

Tesis Doctoral

Función de las protocadherinas en cluster alfa en interacciones intercelulares

Ferrero, Florencia Victoria

2015-06-29

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ferrero, Florencia Victoria. (2015-06-29). Función de las protocadherinas en cluster alfa en interacciones intercelulares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ferrero, Florencia Victoria. "Función de las protocadherinas en cluster alfa en interacciones intercelulares". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-06-29.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Función de las protocadherinas en cluster alfa en
interacciones intercelulares**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área **Ciencias Biológicas**

Florencia Victoria Ferrero

Director de tesis: Dra. Paula Cramer

Consejero de Estudios: Dr. Alberto Kornblhitt

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias
(IFIBYNE - CONICET), Departamento de Fisiología, Biología
Molecular y Celular, FCEyN - UBA

Buenos Aires, 2015

Resumen en castellano

Función de las protocadherinas en cluster alfa en interacciones intercelulares

Resumen

Las protocadherinas en cluster (Pcdh) son un grupo de glicoproteínas de la superficie de las neuronas que se expresan en regiones específicas del sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados (cerebro, corteza, bulbo olfatorio, médula espinal, hipocampo). Dada su similitud con otras moléculas de adhesión (pertenecen a la superfamilia de las Cadherinas, involucradas en adhesión celular dependiente de calcio $-Ca^{2+}$ -) y a que su presencia está enriquecida en las sinapsis, podrían ayudar a determinar la especificidad de algunas conexiones sinápticas. Su función es aún desconocida. Consisten en más de 50 genes, codificados por tres *clusters* de genes muy relacionados entre sí: alfa, beta y gama. A través de *splicing* alternativo se generan múltiples isoformas alfa y gama, lo que potencialmente genera una enorme variabilidad en moléculas de la superficie celular. La expresión combinada de estas variantes podría ayudar a establecer, hasta cierto punto, la identidad neuronal. Se sabe que neuronas individuales expresan distintas isoformas de Pcdh en forma monoalélica y estocástica, a excepción de la isoforma c2.

En este trabajo de tesis intentamos comenzar a comprender el rol biológico de esta diversidad. Logramos determinar que las isoformas Pcdh alfa 4 y c2 entablan interacciones intercelulares exclusivamente homofílicas. Este hallazgo tiene importantes implicancias respecto del posible rol de las Pcdh en la generación de diversidad neuronal ya que es compatible con modelos de interacción proteína-proteína que conducen a la distinción entre terminaciones “propias” y “no propias” de las neuronas. Además, encontramos indicios de que ciertas isoformas de Pcdh podrían tener comportamientos diferentes respecto de otros miembros del mismo cluster. Por ejemplo, en cultivos celulares donde sobreexpresamos la isoforma alfa c2, esta muestra una mejor localización en los contactos célula-célula a medida que transcurre el tiempo, a diferencia de lo que ocurre con las isoformas alfa 4 o alfa 8. A pesar de que, como mencionamos más arriba, estas proteínas pertenecen a la superfamilia de las cadherinas y conservan algunos motivos típicos de las mismas, observamos que se comportan distinto de las cadherinas clásicas. Comparando las isoformas de Pcdh alfa con la cadherina clásica E-cadherina (Ecad), logramos demostrar que no están involucradas en procesos de reciclado de la membrana plasmática, que no median una fuerte adhesión célula-célula, y que el Ca^{2+} no parece afectar su localización en los contactos célula-célula ni su procesamiento proteolítico.

Por otro lado, encontramos que las Pcdh alfa pueden sufrir proteólisis en la membrana de una manera similar a la de las cadherinas clásicas. Nuevamente observamos diferencias entre las Pcdh, esta vez en el nivel de clivaje proteico entre distintas isoformas de Pcdh del cluster alfa.

Palabras clave

Protocadherina, cluster, adhesión, homofílico, interacción célula-célula

Resumen en inglés

Role of clustered alpha protocadherins in intercellular interactions

Abstract

Clustered protocadherins (Pcdh) are a group of neuronal surface glycoproteins that are expressed in specific regions of the central nervous system (CNS) of vertebrates (brain cortex, olfactory bulb, spinal chord, hippocampus). Because of their similarity with other adhesion molecules (they belong to the Cadherin superfamily, involved in calcium -Ca²⁺- dependent cell adhesion) and enriched presence at synapses, they could be involved in determining the specificity of some synaptic connections. Their function remains unknown. They consist of over 50 genes encoded by three closely related gene clusters: alpha, beta and gamma. Alternative splicing generates multiple alpha and gamma isoforms, potentially producing enormous variability in cell surface molecules. The combinatorial expression of these variants could help to establish, to some extent, neuronal identity. It is known that single neurons express Pcdh isoforms monoallelically and stochastically, with the exception of the "c2 type" isoform.

In this project we attempted to begin to understand the biological role of this diversity. We were able to establish that Pcdh alpha 4 and c2 isoforms engage exclusively in homophilic intercellular interactions. This finding has important implications regarding a possible role for Pcdh in the generation of neuronal diversity because it is compatible with protein-protein interaction models that lead to distinction of "self" and "non-self" projections from neurons.

