### 4.6.- ERK1/2 es requerida para la activación de CREB en respuesta a BDNF en neuronas hipocampales.

Dado que se ha mostrado que la activación de ERK1/2 activa a CREB en respuesta a la estimulación con BDNF en neuronas del SNC (Arthur et al 2004, Finkbeiner et al 1997) y que además CREB puede modificar la expresión génica luego de ser fosforilado por Akt en el residuo serina-133 (Du & Montminy 1998), nos propusimos evaluar en nuestro modelo de estudio la participación de estas vías de señalización en la activación de CREB luego de la estimulación con BDNF. Para ello, las neuronas fueron tratadas con BDNF en presencia de LY294002, un inhibidor de PI3K, o con PD98059, un inhibidor de MEK1 (quinasa que activa a ERK1/2). La Figura 26 muestra que en ausencia de estimulación, los niveles de fosforilación de CREB en el núcleo son bajos. Luego de la estimulación con BDNF (15 minutos) se observó un incremento de la señal nuclear de pCREB, que fue prevenido por el pre-tratamiento de las neuronas con el inhibidor de la actividad tirosina quinasa de receptores Trks, K252a (Tapley et al 1992), sugiriendo que BDNF produce un aumento significativo de los niveles de pCREB en el núcleo a través de la activación de su receptor TrkB (Figura 26A y B). Además, PD98059 inhibió completamente el aumento de la señal correspondiente a pCREB en respuesta a la estimulación con BDNF (Figura 26A y B). En cambio el tratamiento con LY294002, no redujo el aumento en la señal correspondiente a pCREB en el núcleo luego de la estimulación con BDNF, indicando que la activación de PI3K/Akt no es requerida para la activación de CREB inducida por BDNF en neuronas hipocampales (Figura 26A y B).

Para comprobar la acción inhibitoria de LY294002, se determinó la activación de Akt en respuesta a BDNF mediante Western blot en ausencia y en presencia de esta molécula. Como se muestra en la Figura 26C, la estimulación de las neuronas con BDNF produjo un aumento en la activación del receptor TrkB como en Akt en comparación con neuronas no estimuladas con BDNF. El pre-tratamiento con LY294002 previno el aumento de los niveles de pAkt en respuesta a BDNF, sin alterar el incremento en los niveles de pTrkB, indicando que el inhibidor puede bloquear de manera efectiva la ruta de señalización río abajo de PI3K.



Figura 26. La inhibición de la vía MAP quinasa (ERK 1/2) bloquea la activación de CREB inducida por BDNF.

(A) Cultivos neuronales de hipocampo de rata (9 DIV) fueron estimuladas con BDNF (50 ng/mL por 15 minutos) en presencia o ausencia del inhibidor de MEK1/2 (quinasa que actúa río arriba de ERK 1/2) PD98059, del inhibidor de la ruta PI3K/Akt LY294002 o con el inhibidor de la actividad tirosina quinasa del receptor TrkB, K252a, se fijaron y se evaluaron los niveles de fosforilación del residuo serina-133 del factor de transcripción CREB en el núcleo (pCREB, en rojo), mediante microscopía de fluorescencia. Para definir el núcleo, se utilizó Hoechst 33258 (azul) y para definir la morfología de las neuronas se utilizó la tinción para MAP2 (verde). (B) La cuantificación de los niveles de pCREB en el núcleo muestra que la inhibición de MEK1/2 bloquea completamente la activación de CREB inducida por BDNF en nuestro modelo de estudio (n=30 neuronas por condición de 3 experimentos independientes. \*\*\*, p<0,001; N.S., p>0,05). Barra indica 10  $\mu$ m. (C) El pre-tratamiento con LY294002 previno el aumento de los niveles de pAkt en respuesta a BDNF, sin alterar el incremento en los niveles de pTrkB.

# 4.7.- La actividad de Rab5 y Rab11 es requerida para la activación de ERK1/2 en dendritas, soma y núcleo en respuesta a BDNF en neuronas hipocampales.

Dado que demostramos el requerimiento de la ruta ERK1/2 en la activación de CREB en respuesta a BDNF (Figura 26) y que la expresión de Rab5DN y Rab11DN disminuye la activación sostenida de ERK1/2 (Figura 25), procedimos a estudiar en mayor detalle los efectos de la expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN en la activación de las MAP quinasas ERK1/2 en respuesta a BDNF mediante inmunofluorescencia. Esta técnica nos permitió visualizar la localización subcelular de ERK1/2 activada. Para esto usamos un anticuerpo fosfo-específico para ERK1/2. Es importante destacar que ERK puede ser transportado hasta el núcleo y producir la activación de factores de transcripción entre ellos CREB (Impey et al 1998, Plotnikov et al 2011). Para llevar a cabo este objetivo, previamente se evaluó la utilidad y especificidad de la immunotinción observada con el anticuerpo anti-pERK en neuronas hipocampales. Estas fueron estimuladas por 15 minutos en presencia o ausencia del inhibidor PD98059. Como se muestra en la Figura 27A, las neuronas que no fueron estimuladas con BDNF mostraron bajos niveles de intensidad de fluorescencia correspondiente a pERK. Esta señal se ve fuertemente incrementada luego de la estimulación con BDNF. Interesantemente, el incremento en la intensidad de fluorescencia fue detectado en las dendritas, somas y en el núcleo de las neuronas, sugiriendo el transporte de ERK activado al núcleo el cual fue identificado por tinción con Hoechst 33258. Estos incrementos fueron prevenidos por el pre-tratamiento con PD98059 por 1 hora previo a la estimulación con BDNF, lo cual fue confirmado por la cuantificación de la intensidad de la señal correspondiente a pERK en el núcleo y somas de las neuronas estudiadas (Figura 27B). Por lo tanto, el anticuerpo utilizado en esta tesis que identifica a ERK1/2 en su estado fosforilado (pERK) es capaz de detectar cambios en los niveles de activación de ERK en respuesta a BDNF en distintas estructuras de la neurona mediante inmunofluorescencia.



Figura 27. La inhibición de MEK1, quinasa que actúa río arriba de ERK1/2 disminuyó la activación de ERK1/2 (pERK1/2) en respuesta a BDNF.

(A) Neuronas hipocampales de 9 DIV se estimularon con BDNF por 15 minutos en presencia o ausencia del inhibidor de la quinasa MEK1, PD98059 (1 hora antes de la estimulación con BDNF, 30  $\mu$ M). A continuación, las neuronas fueron fijadas y se evaluaron los niveles de pERK1/2 utilizando un anticuerpo que reconoce los residuos fosforilados treonina-202 y tirosina-204 (pThr<sup>202</sup>/pTyr<sup>204</sup>, en la figura en color rojo). Además se delimitó el núcleo con Hoechst 33258 (azul) y la morfología neuronal con MAP2 (rojo). Barra indica 10  $\mu$ m. (B) La cuantificación de la intensidad de fluorescencia muestra que la presencia de PD98059 disminuyó significativamente la activación de pERK1/2 producida por la estimulación con BDNF en el núcleo y en los somas de neuronas hipocampales (N = 20 neuronas, a partir de 3 experimentos independientes).

Luego procedimos a estudiar el papel de Rab5 y Rab11 en la activación de ERK1/2 por immunofluorescencia. Para esto neuronas hipocampales (9 DIV) fueron estimuladas por 15 y 60 minutos con BDNF, fijadas y se evaluó la fosforilación de ERK1/2 en el núcleo, somas y dendritas, utilizando el anticuerpo fosfo-específico validado anteriormente. El procedimiento utilizado para la adquisición y análisis de las imágenes están detallados en la Figura 8. Los resultados mostrados en la Figura 28, indican que las neuronas que expresaron EGFP mostraron una intensidad de fluorescencia baja previo a la estimulación con BDNF, la que se mostró fuertemente aumentada tanto en el núcleo, soma y dendritas luego de la estimulación por 15 minutos con BDNF. Luego de 60 minutos de estimulación con BDNF, la señal correspondiente a pERK1/2 comienza a disminuir en todos los compartimentos estudiados respecto a los 15 minutos de estimulación, pero aún es mayor en comparación con neuronas no estimuladas. La expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN previno de manera significativa el aumento en pERK1/2 (núcleo, soma y dendritas) inducido por la estimulación por 15 minutos con BDNF en comparación con las neuronas controles que expresaron EGFP. La presencia de Rab5DN bloqueó completamente la activación de ERK dependiente de BDNF en todos los compartimentos analizados a los 15 y 60 minutos de estimulación. La presencia de Rab11DN disminuyó la activación de ERK1/2 en todos los compartmentimentos subcelulares de manera significativa a los 15 minutos de estimulación. En cambio, a los 60 minutos de estimulación con BDNF, la expresión de Rab11DN inhibió solamente la activación de ERK1/2 en el núcleo (Figura 28).

En consecuencia, los datos obtenidos tanto por Western blot como por inmunofluorescencia indican que la actividad de Rab5 y Rab11 se requiere para producir la activación sostenida de ERK1/2 en dendritas soma y en el núcleo luego de la estimulación con BDNF.





### Figura 28. La expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN disminuyó la activación y translocación al núcleo de ERK1/2 (pERK 1/2) producido por la estimulación con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo.

(A) Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron transducidas con partículas adenovirales para expresar los mutantes Rab5DN, Rab11DN (fusionadas a EGFP) y EGFP como control y luego de 48 hrs se estimularon las neuronas con BDNF (50 ng/mL) durante 15 y 60 minutos. Luego, las neuronas fueron fijadas y se evaluaron los niveles de pERK 1/2 utilizando un anticuerpo que reconoce los residuos fosforilados treonina-202 y tirosina-204 (pThr<sup>202</sup>/pTyr<sup>204</sup>, en la figura en color rojo). Además, se identificó el núcleo mediante la tinción Hoechst 33258 (en la figura se muestra en líneas punteadas). Barra indica 10 µm. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de pERK 1/2 evaluada en el núcleo, soma y dendritas luego de la estimulación con BDNF en neuronas que expresaron EGFP y los mutantes Rab5DN y Rab11DN (N= 30 núcleos y somas por condición, N=60 dendritas por condición desde 3 experimentos independientes; \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001).

#### <u>Objetivo 3. Determinar si la estimulación con BDNF puede modificar los niveles de</u> <u>Rab5a y Rab11a.</u>

4.8. BDNF aumenta los niveles de proteínas de Rab5a de una manera dependiente de la transcripción, traducción y la vía mTOR.

Con el objetivo de estudiar si BDNF podría aumentar la transcripción de *Rab5a* y *Rab11a* se trataron neuronas hipocampales de 8-9 DIV con BDNF durante 4 y 12 horas (para finalizar experimentos al 9 DIV). Luego, se determinaron cambios en los niveles de expresión de *Rab5a* y *Rab11a* mediante qPCR. Como control positivo de la estimulación con BDNF se evaluó el aumento en los niveles de expresión de *Arc* ("*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*").Este gen está clasificado como un gen de respuesta temprana y es un blanco transcripcional conocido de la estimulación con BDNF (Ying et al 2002).

Como se ve en la Figura 29, las neuronas que fueron estimuladas durante 4 y 12 horas con BDNF mostraron un incremento significativo en los niveles de *Rab5a* (aumento de 3,2  $\pm$  0,6 veces a las 4 horas y 2,0  $\pm$  0,4 veces a las 12 horas en comparación con neuronas no estimuladas) y *Arc* (aumento de 10,2  $\pm$  3,7 veces a las 4 horas y 8,5  $\pm$  1,8 veces a las 12 horas en comparación con neuronas no estimuladas). Sin embargo, la estimulación con BDNF por 4 y 12 horas no modificó los niveles de *Rab11a* (1,2  $\pm$  0,3 veces a las 4 horas y 1,2  $\pm$  0,2 veces a las 12 horas en comparación con neuronas no estimuladas).



Figura 29. La estimulación de neuronas hipocampales por 4 y 12 horas con BDNF aumentó los niveles de RNAm de Rab5a, sin alterar los niveles de Rab11a.

Neuronas hipocampales de entre 8 y 9 DIV (según corresponda) se estimularon con BDNF (50 ng/mL) durante 4 (panel **A**) y 12 horas (panel **B**). Luego, a partir del RNA total extraído mediante el protocolo descrito por el reactivo Trizol (Ambion RNA, Life Technologies) se analizaron los niveles de mRNA de *Rab5a* y *Rab11a* mediante qPCR. Los niveles de expresión relativa de *Rab5a* y *Rab11a* se obtuvieron normalizando los datos obtenidos respecto a la expresión de 3 genes utilizados como normalizadores ( $\beta$ -actina; TATA-box binding protein, tbp y fosfoglicerato kinasa-1, Pgk-1). Como control positivo de la estimulación con BDNF se evaluó el cambio en los niveles del gen *Arc*. La cuantificación de los niveles relativos de los genes (mostrados como veces de cambio respecto a las neuronas no estimuladas con BDNF) muestra que la estimulación con BDNF durante 4 y 12 hrs aumentó significativamente la expresión de *Rab5* y *Arc*, sin alterar los niveles de Rab11. Los datos se obtuvieron realizando 3 experimentos independientes (\*, p<0,05).