Also, we found evidence that certain Pcdh isoforms may have a different behaviour from other members of the same cluster. For example, when we overexpress the alpha c2 isoform in cultured cells, it shows a better localization to cell-to-cell contacts over time, unlike what happens for alpha 4 or alpha 8 isoforms. Even though, as we mentioned above, these proteins belong to the cadherin superfamily and they possess some of their typical motifs, we observed they behave differently from classic cadherins. By comparing Pcdh alpha isoforms against E-cadherin (Ecad), we could demonstrate that they are not involved in membrane recycling processes, that they do not mediate strong cell-cell adhesion and that Ca²⁺ does not seem to affect their localization to cell-cell contacts nor their proteolytic processing.

On the other hand, we found that Pcdh alpha can undergo proteolysis at the cell membrane in a way similar to that of classic cadherins. Again, we observed differences among Pcdh, this time at the level of protein cleavage between different Pcdh alpha isoforms.

Key words

Protocadherin, cluster, adhesion, homophilic, cell-cell interaction

Agradecimientos

Son tantos a los que tengo que agradecer, por tantas cosas, que tengo la certeza de que me voy a quedar corta...pero voy a hacer mi mejor intento por hacer justicia a cada uno.

En primer lugar, gracias a Paula por darme la oportunidad de aprender, trabajar y crecer junto a vos durante estos años. Por cada charla de ciencia, de docencia, de música, etc. Gracias en serio.

Gracias a Alberto, Anabella y los chicos de sus grupos por estar ahí cada vez que los necesité.

Un millón de gracias a los mejores compañeros de laboratorio del mundo (por más que la vida a algunos ahora los tenga en otros pagos): Berni, Diegui, Sol, Dai, Juli, Angi, Martincito, Eli, Lau, Pau, Yang y Gise. Por ayudarme y por dejarme que los ayude, por cada mate, por cada jueves dulce, por compartir un pedazo de sus vidas conmigo cada día. Los quiero chicos y aguante el LFBM Sur!

Gracias a Dani De Luca por ser una persona maravillosa, capaz de vencer cualquier burocracia con una sonrisa y con un buen humor a prueba de todo.

Y gracias a todos los miembros de los grupos del IFIBYNE (actuales y pasados) que me ayudaron a llegar a este momento: Mariano, Marian F, Marian H, Maria, Jose, Ali, Mati, Alan, Carli, Fer.

Muchas gracias a Oscar Taboga y su grupo, especialmente a Andrea y Gabi, por su paciencia y su ayuda. Fue un placer aprender de ustedes.

Gracias Gonza y Tamy, amigos desde el comienzo de este camino que es la biología, lo que fueron estos años y lo que nos espera todavía. Gracias.

Gracias Molita, mi compañera de recitales por excelencia. Que nunca se terminen nuestros brindis y nuestras conspiraciones. Gracias por estar siempre.

Gracias a todas las genéticas, que me incorporaron en forma honoraria a su grupo: Sole, Anita, Lu, Gabi, Solcito, Agus, Jo, Lai, Marian...gracias por esas cadenas interminables de mails, por las meriendas, por las confusiones con las empanadas. Mi vida es mucho más colorida e infinitamente más divertida gracias a ustedes. Como diría alguien que conocemos bien, las qui!!

Gracias Juli y Sebas, mis minions. Por ser un par de amigos sin igual, gracias por toda la alegría que compartimos y por todo su cariño.

Gracias Peti querida, por ser una GRAN amiga. Por estar en todo, por compartir tanto conmigo, por tus retos y tu ayuda. Te quiero.

Gracias a “las chicas”: Mili, Coty y Ro. Gracias por ser incondicionales, por siempre preguntarme qué era el doctorado (aunque yo sé que era chino básico), por bancarme en todas. Las adoro con toda el alma.

Gracias a toda toda mi familia (los Ferrero-Rodriguez-Eriksson-Bolado), sobre todo a mi mamá, mi papá y mis hermanos. Gracias por empujarme a perseguir mi vocación, por dejarme elegir, por dejar que me equivoque y por estar ahí para ayudarme siempre. Los quiero infinito.

También te quiero agradecer especialmente a vos. Gracias por hacerme sentir que todo lo que hacía era interesante, emocionante y un motivo de orgullo, por pasarme tu amor por la docencia y tu espíritu inquieto. Si algo lamento de haber tardado tanto, es que no puedo celebrar con vos. Gracias Annie.

Por último, te doy las gracias a vos Rami. Gracias por haberme acompañado todo el camino, por entenderme ni cuando yo me entiendo, por quererme así, por darme fuerza cuando yo ya no podía. Si llegué hasta acá, fue en gran medida gracias a vos. Gracias por tu amor incondicional y por elegirme cada día. ¡Te amo con todo el corazón!

Gracias a todos, gracias, gracias, gracias.

Para mi abuela Annie

Un sutil pensamiento erróneo puede dar lugar a una indagación fructífera que revela verdades de gran valor.

Isaac Asimov (1920-1983)

Abreviaturas

ADNc: ADN copia

BFA: brefeldin A

CTCF: factor de unión a CCCTC

CTF: *carboxi-terminal fragment* o fragmento carboxilo-terminal

cyt: dominio citoplasmático

Dscam: *Down syndrome cell adhesion molecule* o molécula de adhesión del síndrome de Down

EC: dominio extracelular

Ecad: E-cadherina

FL: *full length* o forma completa

GFP: *green fluorescent protein* o proteína verde fluorescente

GFP+: GFP positivo

HS5-1 o HS7: *hyper-sensitive site* o sitio hipersensible 5-1 o 7

LCR: *locus control region* o región controladora de locus

MMP: metaloproteasa de matriz

N2a: neuro 2 a

NRSE: *neuron-restrictive silencer element* o elemento silenciador restringido a neuronas

Pcdh: protocadherina

PcdhEcyt: protocadherina con dominio citoplasmático de E-cadherina

RE: retículo endoplasmático

SNC: sistema nervioso central

SP: *signal peptide* o péptido señal

TM: dominio transmembrana

v: variable

WB: western blot

Introducción

Introducción:

La superfamilia de las cadherinas comprende un gran número y variedad de proteínas transmembrana involucradas en interacciones célula-célula que tienen lugar durante el desarrollo, la formación de tejidos y en el cerebro adulto (Takeichi 1995; Takeichi and Abe 2005). Esta familia incluye a las cadherinas clásicas, las cadherinas desmosomales (desmocolinas y desmogleínas), las cadherinas atípicas (como Fat y Flamingo) y las protocadherinas (ver figura I1). Todas ellas tienen en común poseer dominios tipo cadherina en su porción extracelular, que incluyen motivos de unión a Ca^{2+} . En consecuencia, las interacciones que establecen son, en la mayoría de los casos, dependientes de Ca^{2+} y de carácter homofílico.

Con aproximadamente 80 miembros, las protocadherinas (Pcdh) representan el mayor subgrupo dentro de la superfamilia de las cadherinas. En los mamíferos, más de 50 de los genes que codifican para estas Pcdh están agrupados en tres clusters: alfa, beta y gama (Frank and Kemler 2002; Junghans et al. 2005). Estas reciben el nombre de *protocadherinas en cluster*. El presente trabajo de tesis fue desarrollado en torno al estudio de las Pcdh del cluster alfa.