Para determinar si los aumentos en la transcripción de *Rab5a* inducidos por BDNF se traducen en un aumento en los niveles de proteínas, neuronas hipocampales de 8 DIV fueron estimuladas con BDNF por 24 horas en ausencia o presencia de Actinomicina D (ActD), un inhibidor de la transcripción. La Figura 30A, muestra que la estimulación con BDNF produce un incremento en la banda correspondiente a Rab5a (~25 kDa) a las 24 horas de tratamiento con BDNF. El aumento de los niveles proteicos de Rab5 fueron inhibidos por ActD (Figura 30B), sugiriendo que el aumento en la transcripción de *Rab5a,* es responsable del aumento de los niveles de la proteína inducido por BDNF. También evaluamos si el aumento de los niveles de Rab5a inducido por BDNF es sensible al inhibidor de la traducción de proteínas, cicloheximida (CHX). Como se observa en la Figura 30C, el tratamiento con cicloheximida también disminuyo los niveles de Rab5a. La droga disminuyó tanto el aumento inducido por BDNF como los niveles basales. En su conjunto estos datos sugieren que los niveles de Rab5a inducidos por BDNF son regulados a nivel transcripcional y traduccional. Finalmente, sabiendo que BDNF activa la traducción de proteínas mediante la activación de mTOR (Schratt et al 2004, Takei et al 2004) evaluamos si el aumento en los niveles proteicos de Rab5a son sensibles a rapamicina (RAPA), un inhibidor de la vía mTOR. La Figura 30D, muestra que los niveles de Rab5a no son modificados por la estimulación por 4 horas con BDNF. Sin embargo, el aumento de los niveles de Rab5a inducidos por 12 horas con BDNF es reducido por RAPA (Figura 30E), sugiriendo que BDNF regula la traducción de Rab5a a través de la activación de mTOR.



## Figura 30. BDNF aumentó el contenido de proteína de Rab5a, que es dependiente de de la transcripción y además de la traducción de proteinas regulada por la vía mTOR.

(A, arriba) Neuronas hipocampales de 8 DIV fueron estimuladas con BDNF (50 ng/mL) y luego de 24 horas fueron lisadas y se analizaron los niveles de proteína de Rab5 y  $\beta$ III-tubulina mediante Western blot. (A, abajo) La cuantificación por densitometría (relativa a los niveles de  $\beta$ III-tubulina) mostró que la estimulación con BDNF incrementó significativamente los niveles de Rab5a, en comparación con los niveles de éstas proteínas en neuronas no estimuladas con BDNF (Cuantificación de 5 experimentos independientes; \*, p<0.05).

(**B**, arriba) Neuronas hipocampales de 8 DIV fueron estimuladas con BDNF (50 ng/mL) en presencia o ausencia de Actinomicina D (ActD, 5  $\mu$ M en DMSO 30 minutos antes de las estimulaciones), luego de 24 horas fueron lisadas y se analizaron los niveles de proteína de Rab5a y  $\beta$ III-tubulina mediante Western blot. (**B**, abajo) La cuantificación por densitometría (relativa a los niveles de  $\beta$ III-tubulina) mostró que la estimulación con BDNF incrementó significativamente los niveles de Rab5a en comparación con los niveles de éstas proteínas en neuronas no estimuladas con BDNF (tratadas con el vehículo, DMSO). La presencia de ActD bloqueó el aumento de Rab5a inducido por BDNF (Cuantificación de 3 experimentos independientes, \*: p < 0,05, \*\*\*: p < 0,001).

(C, arriba) Neuronas hipocampales de 8 DIV fueron estimuladas con BDNF (50 ng/mL) en presencia o ausencia de cicloheximida (CHX, 25  $\mu$ M) y luego de 24 hrs fueron lisadas y se analizaron los niveles de proteína de Rab5a y  $\beta$ III-tubulina mediante Western blot. (C, abajo) La cuantificación por densitometría (relativa a los niveles de la proteína  $\beta$ III-tubulina) mostró que la presencia de CHX bloqueó el aumento de Rab5a inducido por BDNF (Cuantificación de 3 experimentos independientes, \*: p < 0.05).

(**D**-E, arriba) Neuronas hipocampales de 8-9 DIV fueron estimuladas con BDNF (50 ng/mL) por 4 y 12 horas en presencia o ausencia de Rapamicina (RAPA, 200 nM, una hora previa a la estimulación con BDNF) y luego fueron lisadas y se analizaron los niveles de proteína de Rab5a y  $\beta$ III-tubulina mediante Western blot. (**D**-E, abajo) La cuantificación por densitometría mostró que la estimulación con BDNF sólo por 12 hrs incrementó significativamente los niveles de Rab5a en comparación con los niveles de éstas proteínas en neuronas no estimuladas con BDNF (tratadas con vehículo, etanol). Además, la inhibición de la vía mTOR bloquea los efectos de BDNF (Cuantificación de 4 experimentos independientes, \*: p < 0.05).

Dado que los niveles de *Rab11a* no son regulados a nivel transcripcional (Figura 29), se evaluó si los niveles proteicos de Rab11a son regulados por BDNF a nivel de la traducción de una manera dependiente de mTOR, igual que lo encontrado para Rab5a. Como se observa en la Figura 31A, luego de 24 horas BDNF aumenta los niveles proteicos de Rab11a, efecto que fue inhibido tanto por CHX como por RAPA (Figura 31B y 31D), mostrando que BDNF regula los niveles de Rab11a de una manera dependiente de la traducción vía mTOR, a los tiempos de tratamiento estudiados.



### Figura 31. BDNF aumentó el contenido de proteína de Rab11a, que es dependiente de la traducción de proteínas regulada por la vía mTOR.

(A, arriba) Neuronas hipocampales de 8 DIV fueron estimuladas con BDNF (50 ng/mL) y luego de 24 horas fueron lisadas y se analizaron los niveles de proteína de Rab11a y  $\beta$ III-tubulina mediante Western blot. (A, abajo) La cuantificación por densitometría (relativa a los niveles de  $\beta$ III-tubulina) mostró que la estimulación con BDNF incrementó significativamente los niveles de Rab11a, en comparación con los niveles de éstas proteínas en neuronas no estimuladas con BDNF (Cuantificación de 5 experimentos independientes; \*, p<0.05).

(**B**, arriba) Neuronas hipocampales de 8 DIV fueron estimuladas con BDNF (50 ng/mL) en presencia o ausencia de cicloheximida (CHX, 25  $\mu$ M) y luego de 24 hrs fueron lisadas y se analizaron los niveles de proteína de Rab11a y  $\beta$ III-tubulina mediante Western blot. (**C**, abajo) La cuantificación por densitometría (relativa a los niveles de la proteína  $\beta$ III-tubulina) mostró que la presencia de CHX bloqueó el aumento de Rab11a inducido por BDNF (Cuantificación de 3 experimentos independientes, \*: p < 0.05).

(C-D, arriba) Neuronas hipocampales de 8-9 DIV fueron estimuladas con BDNF (50 ng/mL) por 4 y 12 horas en presencia o ausencia de Rapamicina (RAPA, 200 nM, una hora previa a la estimulación con BDNF), luego fueron lisadas y se analizaron los niveles de proteína de Rab11a y  $\beta$ III-tubulina mediante Western blot. (C-D, abajo) La cuantificación por densitometría mostró que la estimulación con BDNF sólo por 12 hrs incrementó significativamente los niveles de Rab11a en comparación con los niveles de éstas proteínas en neuronas no estimuladas con BDNF (tratadas con vehículo, etanol). Además, la inhibición de la vía mTOR bloquea los efectos de BDNF (Cuantificación de 4 experimentos independientes, \*: p < 0.05).

En su conjunto, los datos obtenidos sugieren que la estimulación con BDNF puede modificar los niveles de proteína de Rab5 y Rab11 en neuronas hipocampales en cultivo mediante un mecanismo complejo. En el caso de Rab5a, BDNF produce cambios a nivel transcripcional aumentando la cantidad de RNAm de Rab5a que luego a través de un mecanismo que requiere de la vía mTOR conduce a un aumento en los niveles de la proteína. En cambio, BDNF regula la expresión de Rab11a solo a nivel traduccional por un mecanismo que depende de mTOR, en neuronas hipocampales en cultivo.

### <u>Objetivo 4. Evaluar si Rab11 favorece los cambios en la expresión de genes inducidos por la estimulación con BDNF.</u>

4.9.- Rab11 regula los cambios de expresión de genes inducidos por la estimulación con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo.

Nuestros datos indican que la fosforilación del factor de transcripción CREB en el núcleo luego de la estimulación con BDNF requiere de la ruta temprana y de reciclaje regulada por Rab5 y Rab11, respectivamente. Ha sido descrito que la fosforilación de CREB en el residuo serina-133 es un paso clave, pero no suficiente para producir cambios en la transcripción génica (Zhang et al 2005). Por lo tanto, nos quedó demostrar que la inhibición de la activación de CREB inducida por BDNF (medida por un aumento de la fosforilación en serina-133) en neuronas que expresan Rab11DN, resulta en la inhibición de la transcripción dependiente de BDNF. Se eligió estudiar el papel de Rab11 dado que está río abajo de Rab5 y los efectos sobre la arborización dendrítica son menos pronunciados que los observados con la expresión de Rab5DN (mirar Figuras 11 y 17). De hecho, la expresión de Rab5DN resulta en una disminución de la arborización basal de las neuronas (Figura 11). Para estudiar, si la expresión de Rab11DN en neuronas hipocampales inhibe la expresión de genes dependientes de la estimulación por BDNF, neuronas (9 DIV) fueron estimuladas con BDNF o vehículo (BSA) por 4 horas y se aisló el RNA total y posteriormente se evaluaron los cambios de expresión de genes utilizando un sistema de arreglo de oligos para PCR cuantitativo (qPCR) "Rat cAMP/Ca<sup>2+</sup> PathwavFinder RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (SABioscience, Qiagen, MD, EEUU)", el cual permite el análisis de 84 genes que presentan promotores con elementos de respuesta a cAMP (CRE), a  $Ca^{2+}$  (CaRE) y a suero (SRE). Previo a esto, y con el fin de comprobar que las neuronas efectivamente respondieron a la estimulación con BDNF, se evaluó mediante qPCR el aumento en los niveles de de *Arc* que como fue mencionado anteriormente, es un gen que aumenta su expresión por la acción de BDNF en neuronas del SNC (Ying et al 2002), Como muestra la Figura 32, la estimulación con BDNF en neuronas control que expresan EGFP produce un incremento significativo en la expresión de *Arc* el cual fue disminuido significativamente por la presencia del mutante Rab11DN (Neuronas EGFP, aumento de  $5,4 \pm 1,3$  veces respecto a neuronas no estimuladas; neuronas Rab11DN, aumento de  $3,3 \pm 1,1$  veces respecto a neuronas no estimuladas).



Figura 32. La expresión del mutante Rab11DN previene el incremento en la expresión del gen de respuesta temprana *Arc* inducido por la estimulación con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo.

Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron transducidas con partículas adenovirales para expresar el mutante Rab11DN y EGFP como control y luego de 48 hrs se estimularon con BDNF (50 ng/mL) o vehículo (BSA) durante 4 horas. Luego, se extrajo RNA total de los cultivos tratados y se realizó la síntesis de cDNA para posteriormente evaluar cambios en los niveles de expresión de *Arc*. Los niveles de expresión relativa de *Arc* se obtuvieron normalizando los datos obtenidos respecto a 3 genes utilizados como normalizadores (Beta-actina, PGK-1 y TBP). Luego este valor se normalizó respecto al valor obtenido en las neuronas que expressión de *Arc* en neuronas EGFP no estimuladas, que adquiere el valor 1). Finalmente, las veces de cambio en la expresión de *Arc* se obtuvo dividiendo el valor de expresión relativa obtenido en las muestras tratadas con vehículo (BSA). La expresión del mutante Rab11DN bloqueó de manera significativa el incremento en la expresión de *Arc* inducido por la estimulación con BDNF (6 experimentos independientes; \*, p<0,05).

Una vez determinado que efectivamente las neuronas respondieron a BDNF, se analizó la expresión de los genes que contienen promotores con elementos de respuesta a cAMP (CRE), a Ca<sup>2+</sup> (CaRE) y a suero (SRE). Utilizando las muestras provenientes desde neuronas controles que expresaron EGFP se identificó que de los 84 genes incluidos en el Arreglo de PCR, 8 genes (Cga, Cnn1, Fgf6, Il2, Pou2af1, Prl, S100a9 y S100g) no fue posible estudiarlos debido a que sus RNAm están bajo el límite de detección de la técnica. Del resto de los genes estudiados (76 genes), en las neuronas controles que expresaron EGFP la estimulación con BDNF modificó de manera significativa la expresión de 19 de ellos (~25%) respecto a las neuronas no estimuladas. Diecisiete de ellos aumentaron su expresión y dos de ellos disminuyeron su expresión (Figura 33). Desde el punto de vista funcional, la estimulación con BDNF originó cambios de expresión de genes asociados a la transcripción génica (Egr1, Egr2, Atf3, Fos, Crem, Ddit 3, JunB, Stat3), metabolismo (Amd1), factores de crecimiento (Areg, BDNF), señalización (Calcrl, Dusp1, Nf1), ciclo celular, sobrevida y reparación del DNA (Gem, Pcna) y neuropéptidos/neurotransmisores (S100a6, SCG2, Tacr1). En la Figura 33, se muestran los genes que modificaron significativamente su expresión en neuronas controles luego de 4 horas de estimulación con BDNF.