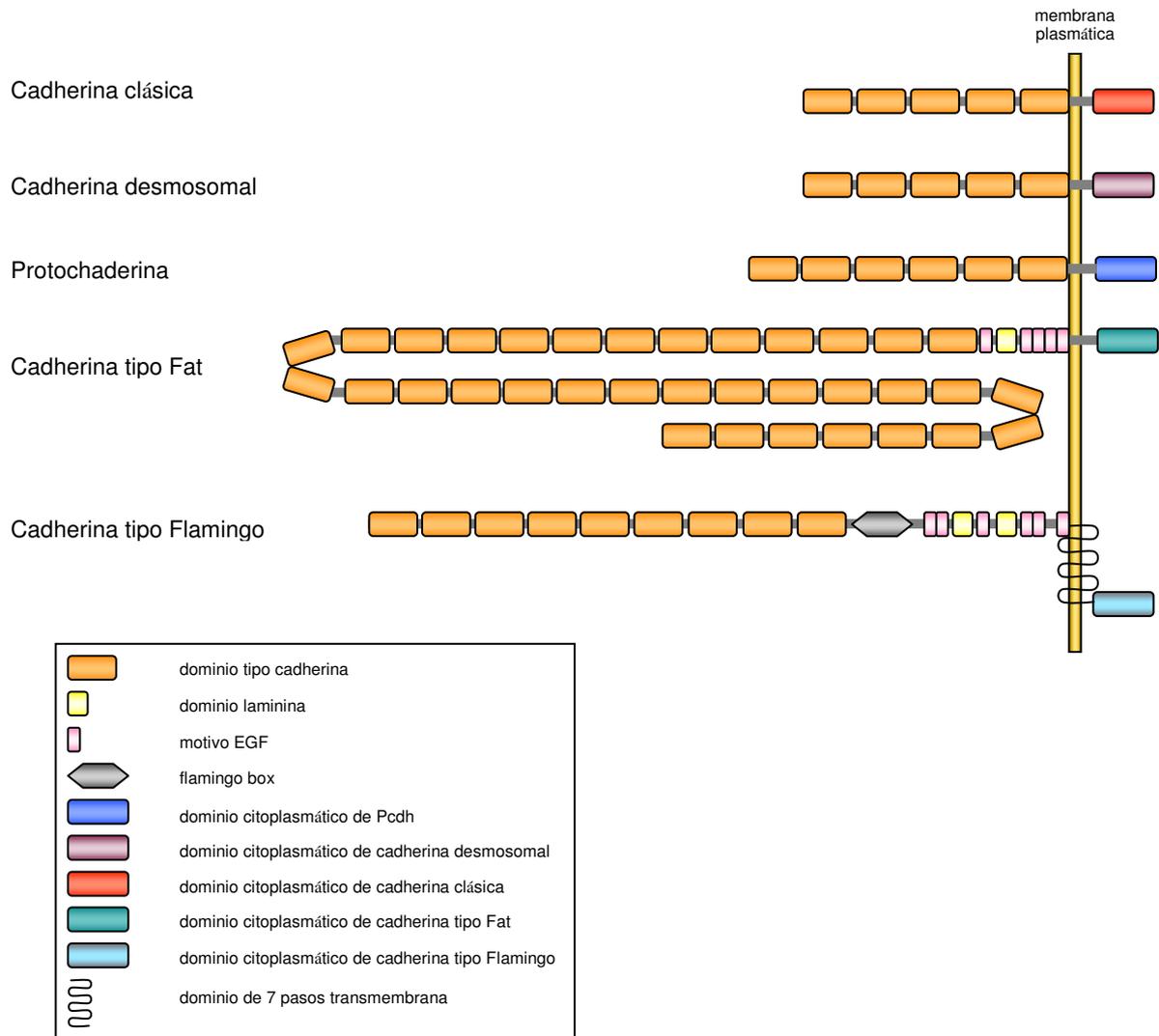


Figura II. Esquema de la superfamilia de las cadherinas. Ejemplificamos un miembro tipo de cada grupo, mostrando la diferencia en la composición de sus porciones extracelulares, transmembrana y citosólicas. En el cuadro se detalla el nombre de los distintos componentes.

Protocadherinas en cluster

Estructura génica y regulación de su expresión

Las protocadherinas (Pcdh) en *cluster* son glicoproteínas transmembrana que se encuentran exclusivamente en vertebrados, se expresan únicamente en el sistema nervioso central (SNC, en particular en el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el hipocampo, el cerebelo y la médula espinal) y localizan en las sinapsis. Las más de 50 variantes de Pcdh codificadas por el conjunto de los *clusters* alfa, beta y gama de humano o de ratón, ofrecen el potencial de expresar una enorme diversidad de moléculas de superficie que podrían estar involucradas en establecer, al menos en parte, la identidad neuronal. Se sabe que el cluster gama es indispensable, ya que ratones *knock out* (KO) para el mismo resultan inviables (Wang, Weiner et al. 2002). Sin embargo, aún se desconoce el rol que cumplen estas proteínas en el SNC de los vertebrados.

Las protocadherinas en *cluster* se encuentran en un único locus tanto en el humano como en el ratón (Wu & Maniatis 1999; o dos loci en pez cebra, Noonan et al. 2004). Los clusters alfa y gama del ratón constan respectivamente de 14 y 22 exones dispuestos en tandem (figura I2). Cada uno de estos exones codifica para lo que se denomina una *región variable*, correspondiente a 6 dominios extracelulares o ectodominios (EC), un segmento transmembrana y una pequeña parte del dominio citoplasmático (figura I3, ejemplo con cluster alfa). La porción restante del dominio citoplasmático es codificada por 3 exones ubicados río abajo del tandem de exones, constituyendo la *región constante*, que es diferente entre los *clusters* alfa y gama (Wu and Maniatis 1999). De este modo todas las isoformas provenientes de un mismo *cluster* poseen el mismo dominio carboxilo terminal pero diferente región variable. Cada *exón variable* de las Pcdh en *cluster* es precedido por un promotor. Múltiples variantes son generadas por splicing alternativo de un determinado exón variable a los exones constantes. La activación de un dado promotor determina cuál es la isoforma que se expresa (Tasic et al. 2002).

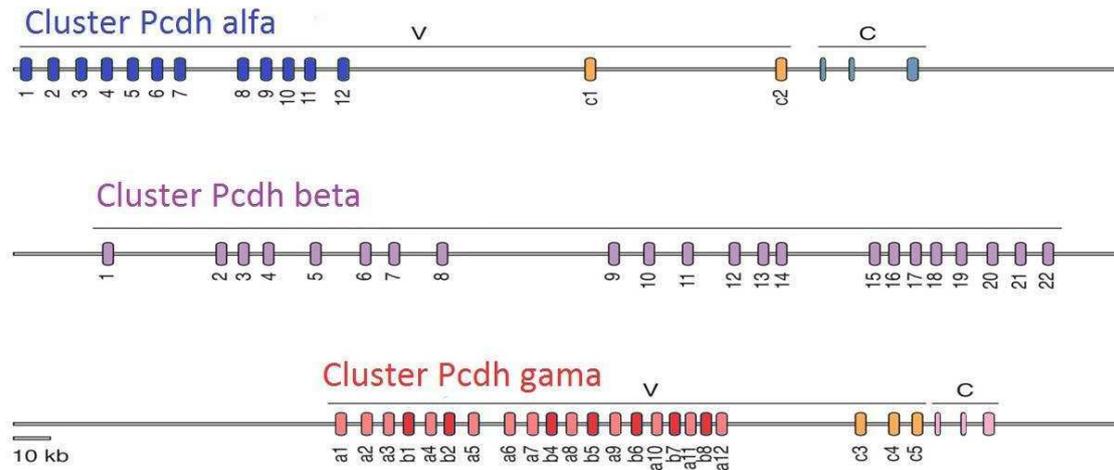


Figura I2. Esquema del arreglo génico de las protocadherinas en cluster de ratón. Como mencionamos en el texto, los tres clusters se ubican uno a continuación del otro, abarcando aproximadamente una Megabase en el cromosoma 18 del ratón. V: exones variables; C: exones que codifican para la región constante.

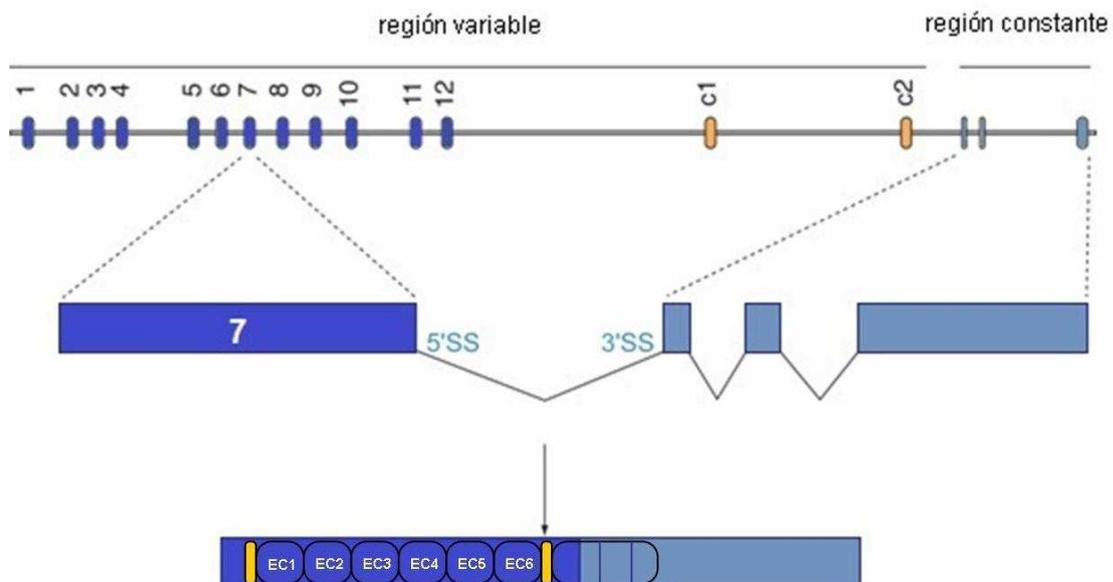


Figura I3. El cluster alfa de ratón. Se muestra la disposición de los exones variables (1 a 12 en azul oscuro, c1 y c2 en naranja), río arriba de los tres exones constantes (en azul claro). Abajo se ilustran la estructura de un pre-mRNA tipo alfa7 (5'SS y 3'SS: sitios dador y aceptor de splicing), y del mRNA maduro correspondiente, con sus regiones 5' y 3' no codificantes, y regiones codificantes (delimitadas por bordes negros): péptido señal y TM (en amarillo), ECs, dominio citosólico.

Análisis filogenéticos indican que las distintas isoformas de Pcdh de cada cluster son altamente homólogas entre sí y, por identidad de secuencia, se puede clasificar estos exones variables en distintos subgrupos (figura I4). Sin embargo, existe una excepción formada por 5 isoformas: las denominadas “isoformas tipo c”. Tanto el cluster alfa como el gama incluyen exones variables tipo c. El cluster alfa incluye a los exones c1 y c2 y el gama, a c3, c4 y c5. Estas divergen evolutivamente respecto de los otros miembros de su propio cluster y presentan un mayor grado de homología entre sí. Las Pcdh beta no tienen exones variables tipo c ni un dominio citoplasmático común, cada isoforma es codificada por un único exón (Wu and Maniatis 1999).