#### Figura 33. La estimulación por 4 horas con BDNF produce cambios de expresión de genes en neuronas hipocampales en cultivo.

Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron transducidas con partículas adenovirales para expresar EGFP como control y luego de 48 hrs se estimularon con BDNF (50 ng/mL) o vehículo (BSA) durante 4 horas. Luego, se extrajo RNA total de los cultivos tratados y se realizó la síntesis de cDNA para posteriormente evaluar cambios en los niveles de expresión de genes utilizando el kit comercial Rat cAMP/Ca<sup>2+</sup> PathwayFinder RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Qiagen). Este kit permite el análisis de 84 genes que presentan promotores con elementos de respuesta a cAMP (CRE), a  $Ca^{2+}$  (CaRE) y a suero (SRE). Los niveles de expresión relativa de cada gen se obtuvieron normalizando los datos obtenidos respecto a 5 genes utilizados como normalizadores (Beta-actina, Beta-2 microglobulina, Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1, Lactato deshidrogenasa y Proteína ribosomal P1). Luego, para cada gen, este valor se normalizó respecto al valor obtenido en las neuronas que expresaron EGFP y que no fueron tratadas con BDNF. Finalmente, las veces de cambio en la expresión de cada gen se obtuvo dividiendo el valor de expresión relativa obtenido en las muestras tratadas con BDNF respecto a las muestras tratadas con vehículo (BSA). El gráfico muestra el promedio de 4-5 experimentos independientes (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0.001). Los genes cuvos promotores presentan elementos de respuesta a cAMP (CRE) se muestran en negro, a  $Ca^{2+}$  (CaRE) se muestran en rojo, a suero (SRE) se muestran en azul y los que presentan SRE y CRE se muestran en gris.

De los 17 genes aumentados, 10 de ellos presentan sólo elementos de respuesta a cAMP (CRE), 2 sólo tienen elementos de respuesta a  $Ca^{2+}$  (CaRE), 1 sólo presenta elementos de respuesta a suero (SRE) y 4 presentan tanto SRE como CRE (Tabla 3).

Gen	Producto	Elemento de respuesta	
Atf3	Activating transcription factor	CRE	
Gem	GTP binding protein	CRE	
Dusp1	Dual specificity phosphatase 1	CRE	
Crem	cAMP responsive element	CRE	
Nf1	Neurofibromin 1	CRE	
Stat3	Signal transducer and activator of transcription	CRE	
Amd1	S-adenosylmethionine decarboxylase 1	CRE	
Bdnf	Brain derived neurotrophic factor	CRE	
Pcna	Proliferating cell nuclear antigen	CRE	
Areg	Amphiregulin	CRE	
Tacr1	Tachykinin receptor 1	CRE	
S100a6	S100 calcium binding protein A6	CRE	
Egr1	Early growth response 1	CRE y SRE	
Egr2	Early growth response 2	onse 2 CRE y SRE	
Fos	FBJ osteosarcoma CRE y SRE oncogene B		
Scg2	Secretogranin II	CRE y SRE	
Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	CaRE	
Calcrl	Calcitonin receptor-like Receptor	CaRE	
Junb	Jun-B oncogene	SRE	

Tabla 3. Lista de genes inducidos por la estimulación por 4 horas con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo y descripción de los elementos de respuesta presentes en sus promotores. CRE: genes cuyos promotores presentan elementos de respuesta a cAMP; CaRE: genes con promotores que presentan elementos de respuesta a Ca<sup>2+</sup>; SRE: genes cuyos promotores presentan elementos de respuesta a suero.

Luego, se estudió si la sola expresión del mutante Rab11DN alteró los cambios en la expresión de genes respecto a neuronas que expresaron EGFP. Las neuronas que expresaron Rab11DN presentaron un aumento significativo en los niveles de RNAm de 4 genes respecto a las neuronas que expresaron EGFP: Bdnf (1,64 ± 0,24 veces), Egr1 (2,55 ± 0,38 veces), Fos (2,18 ± 0,41 veces) y Vcl (1,88 ± 0,32 veces). Además, se analizó si la presencia de Rab11DN altera los cambios en la expresión de genes inducidos por BDNF. De los 19 genes inducidos por BDNF en neuronas que expresaron EGFP, la presencia de Rab11DN disminuyó de manera significativa 9 de ellos (Figura 34), siendo estos principalmente factores de transcripción (Atf3, Egr1, Egr2 y Fos), además de los genes Calrl, Dusp1, Gem, Nf1 y Scg2. Por lo tanto, los datos obtenidos indican que la actividad de Rab11 es requerida para promover cambios a nivel transcripcional en neuronas hipocampales en cultivo tratadas con BDNF. Interesantemente, estos genes inducidos por la estimulación neurotrófica y regulados por la actividad de Rab11 principalmente se relacionan con fenómenos de crecimiento y plasticidad neuronal (Tabla 4).





Neuronas hipocampales de 7 DIV fueron transducidas con partículas adenovirales para expresar Rab11DN y EGFP como control y luego de 48 hrs se estimularon con BDNF (50 ng/mL) o vehículo (BSA) durante 4 horas. Luego, se extrajo RNA total de los cultivos tratados y se realizó la síntesis de cDNA para posteriormente evaluar cambios en los niveles de expresión de genes utilizando el kit comercial Rat cAMP/Ca<sup>2+</sup> PathwayFinder RT2 Profiler PCR Array (Qiagen). Este kit permite el análisis de 84 genes que presentan promotores con elementos de respuesta a cAMP (CRE), a Ca<sup>2+</sup> (CaRE) y a suero (SRE). Los niveles de expresión relativa de cada gen se obtuvieron normalizando los datos obtenidos respecto a 5 genes utilizados como normalizadores (Beta-actina, Beta-2 microglobulina, Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1, Lactato deshidrogenasa y Proteína ribosomal P1). Luego, para cada gen, este valor se normalizó respecto al valor obtenido en las neuronas que expresaron EGFP y que no fueron tratadas con BDNF. Finalmente, las veces de cambio en la expresión de cada gen se obtuvo dividiendo el valor de expresión relativa obtenido en las muestras tratadas con BDNF respecto a las muestras tratadas con vehículo (BSA). El gráfico muestra el promedio de 4-5 experimentos independientes (\*, p<0,05). Los genes cuyos promotores presentan elementos de respuesta a cAMP (CRE) se muestran en negro, a  $Ca^{2+}$  (CaRE) se muestran en rojo y los que presentan SRE y CRE se muestran en gris.

Gen	Producto	Elemento de	Función	Referencias
		respuesta		
Atf3	Activating transcription factor	CRE	Factor de transcripción, regula comportamientos relacionados con depresión, KO presenta alteraciones en niveles de interleuquinas 4, 5 y 13.	(Green et al 2008, Hartman et al 2004)
Calcrl	Calcitonin receptor-like Receptor	CaRE	Receptor acoplado a proteína G, que en asociación con RAMP1 forma el receptor del péptido CGRP.	(Russell et al 2014)
Dusp1	Dual specificity phosphatase 1	CRE	MAP quinasa fosfatasa, regulador del crecimiento axonal inducido por BDNF.	(Jeanneteau et al 2010, Lawan et al 2013)
Egr1	Early growth response 1	CRE y SRE	Factor de transcripción, regula la plasticidad sináptica en hipocampo; KO sin alteraciones en plasticidad inducida por experiencia en corteza visual.	(Li et al 2005, Mataga et al 2001)
Egr2	Early growth response 2	CRE y SRE	Factor de transcripción, KO es letal en primeras horas de vida. KO en adulto muestra mejor rendimiento en test de aprendizaje.	(Poirier et al 2007)
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene B	CRE y SRE	Factor de transcripción, regula la excitabilidad neuronal, KO muestra menor ansiedad e hiperactividad.	(Zhang et al 2002)
Gem	GTP binding protein	CRE	GTPasa vinculada a la regulación de los cambios en arborización dendrítica inducida por actividad eléctrica.	(Ghiretti & Paradis 2014)
Nf1	Neurofibromin 1	CRE	Proteína potenciadora de actividad GTPasa (GAP) de RAS, disminución de NF1 produce tumores en SNC.	(Gutmann et al 2012)
Scg2	Secretogranin II	CRE y SRE	Proteína relacionada con la secreción de neuropéptidos y hormonas en vesículas de secreción.	(Bartolomucci et al 2011)
Arc	Activity-Regulated Cytoskeleton- associated protein	CRE	Regulador de la plasticidad sináptica y esencial en la consolidación de memoria.	(Plath et al 2006)

**Tabla 4. Breve descripción funcional de los genes inducidos por la estimulación con BDNF y regulados por la actividad de la GTPasa Rab11 en neuronas hipocampales en cultivo.** CRE: genes cuyos promotores presentan elementos de respuesta a cAMP; CaRE: genes con promotores que presentan elementos de respuesta a Ca<sup>2+</sup>; SRE: genes cuyos promotores presentan elementos de respuesta a suero.

#### **5. DISCUSIÓN**

El principal hallazgo de ésta tesis fue identificar a las GTPasas monoméricas Rab5 y Rab11 como reguladores de la señalización neurotrófica rio arriba de la activación de CREB, un factor de transcripción clave para los cambios morfológicos inducidos por BDNF en neuronas hipocampales. Nuestro resultados indican que la actividad de Rab5 y Rab11 se requiere para mantener la activación sostenida de mediadores de la señalización BDNF/TrkB, como la vía PI3K/Akt y la ruta de las MAP quinasas ERK1/2, siendo identificada esta última como la vía requerida para activar a CREB en el núcleo. Se identificó a BDNF como un regulador de los niveles proteicos tanto de Rab5a como de Rab11a, siendo Rab5a regulada a través de un mecanismo que requiere de la transcripción y traducción de proteínas y los niveles de Rab11 solo a nivel de la traducción de proteínas. Encontramos que el aumento en la traducción proteica de Rab5a y Rab11a es regulado por BDNF a través de la actividad de la quinasa mTOR. Estos datos nos llevan a proponer un circuito de retroalimentación positiva, en que la neurotrofina BDNF puede modificar los niveles de Rab5a y Rab11a y a la vez estas GTPasas regulan la señalización BDNF/TrkB necesaria para los cambios morfológicos en neuronas hipocampales en cultivo. Además, identificamos un nuevo papel de Rab11 como regulador de los cambios en la expresión de genes inducidos por la señalización BDNF/TrkB, los cuales están principalmente vinculados con procesos de plasticidad, crecimiento y sobrevida en la neurona (Figura 35).

## 5.1 Neuronas hipocampales en cultivo como modelo para estudiar los cambios en la arborización dendrítica inducida por BDNF.

Con el propósito de establecer el papel regulatorio de las GTPasas Rab5 y Rab11 en los cambios morfológicos y en la señalización intracelular inducida por la neurotrofina BDNF en neuronas del SNC, en esta tesis se utilizó un modelo de estudio in vitro compuesto por neuronas hipocampales en cultivo durante 7 a 9 DIV. Las neuronas hipocampales al séptimo día in vitro se encuentran en la etapa IV del desarrollo, según la clasificación realizada por Banker y colaboradores (Dotti et al 1988, Kaech & Banker 2006). En esta etapa, que transcurre aproximadamente desde el cuarto día in vitro en adelante, el axón se puede diferenciar fácilmente por presentar una extensión significativamente mayor a las dendritas (normalmente, sobre 10 veces el tamaño del soma). En estas condiciones (al 7 DIV), la estimulación con BDNF (50 ng/mL o 2 nM) promueve cambios significativos en la morfología de la región somato-dendrítica que pueden ser detectados y cuantificados por métodos automatizados como el análisis de Sholl o por métodos más directos como la determinación del número de puntos de ramificación que presenta una determinada dendrita en el 9 DIV, mediante inmunofluorescencia contra la proteína MAP2. En esta tesis se pudo comprobar la reproducibilidad del modelo, debido a que independiente de las condiciones en que se encuentran las neuronas (por ejemplo, transfectadas mediante el uso de Lipofectamina-2000 o sometidas a infección con partículas adenovirales) y que no expresaron alguna proteína mutante, BDNF produce aumentos en la complejidad de la arborización dendrítica en magnitudes similares.