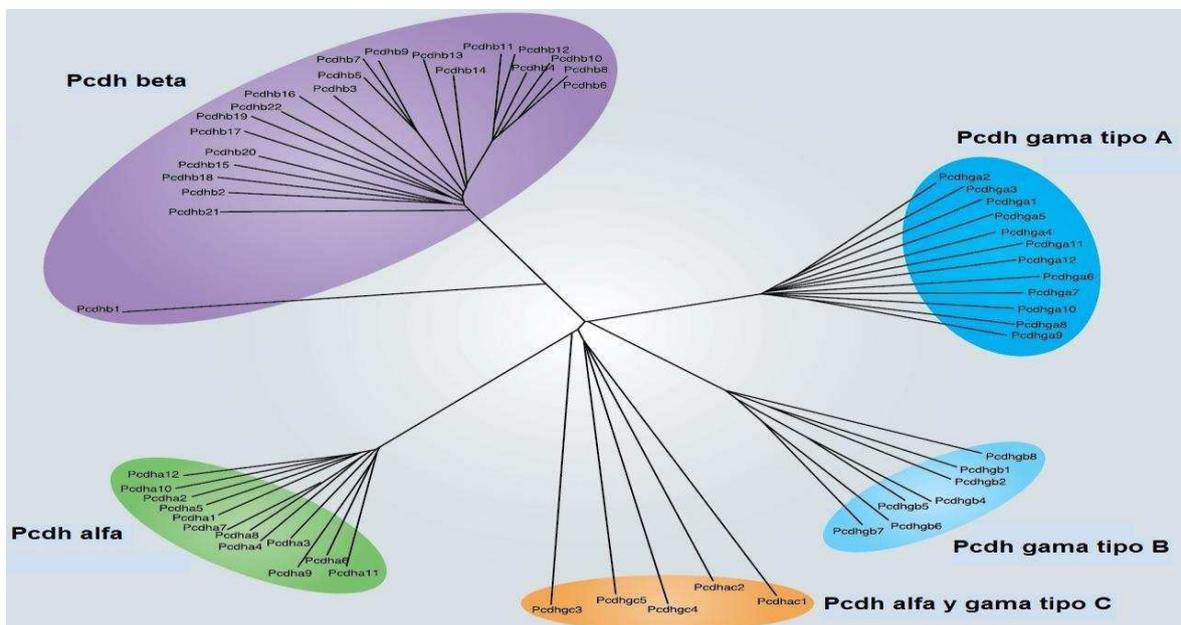


Figura I4. Análisis filogenético de las Pcdh en cluster. Adaptada de Chen & Maniatis 2013. Análisis filogenéticos en ratón muestran que las isoformas codificadas por cada cluster son altamente homólogas entre sí. Según su secuencia se agrupan en alfa (verde), beta (violeta), gama a (celeste oscuro), y gama b (celeste claro). La excepción son 5 isoformas, que pertenecen a alfa y gama, que son divergentes del resto de los miembros de su cluster, pero altamente homólogas entre sí: las variantes tipo C (naranja)

Además de los promotores mencionados anteriormente (que preceden a cada exón variable), se han descubierto dos elementos regulatorios del locus (*locus control region* LCR) con actividad *enhancer* para el cluster alfa, con secuencias en común a la de los promotores de cada exón variable, cuya delección disminuye dramáticamente la expresión de las isoformas alfa, con excepción de c2. Dichos elementos se localizan cerca del extremo 3' del cluster alfa y se los descubrió en base a la conservación de su secuencia y por presentar hipersensibilidad a la degradación con DNasa I (figura I5). Se los denominó HS5-1 y HS7 (HS deriva de las siglas en inglés para “sitio hipersensible”). La adición de HS5-1 río abajo de un cassette reportero LacZ, con un promotor mínimo, mostró la expresión de este reportero a lo largo del SNC de animales transgénicos: este sitio puede promover por sí solo la expresión génica en regiones donde es sabido que se expresan las Pcdh alfa (Ribich et al. 2006). Mientras que la delección de HS5-1 en ratones conduce a una reducción significativa en la expresión de la mayoría de los genes de Pcdh alfa, con excepción de la variante c2 cuya expresión no se ve alterada. La delección del sitio HS7 tiene un efecto negativo más moderado en la expresión de los genes de Pcdh alfa (Kehayova et al. 2011).

Por otro lado, mediante herramientas computacionales, se identificaron múltiples elementos silenciadores restringidos a neuronas (NRSEs) diseminados en el cluster de Pcdh de fuga y se demostró que estos NRSEs unen específicamente el represor transcripcional NRSF/REST tanto *in vivo* como *in vitro*. En *Xenopus* transgénicos, se vio que serían estos NRSEs los encargados de suprimir su expresión fuera del SNC (Tan et al. 2010). Por otro lado, se ha observado que el elemento HS5-1 que mencionamos antes, posee en su secuencia un sitio NRSE no canónico que une NRSF y sería este sistema el involucrado en la represión de la expresión del cluster alfa en células no neuronales (Kehayova et al. 2011).

En los promotores de los exones variables de Pcdh alfa se encuentran sitios de unión para CTCF (factor de unión a CCCTC), elemento perteneciente a la familia de los factores de transcripción de dedos de zinc. También, existen sitios para CTCF dentro del enhancer HS5-1 (Kehayova et al. 2011; Golan-Mashiach et al. 2012). Este factor de transcripción es conocido por mediar interacciones “enhancer/promotor” a través de *loops* de ADN. Existen evidencias experimentales que serían consistentes con este mecanismo en el locus de de las Pcdh alfa. En primer lugar, la disminución de CTCF mediante RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) reduce la expresión de varias isoformas de Pcdh alfa en células en cultivo (Golan-Mashiach et al. 2012). En segundo

lugar, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) a partir de muestras de cerebro de ratones transgénicos, se observó que la delección de HS5-1 en estos animales lleva a una disminución en la unión de CTCF en los promotores de las isoformas cuya expresión se ve más afectada por este promotor (Kehayova et al. 2011). Por último, tanto los promotores activos de las Pcdh alfa como HS5-1 unen CTCF y la fosfoproteína nuclear Rad21 (una subunidad del complejo cohesina, involucrado en la cohesión de las cromátidas hermanas durante la mitosis). Como se ejemplifica en la figura I5, la formación del loop de ADN mediado por la interacción de estos complejos proteicos, permitiría la activación de un promotor por el enhancer HS5-1 (Guo et al. 2012). La disminución en la expresión de CTCF o de Rad21 reduce la expresión de numerosas Pcdh alfa expresadas en forma alternativa (Monahan et al. 2012).

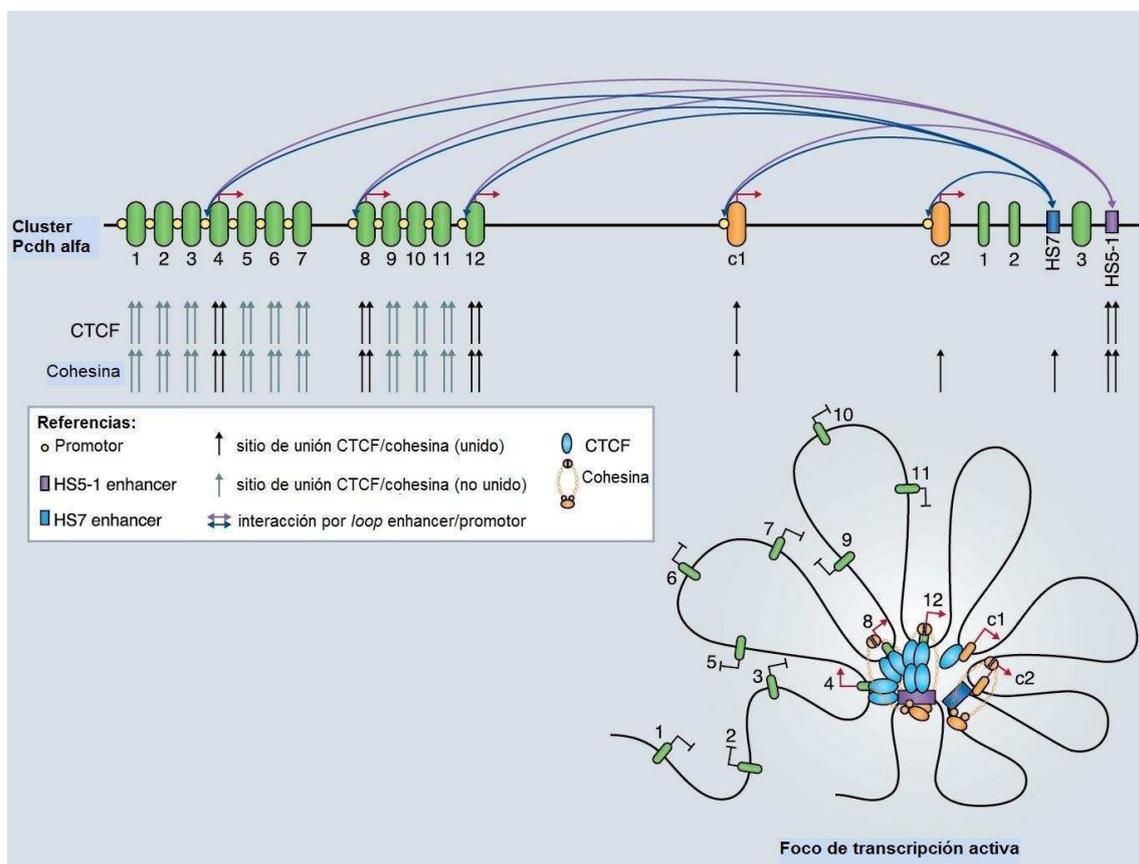


Figura I5. Esquema de la región reguladora del cluster alfa. Adaptada de Chen & Maniatis 2013. Río abajo del cluster se encuentran los enhancers HS5-1 y HS7 (este último, se ubica entre el segundo y el tercer exón que codifican para la región constante de las Pcdh alfa). La interacción entre estos enhancers y los promotores de cada exón alternativo, mediada por CTCF y por cohesina, proveería un mecanismo que permita explicar la expresión monoalélica y estocástica de las distintas isoformas.

Como mencionamos al principio, las Pcdh en cluster se expresan en regiones específicas del SNC. Sin embargo, dentro de cada región no se detecta un patrón espacial o temporal específico que permita relacionar la expresión de ciertas isoformas con un subtipo celular o un determinado momento del desarrollo. Hibridaciones *in situ* muestran la expresión simultánea de al menos dos isoformas del cluster alfa por célula del bulbo olfatorio de ratón (Kohmura et al. 1998). Por otro lado, el estudio de la expresión a nivel de células aisladas reveló que las Pcdh alfa se expresan en forma monoalélica pero estocástica, en células de Purkinje de cerebelo de ratón postnatal día 21 (Esumi et al. 2005) y en neuronas de la corteza cerebral de ratones neonatos P0 y P2 (Paula Cramer y Tom Maniatis, resultados no publicados). Es interesante destacar que estos experimentos revelaron que la isoforma c2 del cluster alfa suele expresarse a niveles más elevados en estadios postnatales, frecuentemente en forma bialélica y que su expresión no es afectada por la delección del LCR (Ribich et al. 2006). Estos resultados pueden ser explicados si el LCR mencionado interactuara físicamente con un sólo promotor o unos pocos a la vez (como se muestra en la figura I5), determinando la expresión de una única isoforma o de unas pocas, respectivamente, por cromosoma (con excepción del promotor de c2).