Un aspecto interesante de discutir es la participación de los receptores para neurotrofinas en los efectos morfológicos inducidos por BDNF. En nuestro modelo de estudio, se expresan tanto los receptores TrkB como p75. Ha sido descrito que p75 regula negativamente la arborización dendrítica cuando se sobre-expresa el receptor en cortes de cerebro de ratón, pero la ausencia del receptor altera principalmente el número y tipo de espina dendrítica más que el número de dendritas en neuronas piramidales del hipocampo (Zagrebelsky et al 2005). Por otro lado, la ausencia del receptor TrkB altera drásticamente y de manera global la morfología neuronal, disminuyendo la arborización dendrítica y el tamaño del soma, entre otros parámetros morfológicos evaluados (Xu et al 2000). Además, el aumento en la arborización dendrítica inducida por la expresión del mutante Rab11CA depende de la actividad tirosina quinasa del receptor TrkB, dado que la presencia del inhibidor farmacológico K252a bloqueó totalmente los efectos inducidos por una aumentada actividad de Rab11 (Lazo et al 2013). Si bien esta evidencia sugiere que la arborización dendrítica en neuronas del SNC sería principalmente regulada a través de la actividad del receptor TrkB, será importante evaluar directamente el papel de p75 en los cambios en la arborización dendrítica inducidos por BDNF, más aún cuando un artículo reciente mostró que la exposición a neurotrofinas produce la acumulación de p75 en la neurita indiferenciada que será axón, identificando un papel clave de p75 en la polaridad celular y en consecuencia en la morfología neuronal (Zuccaro et al 2014).

Si bien los modelos de estudio *in vitro* carecen de manera evidente del entorno completo en el que se desarrolla una neurona en condiciones fisiológicas, el modelo utilizado en esta tesis es útil para llevar a cabo los objetivos propuestos: evaluar el papel de las GTPasas Rab5 y Rab11 en diversos aspectos promovidos por la estimulación neurotrófica. En concreto, el modelo *in vitro* presenta una complejidad menor para producir la expresión de diversos mutantes tanto dominante negativo como constitutivamente activo de determinada proteína Rab y evaluar de manera directa el papel que presentan en la señalización BDNF/TrkB. Es importante considerar que los resultados

obtenidos en esta tesis fueron obtenidos utilizando cultivos neuronales prácticamente libres de células gliales (entre los días 7 y 9 in vitro).

### 5.2 Requerimiento de la actividad de Rab5 y Rab11 en el aumento de la arborización dendrítica inducida por BDNF en neuronas hipocampales en cultivo.

Si bien una gama amplia de estudios han identificado de manera inequívoca a la neurotrofina BDNF como un regulador de la morfología de variados tipos neuronales, los mecanismos moleculares subyacentes aún no han sido completamente establecidos. Con el fin de estudiar e identificar nuevos componentes que regulan la señalización neurotrófica, en nuestro laboratorio recientemente determinamos el requerimiento de la actividad de Rab11 en los cambios en la arborización dendrítica inducidos por BDNF (Lazo et al 2013). Dado que Rab11 ha sido descrito como un regulador del tráfico endocítico a través de la ruta de reciclaje, nos propusimos estudiar el papel de Rab11 como regulador del tráfico de los receptores TrkB. Mediante el uso de mutantes dominante negativo de la GTPasa, en esta tesis corroboramos el requerimiento de la actividad de Rab11 en los cambios morfológicos inducidos por BDNF, pero además identificamos a Rab11 como regulador del reciclaje de receptores TrkB hacia la membrana plasmática en neuronas hipocampales en cultivo, sumando al tráfico endocítico como un aspecto relevante en la regulación de la señalización neurotrófica para inducir cambios morfológicos (Lazo et al 2013). Al comienzo de este trabajo, no existían muchas investigaciones vinculando a Rab11 y la señalización BDNF/TrkB, existiendo actualmente artículos interesantes que apoyan la propuesta de que la actividad de Rab11 puede ser un elemento importante en la regulación de la señalización neurotrófica inducida por el complejo BDNF/TrkB. Por ejemplo, utilizando un modelo de estudio similar, el grupo de Zhe Yu Chen confirmó el papel de
Rab11 como regulador del reciclaje de TrkB, en el contexto de la plasticidad sináptica inducida por estímulo químico (Huang et al 2013). Este grupo demostró la existencia de una interacción entre Rab11 y TrkB, que depende de la actividad tirosina quinasa del receptor. Interesantemente y en línea con los resultados de ésta tesis, los autores demostraron el requerimiento de Rab11 en la activación sostenida de ERK1/2 y PI3K/Akt. Posteriormente, este mismo grupo aportó evidencia que identifica el requerimiento del motor molecular miosina Va para conducir los receptores TrkB desde el endosoma de reciclaje hasta la membrana plasmática (Sui et al 2015). Es importante destacar que nuestro laboratorio ya había identificado al motor molecular asociado a actina, miosina Vb como necesario en los efectos en la arborización dendrítica inducidos por BDNF (Lazo et al 2013). Por otro lado, recientemente Rodriguez-Boulán y colaboradores identificaron que Slitrk5, una proteína transmembrana reguladora de la arborización dendrítica en neuronas del cuerpo estriado (Shmelkov et al 2010), se asocia a TrkB bajo estimulación con BDNF y puede regular el reciclaje del receptor a través de su interacción con el efector Rab11-FIP3 (Song et al 2015). El hecho de que ratones nulos para Slitrk5, presentan una menor arborización dendrítica en respuesta a BDNF y que las vías de señalización ERK1/2, PI3K/Akt además del receptor TrkB presentan una reducción significativa en sus niveles de activación, respalda la idea que Rab11 es un regulador clave de la señalización BDNF/TrkB en neuronas del SNC. Si Slitrk5 transita junto a TrkB a través de endosomas positivos para Rab5, que está río arriba de Rab11 en el tráfico endocítico, es un aspecto aún no estudiado. No obstante, Slitrk1, proteína que pertenece a la familia Slitrk, se ubica abundantemente en dendritas y co-localiza parcialmente con Rab5 en neuronas corticales (Stillman et al 2009), lo cual permite hipotetizar un posible tráfico del complejo TrkB-Slitrk5 a través del endosoma temprano.

Considerando que la endocitosis del receptor TrkB y su posterior tráfico a través de la ruta de reciclaje son pasos requeridos en el crecimiento dendrítico inducido por BDNF en neuronas hipocampales (Lazo et al 2013, Zheng et al 2008), un objetivo fue determinar si el tráfico del receptor TrkB a través del endosoma temprano es requerido para la señalización BDNF/TrkB que lleva a la plasticidad dendrítica. Para evaluar la participación del tráfico a través del endosoma temprano en los efectos inducidos por BDNF, nos centramos en evaluar el papel de la GTPasa Rab5, regulador clave de la fusión del material endocitado y en consecuencia en la formación del endosoma temprano (Bucci et al 1992, Gorvel et al 1991) y que ha sido descrito como regulador del tráfico endosomal río arriba del tráfico a través del endosoma de reciclaje regulado por la actividad de Rab11 (Ullrich et al 1996).

Determinamos que Rab5 co-localiza con receptores TrkB posterior a la endocitosis inducida por BDNF, tanto en dendritas como en el cuerpo celular. Observamos que la localización del receptor junto a Rab5 en el cuerpo celular aumenta a través del tiempo, sugiriendo el transporte retrógrado y posterior acumulación de endosomas conteniendo a Rab5 y TrkB provenientes desde las dendritas. En apoyo a esta hipótesis, en nuestro laboratorio se ha encontrado evidencia que indica que la estimulación con BDNF puede modificar la dinámica de endosomas positivos para Rab5 y que una parte de estos son transportados desde dendritas hasta el cuerpo celular (datos aún no publicados de nuestro laboratorio). Además, datos obtenidos en neuronas corticales provenientes de ratones nulos para la proteína Alsin (un efector de Rab5) mostraron una drástica disminución de la acumulación de TrkB en el soma, luego de la estimulación con BDNF (Devon et al 2006). Será de particular interés determinar en el futuro la posibilidad de que estos endosomas transportados retrógradamente contengan a la vez Rab5 y TrkB. Por el momento, en la literatura existe evidencia que indica que Rab5 es requerida en los pasos iniciales del

transporte retrógrado de un fragmento de la toxina del tétanos, con la cual co-localiza (vesícula que a su vez puede contener a p75, BDNF y TrkB) desde las terminales axonales de neuronas motoras hacia el cuerpo celular (Deinhardt et al 2006). El endosoma temprano, que es particularmente enriquecido en la región somato-dendrítica (Wilson et al 2000), puede ser transportado a través de la red de microtúbulos específicamente por la Kinesina KIF16B (Farkhondeh et al 2015). Esta kinesina es de especial interés, dado que además de ser regulada por la actividad de Rab5, una disminución de su actividad (por mutantes dominante negativo) o de su expresión (mediante siRNA) produce una disminución en el reciclaje de receptores a la membrana plasmática, acelerando su degradación (Hoepfner et al 2005). Aunque aún es especulativo, esta kinesina podría ser un posible mediador del transporte de receptores TrkB desde endosomas tempranos a endosomas de reciclaje.

Con el fin de determinar el papel de Rab5 en el aumento de la arborización dendrítica inducida por BDNF, evaluamos los cambios morfológicos inducidos por BDNF en presencia del mutante Rab5DN, el cual es incapaz de intercambiar GDP por GTP, utilizando un modelo experimental idéntico al utilizado con Rab11. En la literatura, existía evidencia que indicaba una relación entre la actividad de Rab5 y la regulación de la morfología, tanto en líneas celulares como en neuronas del SNC. Por ejemplo Liu y colaboradores, utilizando la línea celular PC12, mostraron que el crecimiento de neuritas inducido por NGF es negativamente regulado por la actividad de Rab5. En contraposición, el grupo de Fukuda halló que la disrupción de la expresión de la GEF de Rab5, Rabex-5, además del silenciamiento de Rab5a, Rab5b y Rab5c produjo una alteración significativa de la morfología basal tanto de dendritas y axones de neuronas hipocampales en cultivo (Mori et al 2013). En línea con esta última evidencia, en nuestro trabajo, observamos que la sólo presencia por 48 horas del mutante dominante negativo de Rab5 produjo una

alteración importante de la arborización dendrítica, disminuyendo su complejidad respecto a neuronas controles que sólo expresaron EGFP. Además, estas neuronas presentaron un menor nivel de respuesta a BDNF, observándose un pequeño aumento en la arborización dendrítica y en el número de ramificaciones. Este resultado difiere con aquel obtenido utilizando el mutante Rab11DN, que indicó el requerimiento de Rab11 sólo en la arborización dendrítica inducida por BDNF, sugiriendo la participación de Rab5 en diversos pasos requeridos para modificar la morfología neuronal y en específico de la región somato-dendrítica, dado que la ausencia de Rab5 no disminuye el crecimiento axonal de neuronas del SNC (Wu 2014). Satoh y colaboradores demostraron un papel importante de Rab5 en el desarrollo de la arborización dendrítica neuronal, utilizando como modelo de estudio la mosca Drosophila Melanogaster (Satoh et al 2008). En este estudio, los autores proponen un modelo en que endosomas que contienen a Rab5 son transportados de manera dependiente de dineína a través de la red de microtúbulos desde las dendritas hacia el cuerpo celular para promover la arborización dendrítica, sugiriendo el requerimiento del transporte de señales por mecanismos que dependen de la integridad del endosoma temprano. En este sentido, en la presente tesis determinamos que la internalización del complejo BDNF/TrkB no presenta cambios en la internalización desde la membrana plasmática por la expresión del mutante Rab5DN, sugiriendo que los efectos producidos por una actividad disminuida de Rab5 se podrían asociar a una alteración del tráfico post-endocítico de receptores TrkB y/o la señalización posterior a éste. Esta propuesta es avalada por los estudios que vinculan a la actividad de Rab5 y la señalización a través del factor de crecimiento epidérmico (EGF, de Epidermal Growth Factor) y su receptor tirosina quinasa (EGFR de Epidermal Growth Factor Receptor). En estas investigaciones llevadas a cabo por el grupo de Stahl, se halló que la presencia del mutante Rab5DN produce una disminución de la activación de la vía ERK1/2 en respuesta a la estimulación con EGF (Barbieri et al 2004). Además, la disrupción de la expresión de Rab5a y Rab5b produjo una alteración del transporte de EGFR desde endosomas tempranos a endosomas tardíos (Chen et al 2009). En esta misma investigación, la disrupción de la expresión de las 3 isoformas de Rab5 no produjo cambios en la internalización de EGFR.

Otra posibilidad que puede explicar los efectos observados por la perturbación del tráfico a través del endosoma temprano y que no excluye alteraciones en la señalización BDNF/TrkB es que la actividad de Rab5 es necesaria para la mantención de la estructura y funcionalidad del tráfico endocítico. En este sentido, recientemente se estudió el efecto de la ausencia de Rab5, la cual produce alteraciones en el tráfico endolisosomal (Zeigerer et al 2012). Por lo tanto, investigamos si la presencia del mutante Rab5DN puede alterar a su vez los niveles de Rab11 y en consecuencia el tráfico a través de la ruta de reciclaje. Logramos determinar que la expresión del mutante Rab5DN por 48 horas produjo una disminución significativa de los niveles de Rab11 en neuronas hipocampales en cultivo. Desconocemos si en estas condiciones, también se produce una alteración en el sistema endolisosomal en la neurona.

# 5.3 La actividad de las GTPasas Rab5 y Rab11 es necesaria para la activación de CREB en neuronas hipocampales en cultivo.

Como ha sido descrito previamente y además en esta tesis, la activación de CREB es un requerimiento para aumentar la arborización dendrítica inducida por BDNF. Si bien existe evidencia que sugiere la traducción local de transcritos de CREB en el axón y en dendritas, para luego ser transportados hasta el núcleo donde promoverán la transcripción de genes (Cox et al 2008, Crino et al 1998). Nuestros resultados muestran que la mayor proporción de CREB se localiza en el núcleo, hacia donde convergen diversas señales que conducen a su activación. Se han descrito distintos sitios de fosforilación en CREB que conducen a la regulación de la transcripción, como los residuos serina-142 o serina-143 (Kornhauser et al 2002). Sin embargo, existe consenso en torno a que la fosforilación del residuo serina-133 es un paso clave para aumentar la transcripción de genes blanco de CREB (Gonzalez & Montminy 1989). Por lo tanto, en esta tesis nos propusimos evaluar si la estimulación con BDNF produce la activación de CREB en nuestro modelo de estudio y si la actividad de Rab5 y Rab11 presenta un papel regulatorio en estos efectos. En nuestro estudio, hallamos que BDNF promueve un incremento robusto en los niveles de pCREB en el núcleo. Mediante el uso de inhibidores farmacológicos, determinamos que los efectos promovidos por BDNF requieren de la actividad tirosina quinasa del receptor TrkB y la activación de la vía ERK1/2, descartando el requerimiento de la ruta PI3K/Akt. Estos datos son congruentes con los hallados por el grupo de Soren Impey, quienes determinaron utilizando neuronas corticales e hipocampales en cultivo que BDNF promueve la activación de CREB mediante un mecanismo que depende de la vía ERK1/2 y posterior acción de la quinasa MSK1, que directamente fosforila a CREB en el residuo serina-133 en respuesta a BDNF (Arthur et al 2004). Como fue mencionado previamente, las neuronas hipocampales también expresan el receptor de neurotrofinas p75. En esta tesis no se evaluó de manera directa el papel de p75 en la activación de CREB en respuesta a BDNF, pero el hecho que la presencia del inhibidor de la actividad tirosina quinasa de TrkB, K252a, inhibió los aumentos en los niveles de pCREB luego de estimulación con BDNF, sugiere que p75 no participaría en la activación de CREB inducida por la señalización BDNF/TrkB.

En nuestro trabajo hemos determinado que tanto la expresión de Rab5DN como Rab11DN bloquea completamente el incremento en los niveles de pCREB en respuesta a BDNF, sugiriendo el requerimiento de Rab5 y Rab11 en su estado unido a GTP para conducir la señalización BDNF/TrkB hasta el núcleo. Esta idea es apoyada por la evidencia obtenida utilizando la versión mutante Rab11CA, la cual se mantiene predominantemente en un estado unido a GTP. Utilizando este mutante encontramos que la respuesta a BDNF en neuronas que expresan Rab11CA se mantiene por tiempos prolongados y que además las neuronas tienen la capacidad de responder a concentraciones bajas de la neurotrofina. Dado el hecho que la expresión de los mutantes no altera la internalización de receptores TrkB, creemos que los defectos observados en la activación de CREB se deben a una disminución en la señalización BDNF/TrkB causada por la alteración del tráfico endosomal del receptor TrkB. En apoyo a esta idea, sabemos por datos obtenidos en nuestro laboratorio que Rab11 puede regular el tráfico de TrkB; la expresión del mutante Rab11CA produce un incremento en los niveles de TrkB en filopodios de dendritas, lo cual puede aumentar potencialmente la cantidad de receptores disponibles en la membrana plasmática que pueden activarse (Lazo et al 2013). En este sentido, en esta tesis demostramos que una proporción de TrkB puede volver a la membrana plasmática a través de un mecanismo que depende de la actividad de Rab11. Este hallazgo podría tener además implicancias en los niveles de BDNF en el medio extracelular, puesto que existe evidencia que sugiere al reciclaje del complejo BDNF/TrkB como mecanismo para aumentar los niveles de BDNF en el espacio sináptico (Santi et al 2006).

5.4 La actividad de las GTPasas Rab5 y Rab11 es requerida para producir la activación y transporte al núcleo de ERK1/2 en respuesta a la estimulación con BDNF.

Es conocido que luego de la unión de BDNF a TrkB se produce la activación de las vías de señalización ERK1/2, PI3K/Akt y la ruta de la PLCy. A través de la activación de éstas vías de señalización, las neurotrofinas pueden regular distintos aspectos de la fisiología neuronal, como el crecimiento de axones y dendritas, la plasticidad sináptica y la sobrevida neuronal (Reichardt 2006). En esta tesis estudiamos principalmente las vías ERK1/2 y PI3K/Akt debido a que ambas vías han sido descritas como requeridas para promover el crecimiento y ramificación de dendritas en respuesta a la estimulación neurotrófica (Dijkhuizen & Ghosh 2005, Finsterwald et al 2010, Jaworski et al 2005). En esta tesis estudiamos la activación de estas vías (incluyendo la activación de TrkB) en neuronas hipocampales que expresaron los mutantes Rab5DN y Rab11DN. Elegimos estimular las neuronas con BDNF a dos tiempos: un tiempo breve (5 minutos), con el fin de evaluar las condiciones iniciales de activación que ocurrirían principalmente en la membrana plasmática y un tiempo mayor (120 minutos), donde ya se espera que el complejo BDNF/TrkB se haya internalizado y su tráfico endocítico determine la activación sostenida de vías de señalización como la que lleva a la activación de ERK1/2. En nuestro trabajo encontramos que la estimulación inicial de TrkB, Akt y ERK1/2 no se encuentran alteradas, indicando que la expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN no afectan los niveles de estas proteínas ni los mediadores iniciales que llevan a la activación de estas vías. Sin embargo, la actividad de Rab5 y Rab11 son requeridas para mantener la activación sostenida de TrkB, ERK1/2 y Akt indicando que el tráfico intracelular a través de la ruta endocítica temprana y de reciclaje es un requerimiento para la mantención de la señalización intracelular inducida por BDNF. Durante el desarrollo de esta tesis, el grupo de Zhe-Yu Chen encontró resultados similares realizando el silenciamiento de Rab11 mediante siRNA en neuronas hipocampales en cultivo (Huang et al 2013). En esta investigación, los autores mostraron el requerimiento de la actividad de Rab11 para la mantención de la activación de ERK1/2 y Akt luego de 60 minutos de estimulación con BDNF, sin encontrar diferencias en la activación de estas proteínas luego de 5 minutos de estimulación con BDNF, en ausencia de Rab11. En consecuencia, nuestros resultados nos indican que el tráfico intracelular a través de la ruta endocítica temprana y de reciclaje es un requerimiento para la mantención de la señalización intracelular inducida por BDNF.

Distintas líneas de investigación indican que la activación sostenida de ERK1/2 es requerida para la ramificación de dendritas. Por ejemplo, el grupo de Lu y colaboradores demostró que la activación sostenida de ERK1/2 por la estimulación gradual con BDNF conduce a un aumento en la ramificación dendrítica (Ji et al 2010). Además, Redmond y Ha demostraron que el incremento en la ramificación dendrítica depende de la activación sostenida de ERK1/2 (inducida por un estímulo despolarizante), que conduce a la activación río abajo de CREB y la estabilización del gen de respuesta temprana c-Fos (Ha & Redmond 2008). Estas evidencias más las halladas en otros modelos (Hisata et al 2007, Wu et al 2001), demuestran que la dinámica de activación de ERK1/2 es un aspecto relevante en la activación de CREB y la regulación de la morfología celular. De hecho, en el trabajo realizado en esta tesis encontramos que la expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN bloquearon la activación de CREB desde tiempos relativamente cortos de estimulación con BDNF (15 minutos). A pesar que la estimulación temprana de TrkB, Akt y ERK1/2 no disminuyó (como se discutió arriba) es interesante que el tráfico por la ruta endocítica regulada por Rab5 y Rab11 resulte necesario para la activación de CREB incluso a tiempos cortos de estimulación con BDNF. Una posibilidad que podría explicar esta observación es que la disminución en la actividad de estas GTPasas por la expresión de los mutantes conduce a una alteración en la localización de ERK1/2 y Akt en su forma activada. Dado que evaluamos la activación de los mediadores de la señal BDNF/TrkB por medio de Western blot utilizando los lisados de células totales (compuesto por material proveniente de somas, dendritas y axones), sin realizar una mayor separación de estos compartimentos subcelulares, la información que podemos extraer es limitada. Es importante recordar el hecho de que en nuestro modelo, CREB se localiza casi exclusivamente en el núcleo, por lo tanto las potenciales señales que lo activarán deben transportarse desde zonas distales y entrar al núcleo. Dado que en nuestro modelo de estudio BDNF induce la activación de CREB por un mecanismo dependiente de ERK1/2, evaluamos la posibilidad de que la alteración del tráfico endocítico regulado por Rab5 y Rab11 promueva cambios en la localización de ERK1/2 activado. Puntualmente, se determinó si la expresión de los mutantes Rab5DN y Rab11DN altera la localización y activación de ERK1/2 luego de la estimulación con BDNF en distintos compartimentos subcelulares como dendritas, el soma y el núcleo por immunofluorescencia. Encontramos que la estimulación de neuronas hipocampales con BDNF por 15 minutos causa una activación robusta de ERK1/2 en dendritas, somas y en el núcleo. Luego de 60 minutos la estimulación en somas y núcleos ha caído a la mitad aproximadamente. En cambio en dendritas a menos de un tercio de lo observado a los 15 minutos de activación. La expresión de Rab5DN resultó en la inhibición de la activación de ERK1/2 en todos los compartimentos subcelulares y tiempos. En cambio la expresión de Rab11DN disminuyó significativamente (pero en menor grado que la expresión de Rab5DN) la activación de ERK1/2 en dendritas, soma y núcleo a los 15 minutos de estimulación con BDNF y a los 60 minutos sólo bloqueó significativamente la acumulación en el núcleo de pERK1/2. Estos datos nos sugieren que el tráfico endocítico regulado por Rab5 es un requerimiento

para producir la activación de ERK1/2 en diferentes compartimentos de la neurona. También sugieren que se necesita la actividad de ambas GTPasas para la activación nuclear de ERK1/2. Por lo tanto, sumando la evidencia obtenida tanto por Western blot como por inmunofluorescencia, nuestros resultados sugieren que la estimulación con BDNF a tiempos cortos permite la activación transitoria de los mediadores de la señal BDNF/TrkB, sin embargo la actividad de Rab5 y Rab11 es requerida para mantener la activación tanto dendrítica como nuclear de ERK1/2. Los datos obtenidos en la presente tesis no ofrecen un mecanismo que explica cómo la actividad de Rab5 y Rab11 se relaciona con la mantención de la activación de ERK1/2. No obstante, existen investigaciones que han identificado una co-distribución de ERK1/2 total/activado junto con Rab5 y Rab11 (Kapp-Barnea et al 2006, Liu et al 2010), lo que hace posible un escenario en que el transporte de ERK1/2 y otras moléculas de señalización en su estado activado en endosomas permite su interacción con proteínas andamio que evitan su desfosforilación, restringiendo el acceso de proteínas fosfatasas (Kholodenko 2002, Luttrell et al 2001).

Como hemos nombrado, la activación sostenida de ERK1/2 es un evento requerido para producir crecimiento de procesos y diferenciación en diversos modelos celulares de estudio (Ha & Redmond 2008, Hisata et al 2007, Ji et al 2010, Wu et al 2001). Ha sido descrito que la activación de ERK1/2 en respuesta a neurotrofinas es regulada por una vía dependiente de la GTPasa Ras y la quinasa Raf, además de la vía Rap1 y la quinasa B-Raf (Grewal et al 1999). Sin embargo, existe evidencia que muestra a la señalización vía Rap1 como requerida para la mantención sostenida de la activación de ERK1/2 en respuesta a neurotrofinas, descartando de este aspecto a la ruta regulada por Ras, que sólo conduce a una activación transitoria de ERK1/2 en respuesta a NGF (York et al 2000, York et al 1998). Dado que se ha mostrado que Rap1 puede tener una localización endosomal y que la disrupción del tráfico endosomal previene la activación sostenida de Rap1 y ERK1/2 en respuesta a NGF, sin alterar la activación de Ras (Wu et al 2001), es posible que ERK1/2 sea activado de manera sostenida y dependiente de Rap1 sólo desde endosomas e independiente de Ras. Una interesante posibilidad es que esta vía endosomal sea requerida para conducir a la activación de CREB en el núcleo. Existe evidencia que indica que la activación de CREB puede ser regulada a través de la activación de ERK1/2 y Rap1, utilizando como modelos de estudio neuronas y líneas celulares en cultivo (Fernandez et al 2005, Grewal et al 2000, Zanassi et al 2001). Sin embargo, se desconoce si la activación de CREB en respuesta a BDNF requiera de la actividad de la GTPasa Rap1. Esta posibilidad es interesante, dado que Rap1 también es un regulador de la arborización dendrítica de neuronas corticales (Chen et al 2005a) al igual como fue descrito previamente para BDNF y CREB (Dijkhuizen & Ghosh 2005, Finsterwald et al 2010).

# 5.5 BDNF es un regulador de los niveles de las GTPasas Rab5 y Rab11 en neuronas hipocampales.

Distintos grupos de investigación han mostrado que la señalización BDNF/TrkB puede generar cambios en la expresión de genes y el contenido de proteínas, utilizando distintos modelos de estudio (Alder et al 2003, Manadas et al 2009, Mariga et al 2015, Zhang et al 2014). Además, Black y colaboradores demostraron que BDNF puede modificar a través de cambios transcripcionales y en el contenido de proteínas los niveles de Rab GTPasas; la estimulación de neuronas hipocampales en cultivo por 3 horas con BDNF produce un incremento en Rab3a, proteína reguladora de la exocitosis de vesículas que contienen neurotransmisores y que está involucrada en los cambios en la transmisión sináptica inducidos por BDNF (Thakker-Varia et al 2001). Al comienzo de la presente tesis no existían estudios vinculando a la señalización BDNF/TrkB o el FT CREB como regulador de los niveles de Rab5 y Rab11 en neuronas hipocampales en cultivo, aunque éstas como otras GTPasas y algunos de sus efectores presentan sitios regulados por CREB (CRE) en sus promotores (Zhang et al 2005).

Encontramos que BDNF aumentó los niveles del RNAm de Rab5a a las 4 y 12 horas de estimulación con BDNF. Esto llevó a un aumento de un 50% en los niveles de proteínas a las 12 y 24 horas luego de estimulación. El aumento de los niveles de Rab5 fue inhibido tanto por actinomicina D como por cicloheximida. Indicando que el aumento de los niveles de proteínas de Rab5a inducido por BDNF está mediado tanto por mecanismos transcripcionales como traduccionales. Nos parece interesante que los niveles de Rab5 estén regulados por BDNF dado que si bien es una GTPasa requerida para los cambios morfológicos mediados por BDNF una sobreexpresión de esta GTPasa también podría conducir a efectos deletéreos en la célula, como por ejemplo, un aumento en la degradación de proteínas. Esto es debido a que Rab5 está involucrado en la maduración del endosoma temprano a endosoma tardío, regulando la ruta degradativa lisosomal a través del mecanismo conocido como conversión de Rabs (Rink et al 2005). Un resultado importante en nuestra tesis fue observar que la actividad de Rab5 es no solo requerida para aumentar la arborización dendrítica inducida por BDNF sino que también para la mantención de la morfología basal de la neurona. Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten hipotetizar que BDNF regula la actividad y expresión de Rab5 a distintos niveles, dado que una correcta actividad y expresión sería necesarias para los cambios morfológicos inducidos por BDNF. De hecho, datos preliminares del laboratorio han mostrado que BDNF además de modificar los niveles de expresión de Rab5 también regula la movilidad de estos endosomas así como su actividad. Con respecto a esto es interesante destacar que recientemente se demostró que la actividad de Rab5 es requerida en la regulación de los componentes y funcionalidad del complejo mTORC1 (Bridges et al 2012), a través del cual a su vez BDNF regularía los niveles de proteína de Rab5 como describimos en esta tesis. Por lo tanto, esta evidencia confirma la existencia de una relación estrecha entre la señalización BDNF/TrkB y la expresión y actividad de la GTPasa Rab5. Será importante evaluar si la reducción de los niveles de Rab5a (por ejemplo mediante siRNA) puede modificar la arborización dendrítica basal y en respuesta a BDNF, de manera semejante a lo hallado utilizando el mutante dominante negativo de la GTPasa.

En el caso de Rab11, determinamos que la estimulación con BDNF no altera de manera significativa los niveles de RNAm de *Rab11a*, pero produce un incremento en los niveles de proteína luego de 12 y 24 horas de estimulación, que dependen también de la síntesis proteica regulada por la vía mTOR. Al igual a lo descrito para Rab5a, BDNF produce un moderado aunque significativo incremento en Rab11a, sugiriendo a la neurotrofina como regulador de la ruta de reciclaje de manera global: puede modificar tanto los niveles de Rab11 como su actividad, como fue descrito por nuestro laboratorio previamente (Lazo et al 2013). En consecuencia, los resultados obtenidos sugieren que BDNF promueve un incremento en la expresión de Rab5a y Rab11a que podrían integrarse en la regulación de la señal BDNF/TrkB, teniendo como consecuencia una potenciación de los efectos inducidos por la neurotrofina.

### 5.6 La GTPasa Rab11 regula la transcripción de genes inducida por la neurotrofina BDNF en neuronas hipocampales.

Las neurotrofinas ejercen sus efectos biológicos mediante múltiples mecanismos entre los que destaca la regulación de la transcripción de diversos genes relacionados con el crecimiento, plasticidad sináptica y sobrevida neuronal. Por ejemplo, la neurotrofina BDNF es capaz de producir un cambio en la expresión de genes en neuronas hipocampales en cultivo, relacionados con proteínas sinápticas, neuropéptidos y genes de respuesta temprana entre los que se encuentran *c-Fos, Egr1/Egr2* y Arc (Ring et al 2006). Si bien los mecanismos que subyacen a los cambios en la expresión génica inducidos por la señalización BDNF/TrkB no han sido completamente establecidos, es conocido que uno de los factores de transcripción que media entre la señalización neurotrófica (inducida por ejemplo por BDNF y NGF) y cambios en la transcripción es CREB (Finkbeiner et al 1997, Xing et al 1998). En el presente trabajo hemos hallado evidencia que sugiere que tanto Rab5 y Rab11 regulan la fosforilación de CREB en respuesta a BDNF, paso importante para conducir a la transcripción de diversos genes en respuesta a la neurotrofina. Sin embargo, este hallazgo no demuestra una relación directa entre la actividad de GTPasas Rabs y la regulación de la expresión génica inducida por BDNF. Para estudiar directamente si la inhibición de CREB resulta en un cambio en la transcripción de genes con sitios de unión a CREB ("CREB response element", CRE) nos propusimos evaluar la posible alteración en la expresión de genes inducidos por BDNF por la expresión del mutante Rab11DN. En nuestro modelo de estudio (neuronas hipocampales que expresaron EGFP), encontramos que la estimulación por 4 horas con BDNF produce cambios significativos en 19 de los 76 genes estudiados mediante arreglo de oligos para qPCR, presentando la mayoría elementos de respuesta a cAMP (CRE, 12 genes). Además, encontramos cambios en genes con elementos de respuesta a  $Ca^{2+}$  (CaRE, 2 genes), a suero (SRE, 1 gen) y también con más de un elemento de respuesta (SRE y CRE, 4 genes). Al agrupar los genes por función, encontramos una gran cantidad relacionada con la transcripción de genes, además de reguladores de la señalización, el crecimiento y el metabolismo celular (Tabla 4). Al comparar la expresión de los 76 genes estudiados en neuronas que expresaron Rab11DN respecto a neuronas que expresaron EGFP, encontramos que los genes *Bdnf*, *Egr1*, *Fos* y *Vcl* aumentaron significativamente su expresión por la expresión del mutante. Dada la relación funcional de estos genes, este resultado sugiere que la disminución del tráfico endocítico regulado por Rab11 podría estar generando una respuesta asociada a estrés y promoción del crecimiento y sobrevida neuronal.

Al comparar la respuesta a BDNF en neuronas que expresaron EGFP y neuronas que expresaron el mutante Rab11DN, encontramos que la disminución en la actividad de Rab11 reduce significativamente la expresión de 9 genes inducidos por BDNF. Estos resultados están ilustrados en la tabla 1. Además, incluimos el gen de respuesta temprana *Arc*, el cual evaluamos de manera anexa mediante qPCR, cuya expresión fue inducida por la estimulación con BDNF y disminuida por la expresión del mutante Rab11DN.

Cuando observamos la función de los genes que son inducidos por BDNF y cuya transcripción se vio disminuida por la expresión de Rab11DN, encontramos que varios de ellos están estrechamente relacionados con la regulación de la morfología neuronal. Por ejemplo, ATF3 es requerido para mantener la estructura dendrítica luego de un daño excitotóxico (Ahlgren et al 2014); péptidos de la familia de las calcitoninas (de las que CalcrI es su receptor) regulan diferencialmente la formación tanto de dendritas como de espinas dendríticas y filopodios en neuronas corticales *in vitro* (Harigai et al 2011); Dusp1 (o MAP quinasa fosfatasa-1) regula el crecimiento axonal estimulado por BDNF (Jeanneteau et al 2010); Egr-1 regula la morfología y la maduración de espinas dendríticas en neuronas del giro dentado del hipocampo (Veyrac et al 2013); la GTPasa Gem es un regulador de los cambios en la arborización dendrítica inducida por actividad eléctrica en neuronas corticales en cultivo (Krey et al 2013); Neurofibromina-1 es la principal inactivadora de la GTPasa Ras, la cual es una reguladora clave de la plasticidad estructural de las espinas dendríticas (Oliveira & Yasuda 2014) y Arc, cuya función clásicamente se

ha asociado a la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, recientemente ha sido vinculada en la refinación de los circuitos neuronales en el hipocampo bajo el contexto de condicionamiento al miedo (Nakayama et al 2015).

Si bien existían investigaciones recientes que vinculaban al tráfico endocítico en general como requerido en la transcripción de genes como *c-Fos* y *Egr1* (Trifilieff et al 2009), uno de los más importantes hallazgos de la presente tesis fue identificar de manera particular a Rab11 como regulador de la transcripción de un grupo genes relacionados con la plasticidad, el crecimiento y la sobrevida neuronal inducidos por BDNF.



#### Figura 35. Resumen ilustrativo de los resultados obtenidos y modelo propuesto.

La neurotrofina BDNF, luego de unir a su receptor TrkB, induce la internalización del complejo BDNF/TrkB, el cual transita por una ruta regulada por la GTPasa Rab5 y puede reciclar a la membrana plasmática a través de un mecanismo que depende de la actividad de Rab11. Ambas GTPasas son requeridas para mantener la activación sostenida de los mediadores de señalización ERK1/2 y PI3K/Akt en respuesta a la estimulación con BDNF. Tanto Rab5 como Rab11 son requeridas para promover la activación y translocación al núcleo de ERK1/2 y producir la fosforilación del factor de transcripción CREB en el núcleo. Además, Rab11 puede regular la transcripción de genes inducidos por BDNF vinculados a la plasticidad, el crecimiento y la sobrevida neuronal. Finalmente, la estimulación con BDNF promueve cambios en los niveles de Rab5 y Rab11 a través de mecanismos que dependen de la transcripción de genes y la traducción de proteínas a través de la vía PI3K/Akt/mTOR. Estas nuevas proteínas pueden potencialmente unirse al sistema de señalización BDNF/TrkB, formando un circuito de retroalimentación positiva en función de promover cambios en la estructura neuronal.

#### **6. CONCLUSIONES**

Mediante el uso de un modelo de estudio *in vitro*, compuesto por neuronas hipocampales de rata en cultivo (9 DIV), en la presente tesis logramos establecer que:

**1.-** La actividad de las GTPasas Rab5, Rab11 además de la activación de CREB es necesaria para la arborización dendrítica inducida por la neurotrofina BDNF.

**2.-** El receptor TrkB co-localiza con las GTPasas Rab5 y Rab11 luego de su internalización inducida por BDNF. A su vez, la endocitosis del receptor TrkB no depende de la actividad de Rab5.

**3.-** La actividad de las GTPasas Rab5 y Rab11 es necesaria para la activación de CREB en respuesta a la estimulación con BDNF.

**4.-** En nuestro modelo de estudio, la activación de ERK1/2 es necesaria para la activación de CREB en respuesta a BDNF en neuronas hipocampales.

**5.-** La actividad de las GTPasas Rab5 y Rab11 es requerida para la activación sostenida de TrkB, Akt y ERK1/2 en respuesta a la estimulación con BDNF.

**6.-** La actividad de Rab5 y Rab11 es necesaria para la activación de ERK1/2 en dendritas, soma y núcleo en respuesta a BDNF en neuronas hipocampales.

**7.-** BDNF aumenta los niveles de proteínas de Rab5a de una manera dependiente de la transcripción, traducción y la quinasa mTOR. Además, BDNF aumenta los niveles de proteína de Rab11a a través de un mecanismo que depende de la traducción y de mTOR.

**8.-** La GTPasa Rab11 favorece los cambios de expresión de genes inducidos por la estimulación con BDNF en neuronas hipocampales en cultivo.

### 7. BIBLIOGRAFIA

- Ahlgren H, Bas-Orth C, Freitag HE, Hellwig A, Ottersen OP, Bading H. 2014. The nuclear calcium signaling target, activating transcription factor 3 (ATF3), protects against dendrotoxicity and facilitates the recovery of synaptic transmission after an excitotoxic insult. *J Biol Chem* 289: 9970-82
- Alder J, Thakker-Varia S, Bangasser DA, Kuroiwa M, Plummer MR, et al. 2003. Brainderived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 23: 10800-8
- Alonso-Curbelo D, Riveiro-Falkenbach E, Perez-Guijarro E, Cifdaloz M, Karras P, et al. 2014. RAB7 controls melanoma progression by exploiting a lineage-specific wiring of the endolysosomal pathway. *Cancer cell* 26: 61-76
- Arthur JS, Fong AL, Dwyer JM, Davare M, Reese E, et al. 2004. Mitogen- and stressactivated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci* 24: 4324-32
- Ascano M, Richmond A, Borden P, Kuruvilla R. 2009. Axonal targeting of Trk receptors via transcytosis regulates sensitivity to neurotrophin responses. *J Neurosci* 29: 11674-85
- Baker RE, Dijkhuizen PA, Van Pelt J, Verhaagen J. 1998. Growth of pyramidal, but not non-pyramidal, dendrites in long-term organotypic explants of neonatal rat neocortex chronically exposed to neurotrophin-3. *Eur J Neurosci* 10: 1037-44
- Barbieri MA, Fernandez-Pol S, Hunker C, Horazdovsky BH, Stahl PD. 2004. Role of rab5 in EGF receptor-mediated signal transduction. *Eur J Cell Biol* 83: 305-14
- Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, Fischer-Colbrie R, Loh YP, Salton SR. 2011. The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev* 32: 755-97
- BasuRay S, Mukherjee S, Romero E, Wilson MC, Wandinger-Ness A. 2010. Rab7 mutants associated with Charcot-Marie-Tooth disease exhibit enhanced NGF-stimulated signaling. *PLoS One* 5: e15351
- Bath KG, Lee FS. 2010. Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Neurobiol* 70: 339-49
- Bhuin T, Roy JK. 2009. Rab11 is required for embryonic nervous system development in Drosophila. *Cell Tissue Res* 335: 349-56
- Bibel M, Barde YA. 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14: 2919-37
- Bolte S, Cordelieres FP. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213-32
- Bridges D, Fisher K, Zolov SN, Xiong T, Inoki K, et al. 2012. Rab5 proteins regulate activation and localization of target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem* 287: 20913-21
- Bronfman FC, Escudero CA, Weis J, Kruttgen A. 2007. Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases. *Dev Neurobiol* 67: 1183-203
- Bronfman FC, Lazo OM, Flores C, Escudero CA. 2014. Spatiotemporal intracellular dynamics of neurotrophin and its receptors. Implications for neurotrophin signaling and neuronal function. *Handbook of experimental pharmacology* 220: 33-65

- Brown TC, Tran IC, Backos DS, Esteban JA. 2005. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. *Neuron* 45: 81-94
- Bucci C, Bakke O, Progida C. 2010. Rab7b and receptors trafficking. *Commun Integr Biol* 3: 401-4
- Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, et al. 1992. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70: 715-28
- Cobos I, Borello U, Rubenstein JL. 2007. Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* 54: 873-88
- Cohen MS, Bas Orth C, Kim HJ, Jeon NL, Jaffrey SR. 2011. Neurotrophin-mediated dendrite-to-nucleus signaling revealed by microfluidic compartmentalization of dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11246-51
- Cosker KE, Segal RA. 2014. Neuronal signaling through endocytosis. Cold Spring Harb Perspect Biol 6
- Cox LJ, Hengst U, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Jaffrey SR. 2008. Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat Cell Biol* 10: 149-59
- Crino P, Khodakhah K, Becker K, Ginsberg S, Hemby S, Eberwine J. 1998. Presence and phosphorylation of transcription factors in developing dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2313-8
- Chao MV. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4: 299-309
- Chen PI, Kong C, Su X, Stahl PD. 2009. Rab5 isoforms differentially regulate the trafficking and degradation of epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 284: 30328-38
- Chen Y, Wang PY, Ghosh A. 2005a. Regulation of cortical dendrite development by Rap1 signaling. *Mol Cell Neurosci* 28: 215-28
- Chen ZY, Ieraci A, Tanowitz M, Lee FS. 2005b. A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Mol Biol Cell* 16: 5761-72
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365: 855-9
- Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, Watson R, Worth D, et al. 2006. Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* 52: 293-305
- Devon RS, Orban PC, Gerrow K, Barbieri MA, Schwab C, et al. 2006. Als2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9595-600
- Dijkhuizen PA, Ghosh A. 2005. BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways. *J Neurobiol* 62: 278-88
- Dikic I, Schlessinger J, Lax I. 1994. PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr Biol* 4: 702-8
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8: 1454-68
- Du K, Montminy M. 1998. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. J Biol Chem 273: 32377-9

- Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R. 1994. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368: 147-50
- Farkhondeh A, Niwa S, Takei Y, Hirokawa N. 2015. Characterizing KIF16B in neurons reveals a novel intramolecular "stalk inhibition" mechanism that regulates its capacity to potentiate the selective somatodendritic localization of early endosomes. *J Neurosci* 35: 5067-86
- Fernandez M, Sanchez-Franco F, Palacios N, Sanchez I, Cacicedo L. 2005. IGF-I and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate cAMP-response element-binding protein (CREB)-dependent transcription via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in pituitary cells: requirement of Rap1. *Journal of molecular endocrinology* 34: 699-712
- Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. 1997. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19: 1031-47
- Finsterwald C, Fiumelli H, Cardinaux JR, Martin JL. 2010. Regulation of dendritic development by BDNF requires activation of CRTC1 by glutamate. *J Biol Chem* 285: 28587-95
- Fu X, Yang Y, Xu C, Niu Y, Chen T, et al. 2011. Retrolinkin cooperates with endophilin A1 to mediate BDNF-TrkB early endocytic trafficking and signaling from early endosomes. *Mol Biol Cell* 22: 3684-98
- Gao FB. 2007. Molecular and cellular mechanisms of dendritic morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 17: 525-32
- Gao Y, Deng K, Hou J, Bryson JB, Barco A, et al. 2004. Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration in vivo. *Neuron* 44: 609-21
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, et al. 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118: 127-38
- Ghiretti AE, Paradis S. 2014. Molecular mechanisms of activity-dependent changes in dendritic morphology: role of RGK proteins. *Trends Neurosci* 37: 399-407
- Ginty DD, Segal RA. 2002. Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol* 12: 268-74
- Glebova NO, Ginty DD. 2005. Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 28: 191-222
- Gonzalez GA, Montminy MR. 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-80
- Gorski JA, Zeiler SR, Tamowski S, Jones KR. 2003. Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci* 23: 6856-65
- Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64: 915-25
- Gottschalk WA, Jiang H, Tartaglia N, Feng L, Figurov A, Lu B. 1999. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *Learning & memory* 6: 243-56
- Green TA, Alibhai IN, Unterberg S, Neve RL, Ghose S, et al. 2008. Induction of activating transcription factors (ATFs) ATF2, ATF3, and ATF4 in the nucleus accumbens and their regulation of emotional behavior. *J Neurosci* 28: 2025-32
- Grewal SS, Fass DM, Yao H, Ellig CL, Goodman RH, Stork PJ. 2000. Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. J Biol Chem 275: 34433-41

- Grewal SS, York RD, Stork PJ. 1999. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9: 544-53
- Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, et al. 1996. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* 16: 7950-64
- Gutmann DH, Parada LF, Silva AJ, Ratner N. 2012. Neurofibromatosis type 1: modeling CNS dysfunction. *J Neurosci* 32: 14087-93
- Ha S, Redmond L. 2008. ERK mediates activity dependent neuronal complexity via sustained activity and CREB-mediated signaling. *Dev Neurobiol* 68: 1565-79
- Hand R, Bortone D, Mattar P, Nguyen L, Heng JI, et al. 2005. Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48: 45-62
- Hannila SS, Filbin MT. 2008. The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Exp Neurol* 209: 321-32
- Harigai Y, Natsume M, Li F, Ohtani A, Senzaki K, Shiga T. 2011. Differential roles of calcitonin family peptides in the dendrite formation and spinogenesis of the cerebral cortex in vitro. *Neuropeptides* 45: 263-72
- Harrington AW, Ginty DD. 2013. Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nat Rev Neurosci* 14: 177-87
- Hartman MG, Lu D, Kim ML, Kociba GJ, Shukri T, et al. 2004. Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis. *Mol Cell Biol* 24: 5721-32
- Hisata S, Sakisaka T, Baba T, Yamada T, Aoki K, et al. 2007. Rap1-PDZ-GEF1 interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 178: 843-60
- Hoepfner S, Severin F, Cabezas A, Habermann B, Runge A, et al. 2005. Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell* 121: 437-50
- Horch HW, Katz LC. 2002. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci* 5: 1177-84
- Hu F, Deng X, Yang X, Jin H, Gu D, et al. 2015. Hypoxia upregulates Rab11-family interacting protein 4 through HIF-1alpha to promote the metastasis of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 34: 6007-17
- Huang EJ, Reichardt LF. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736
- Huang SH, Wang J, Sui WH, Chen B, Zhang XY, et al. 2013. BDNF-dependent recycling facilitates TrkB translocation to postsynaptic density during LTP via a Rab11dependent pathway. *J Neurosci* 33: 9214-30
- Huang SH, Zhao L, Sun ZP, Li XZ, Geng Z, et al. 2009. Essential role of Hrs in endocytic recycling of full-length TrkB receptor but not its isoform TrkB.T1. J Biol Chem 284: 15126-36
- Ibanez CF, Simi A. 2012. p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends Neurosci* 35: 431-40
- Imamura F, Greer CA. 2009. Dendritic branching of olfactory bulb mitral and tufted cells: regulation by TrkB. *PLoS One* 4: e6729
- Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, et al. 1998. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca2+ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 21: 869-83

- Jan YN, Jan LY. 2010. Branching out: mechanisms of dendritic arborization. Nat Rev Neurosci 11: 316-28
- Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. 2005. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 25: 11300-12
- Jeanneteau F, Deinhardt K, Miyoshi G, Bennett AM, Chao MV. 2010. The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching. *Nat Neurosci* 13: 1373-9
- Ji Y, Lu Y, Yang F, Shen W, Tang TT, et al. 2010. Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat Neurosci* 13: 302-9
- Kaech S, Banker G. 2006. Culturing hippocampal neurons. Nat Protoc 1: 2406-15
- Kapitein LC, Hoogenraad CC. 2011. Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Mol Cell Neurosci* 46: 9-20
- Kapp-Barnea Y, Ninio-Many L, Hirschberg K, Fukuda M, Jeromin A, Sagi-Eisenberg R. 2006. Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulate extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling by accelerating recycling through the endocytic recycling compartment. *Mol Biol Cell* 17: 4130-41
- Kawauchi T, Sekine K, Shikanai M, Chihama K, Tomita K, et al. 2010. Rab GTPasesdependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron* 67: 588-602
- Kholodenko BN. 2002. MAP kinase cascade signaling and endocytic trafficking: a marriage of convenience? *Trends Cell Biol* 12: 173-7
- Kjaerulff O, Brodin L, Jung A. 2011. The structure and function of endophilin proteins. *Cell biochemistry and biophysics* 60: 137-54
- Klein R, Smeyne RJ, Wurst W, Long LK, Auerbach BA, et al. 1993. Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* 75: 113-22
- Kornhauser JM, Cowan CW, Shaywitz AJ, Dolmetsch RE, Griffith EC, et al. 2002. CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron* 34: 221-33
- Kraemer BR, Yoon SO, Carter BD. 2014. The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. *Handbook of experimental pharmacology* 220: 121-64
- Krey JF, Pasca SP, Shcheglovitov A, Yazawa M, Schwemberger R, et al. 2013. Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat Neurosci* 16: 201-9
- Kulkarni VA, Firestein BL. 2012. The dendritic tree and brain disorders. *Mol Cell Neurosci* 50: 10-20
- Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY. 2005. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. J Neurosci 25: 11288-99
- Kwon M, Fernandez JR, Zegarek GF, Lo SB, Firestein BL. 2011. BDNF-promoted increases in proximal dendrites occur via CREB-dependent transcriptional regulation of cypin. *J Neurosci* 31: 9735-45
- Lawan A, Shi H, Gatzke F, Bennett AM. 2013. Diversity and specificity of the mitogenactivated protein kinase phosphatase-1 functions. *Cell Mol Life Sci* 70: 223-37

- Lazo OM, Gonzalez A, Ascano M, Kuruvilla R, Couve A, Bronfman FC. 2013. BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching. *J Neurosci* 33: 6112-22
- Lee KF, Li E, Huber LJ, Landis SC, Sharpe AH, et al. 1992. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* 69: 737-49
- Lewis TL, Jr., Courchet J, Polleux F. 2013. Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J Cell Biol* 202: 837-48
- Li L, Carter J, Gao X, Whitehead J, Tourtellotte WG. 2005. The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol Cell Biol* 25: 10286-300
- Li X, Standley C, Sapp E, Valencia A, Qin ZH, et al. 2009. Mutant huntingtin impairs vesicle formation from recycling endosomes by interfering with Rab11 activity. *Mol Cell Biol* 29: 6106-16
- Li X, Valencia A, Sapp E, Masso N, Alexander J, et al. 2010. Aberrant Rab11-dependent trafficking of the neuronal glutamate transporter EAAC1 causes oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *J Neurosci* 30: 4552-61
- Lin DC, Quevedo C, Brewer NE, Bell A, Testa JR, et al. 2006. APPL1 associates with TrkA and GIPC1 and is required for nerve growth factor-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* 26: 8928-41
- Liot G, Zala D, Pla P, Mottet G, Piel M, Saudou F. 2013. Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *J Neurosci* 33: 6298-309
- Liu J, Lamb D, Chou MM, Liu YJ, Li G. 2007a. Nerve growth factor-mediated neurite outgrowth via regulation of Rab5. *Mol Biol Cell* 18: 1375-84
- Liu JJ, Ding J, Wu C, Bhagavatula P, Cui B, et al. 2007b. Retrolinkin, a membrane protein, plays an important role in retrograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2223-8
- Liu W, Tundwal K, Liang Q, Goplen N, Rozario S, et al. 2010. Establishment of extracellular signal-regulated kinase 1/2 bistability and sustained activation through Sprouty 2 and its relevance for epithelial function. *Mol Cell Biol* 30: 1783-99
- Lonze BE, Ginty DD. 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35: 605-23
- Lu B, Pang PT, Woo NH. 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6: 603-14
- Luikart BW, Nef S, Virmani T, Lush ME, Liu Y, et al. 2005. TrkB has a cell-autonomous role in the establishment of hippocampal Schaffer collateral synapses. J Neurosci 25: 3774-86
- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, et al. 2001. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2449-54
- Manadas B, Santos AR, Szabadfi K, Gomes JR, Garbis SD, et al. 2009. BDNF-induced changes in the expression of the translation machinery in hippocampal neurons: protein levels and dendritic mRNA. *J Proteome Res* 8: 4536-52
- Mariga A, Zavadil J, Ginsberg SD, Chao MV. 2015. Withdrawal of BDNF from hippocampal cultures leads to changes in genes involved in synaptic function. *Dev Neurobiol* 75: 173-92

- Marsh HN, Scholz WK, Lamballe F, Klein R, Nanduri V, et al. 1993. Signal transduction events mediated by the BDNF receptor gp 145trkB in primary hippocampal pyramidal cell culture. *J Neurosci* 13: 4281-92
- Marshall CJ. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179-85
- Mataga N, Fujishima S, Condie BG, Hensch TK. 2001. Experience-dependent plasticity of mouse visual cortex in the absence of the neuronal activity-dependent marker egr1/zif268. J Neurosci 21: 9724-32
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 295-318
- Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, et al. 2004. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* 116: 445-56
- Miller FD, Kaplan DR. 2001. On Trk for retrograde signaling. Neuron 32: 767-70
- Minichiello L. 2009. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* 10: 850-60
- Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M. 2002. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36: 121-37
- Miyamoto Y, Yamauchi J, Tanoue A, Wu C, Mobley WC. 2006. TrkB binds and tyrosinephosphorylates Tiam1, leading to activation of Rac1 and induction of changes in cellular morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10444-9
- Mori Y, Matsui T, Fukuda M. 2013. Rabex-5 protein regulates dendritic localization of small GTPase Rab17 and neurite morphogenesis in hippocampal neurons. J Biol Chem 288: 9835-47
- Nakayama D, Iwata H, Teshirogi C, Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H. 2015. Longdelayed expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1 refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. *J Neurosci* 35: 819-30
- Oehlke O, Schlosshardt C, Feuerstein M, Roussa E. 2012. Acidosis-induced V-ATPase trafficking in salivary ducts is initiated by cAMP/PKA/CREB pathway via regulation of Rab11b expression. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44: 1254-65
- Oliveira AF, Yasuda R. 2014. Neurofibromin is the major ras inactivator in dendritic spines. *J Neurosci* 34: 776-83
- Panayotis N, Karpova A, Kreutz MR, Fainzilber M. 2015. Macromolecular transport in synapse to nucleus communication. *Trends Neurosci* 38: 108-16
- Park H, Poo MM. 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14: 7-23
- Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD. 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305: 1972-5
- Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, et al. 1996. Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol* 16: 694-703
- Parrish JZ, Emoto K, Kim MD, Jan YN. 2007. Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. *Annu Rev Neurosci* 30: 399-423
- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, et al. 2006. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52: 437-44

- Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. 2011. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1619-33
- Poirier R, Cheval H, Mailhes C, Charnay P, Davis S, Laroche S. 2007. Paradoxical role of an Egr transcription factor family member, Egr2/Krox20, in learning and memory. *Front Behav Neurosci* 1: 6
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. 2007. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90: 397-406
- Rauskolb S, Zagrebelsky M, Dreznjak A, Deogracias R, Matsumoto T, et al. 2010. Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. *J Neurosci* 30: 1739-49
- Redmond L, Kashani AH, Ghosh A. 2002. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34: 999-1010
- Reichardt LF. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1545-64
- Ren M, Xu G, Zeng J, De Lemos-Chiarandini C, Adesnik M, Sabatini DD. 1998. Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6187-92
- Riccio A, Pierchala BA, Ciarallo CL, Ginty DD. 1997. An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science* 277: 1097-100
- Ring RH, Alder J, Fennell M, Kouranova E, Black IB, Thakker-Varia S. 2006. Transcriptional profiling of brain-derived-neurotrophic factor-induced neuronal plasticity: a novel role for nociceptin in hippocampal neurite outgrowth. J Neurobiol 66: 361-77
- Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122: 735-49
- Rolewska P, Simm A, Silber RE, Bartling B. 2014. Reduced expression level of the cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein contributes to lung aging. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50: 201-11
- Roskoski R, Jr. 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66: 105-43
- Roux PP, Barker PA. 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67: 203-33
- Rudolph D, Tafuri A, Gass P, Hammerling GJ, Arnold B, Schutz G. 1998. Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4481-6
- Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. 2014. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 94: 1099-142
- Santi S, Cappello S, Riccio M, Bergami M, Aicardi G, et al. 2006. Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *EMBO J* 25: 4372-80
- Satoh D, Sato D, Tsuyama T, Saito M, Ohkura H, et al. 2008. Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes. *Nat Cell Biol* 10: 1164-71
- Saxena S, Bucci C, Weis J, Kruttgen A. 2005. The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci* 25: 10930-40

- Schiavo G, Greensmith L, Hafezparast M, Fisher EM. 2013. Cytoplasmic dynein heavy chain: the servant of many masters. *Trends Neurosci* 36: 641-51
- Schlierf B, Fey GH, Hauber J, Hocke GM, Rosorius O. 2000. Rab11b is essential for recycling of transferrin to the plasma membrane. *Exp Cell Res* 259: 257-65
- Schratt GM, Nigh EA, Chen WG, Hu L, Greenberg ME. 2004. BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. J Neurosci 24: 7366-77
- Shmelkov SV, Hormigo A, Jing D, Proenca CC, Bath KG, et al. 2010. Slitrk5 deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice. *Nat Med* 16: 598-602, 1p following 02
- Sholl DA. 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87: 387-406
- Skeldal S, Matusica D, Nykjaer A, Coulson EJ. 2011. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR). *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33: 614-25
- Snider WD. 1994. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77: 627-38
- Song M, Giza J, Proenca CC, Jing D, Elliott M, et al. 2015. Slitrk5 Mediates BDNF-Dependent TrkB Receptor Trafficking and Signaling. *Dev Cell* 33: 690-702
- Spencer TK, Mellado W, Filbin MT. 2008. BDNF activates CaMKIV and PKA in parallel to block MAG-mediated inhibition of neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 38: 110-6
- Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 513-25
- Stillman AA, Krsnik Z, Sun J, Rasin MR, State MW, et al. 2009. Developmentally regulated and evolutionarily conserved expression of SLITRK1 in brain circuits implicated in Tourette syndrome. *J Comp Neurol* 513: 21-37
- Stokes L. 2013. Rab5 regulates internalisation of P2X4 receptors and potentiation by ivermectin. *Purinergic Signal* 9: 113-21
- Sui WH, Huang SH, Wang J, Chen Q, Liu T, Chen ZY. 2015. Myosin Va mediates BDNFinduced postendocytic recycling of full-length TrkB and its translocation into dendritic spines. *J Cell Sci* 128: 1108-22
- Takei N, Inamura N, Kawamura M, Namba H, Hara K, et al. 2004. Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. J Neurosci 24: 9760-9
- Tapley P, Lamballe F, Barbacid M. 1992. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7: 371-81
- Thakker-Varia S, Alder J, Crozier RA, Plummer MR, Black IB. 2001. Rab3A is required for brain-derived neurotrophic factor-induced synaptic plasticity: transcriptional analysis at the population and single-cell levels. *J Neurosci* 21: 6782-90
- Thoenen H. 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity. Science 270: 593-8
- Trifilieff P, Lavaur J, Pascoli V, Kappes V, Brami-Cherrier K, et al. 2009. Endocytosis controls glutamate-induced nuclear accumulation of ERK. *Mol Cell Neurosci* 41: 325-36

- Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG. 1996. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* 135: 913-24
- Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J. 2008. Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68: 264-88
- Varsano T, Dong MQ, Niesman I, Gacula H, Lou X, et al. 2006. GIPC is recruited by APPL to peripheral TrkA endosomes and regulates TrkA trafficking and signaling. *Mol Cell Biol* 26: 8942-52
- Veyrac A, Gros A, Bruel-Jungerman E, Rochefort C, Kleine Borgmann FB, et al. 2013. Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 7062-7
- Wang Y, Roche O, Yan MS, Finak G, Evans AJ, et al. 2009. Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. *Nat Med* 15: 319-24
- Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Jr., Karcher R, et al. 2008. Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* 135: 535-48
- Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA. 2001. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* 4: 981-8
- Wilson JM, de Hoop M, Zorzi N, Toh BH, Dotti CG, Parton RG. 2000. EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Mol Biol Cell* 11: 2657-71
- Wu C, Cui B, He L, Chen L, Mobley WC. 2009. The coming of age of axonal neurotrophin signaling endosomes. *J Proteomics* 72: 46-55
- Wu C, Lai CF, Mobley WC. 2001. Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. J Neurosci 21: 5406-16
- Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME. 1998. Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 18: 1946-55
- Xu B, Zang K, Ruff NL, Zhang YA, McConnell SK, et al. 2000. Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor TrkB. *Neuron* 26: 233-45
- Xue H, Qiao Y, Ni P, Wang J, Chen C, Huang G. 2011. A CRE that binds CREB and contributes to PKA-dependent regulation of the proximal promoter of human RAB25 gene. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43: 348-57
- Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC. 1997. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. J Comp Neurol 378: 135-57
- Ye H, Kuruvilla R, Zweifel LS, Ginty DD. 2003. Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* 39: 57-68
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, et al. 2002. Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci* 22: 1532-40
- York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ. 2000. Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* 20: 8069-83

- York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, et al. 1998. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392: 622-6
- Zagrebelsky M, Holz A, Dechant G, Barde YA, Bonhoeffer T, Korte M. 2005. The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J Neurosci* 25: 9989-99
- Zanassi P, Paolillo M, Feliciello A, Avvedimento EV, Gallo V, Schinelli S. 2001. cAMPdependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. *J Biol Chem* 276: 11487-95
- Zeigerer A, Gilleron J, Bogorad RL, Marsico G, Nonaka H, et al. 2012. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature* 485: 465-70
- Zerial M, McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 107-17
- Zhang G, Bowling H, Hom N, Kirshenbaum K, Klann E, et al. 2014. In-depth quantitative proteomic analysis of de novo protein synthesis induced by brain-derived neurotrophic factor. *J Proteome Res* 13: 5707-14
- Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M. 2002. c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat Genet* 30: 416-20
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, et al. 2005. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4459-64
- Zheng J, Shen WH, Lu TJ, Zhou Y, Chen Q, et al. 2008. Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. J Biol Chem 283: 13280-8
- Zhou B, Cai Q, Xie Y, Sheng ZH. 2012. Snapin recruits dynein to BDNF-TrkB signaling endosomes for retrograde axonal transport and is essential for dendrite growth of cortical neurons. *Cell Rep* 2: 42-51
- Zuccaro E, Bergami M, Vignoli B, Bony G, Pierchala BA, et al. 2014. Polarized expression of p75(NTR) specifies axons during development and adult neurogenesis. *Cell Rep* 7: 138-52
- Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. 2005. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* 6: 615-25