Curiosamente, se ha observado que las isoformas c4 y c5 del cluster gama siguen un patrón de expresión temporal durante el desarrollo del SNC de ratón distinto del de los demás miembros del cluster (Frank et al. 2005). Todo lo expuesto convierte a las isoformas tipo c en un objeto de estudio de particular interés.

Regulación epigenética de la expresión de las Pcdh en cluster

Se ha observado que los genes de las Pcdh en cluster pueden ser silenciados epigenéticamente por metilación. En líneas celulares de ratón, la metilación de cada promotor de Pcdh alfa, así como de la región 5' de cada exón variable, correlaciona en forma negativa con su nivel de expresión. Además, el inducir experimentalmente la hipometilación aumenta la transcripción de las Pcdh alfa, mientras que, si se induce la hipermetilación, se obtiene el efecto contrario (Kawaguchi et al. 2008). *In vivo*, analizando células Purkinje de ratón, se encontró que los promotores y las regiones 5' de los exones variables c1 y c2 están hipometiladas, lo que es consistente con la expresión de estas isoformas en todas las neuronas. Mientras que para las Pcdh alfa 1 a

12, que muestran expresión diferencial en cada célula, se encontró un patrón de metilación “mosaico” (Kawaguchi et al. 2008).

Hace algunos años, se describió un mecanismo por el cual el estrés ambiental puede modificar marcas epigenéticas. Se trató de un estudio sobre la relación entre el cuidado maternal y cambios en la metilación del promotor del receptor de glucocorticoides en el hipocampo de ratas. Estas alteraciones tenían lugar durante la primera semana de vida y se mantenían durante la adultez de los animales, afectando la expresión génica de este receptor (Weaver et al. 2004). Las Pcdh alfa podrían también jugar un rol en la respuesta a estrés ambiental por parte del cerebro, ya que estudios realizados por McGowan et al. 2011 muestran que un pobre cuidado maternal en ratas correlaciona con cambios en la metilación de estos genes. Sus genes se encuentran hipermetilados en crías provenientes de madres con un bajo cuidado maternal, mientras que en crías de madres con un alto comportamiento maternal se detectaron mayores niveles de expresión de genes de los tres clusters (McGowan et al. 2011).

Esto podría indicar que las Pcdh en cluster cumplen un rol como mediadores de cambios en la formación de circuitos nerviosos en respuesta a estrés ambiental durante el desarrollo del cerebro, si se tiene en cuenta cómo afecta la formación del SNC la deficiencia de estas proteínas durante el desarrollo embrionario y estadios post-natales. Por ejemplo, el cluster gama es esencial pues ratones KO para el mismo resultan inviábiles con una notable apoptosis en la médula espinal al día E21 (Wang, Su et al. 2002; Prasad et al. 2008) y un cultivo de las neuronas de médula demostró que forman sinapsis más débiles (Weiner et al. 2005). Mutantes KO condicionales para la retina muestran que las Pcdh gama regulan la supervivencia de las neuronas durante las primeras dos semanas post-natales, período en que normalmente se produce apoptosis en este tejido (Lefebvre et al. 2008). Nadie ha logrado aún generar ratones nulos para el cluster alfa completo. Sí se han producido ratones que expresan todas sus isoformas alfa carentes del dominio citoplasmático. Estos exhiben anomalías en las proyecciones de neuronas serotoninérgicas (Katori et al. 2009) y en las de las neuronas olfatorias sensoriales hacia los glomérulos (Hasegawa et al. 2008).

Procesamiento proteolítico

Un mecanismo que permite regular la actividad de proteínas de membrana es el clivaje proteolítico. Puede afectar su porción extracelular y/o su parte intracelular. Esto ha sido más estudiado en el caso de las cadherinas clásicas, que mencionaremos más adelante.

Otros grupos observaron procesamiento en el caso de las Pcdh gama: primero tiene lugar un clivaje por una metaloproteasa de matriz que libera el dominio extracelular (generando un fragmento llamado CTF1, que queda anclado a la membrana plasmática) y, luego, el complejo gama-secretasa libera el dominio intracelular (denominado CTF2). Se vio que el fragmento intracelular liberado puede localizar al núcleo (figura I6). Aún no se sabe con certeza qué rol cumple, pero es probable que actúe como factor de transcripción por sí mismo o formando parte de algún complejo proteico (Haas et al. 2005; Hambsch et al. 2005). Esto sugeriría que los defectos observados en ratones deficientes de Pcdh gama son el resultado de algo más que solamente defectos en adhesión celular.

Mientras se desarrollaba el presente trabajo de tesis, Buchanan et al. 2010 encontró que existe procesamiento proteolítico en el caso de las Pcdh alfa, aunque en su caso sería necesaria, previamente, la endocitosis de estas proteínas. Además, dicho procesamiento estaría regulado durante el desarrollo del SNC: a medida que progresa la diferenciación celular, disminuyen los productos de clivaje. En paralelo, nosotros estudiamos este proceso sobre las Pcdh alfa en nuestro sistema de trabajo y los resultados se exponen más adelante.

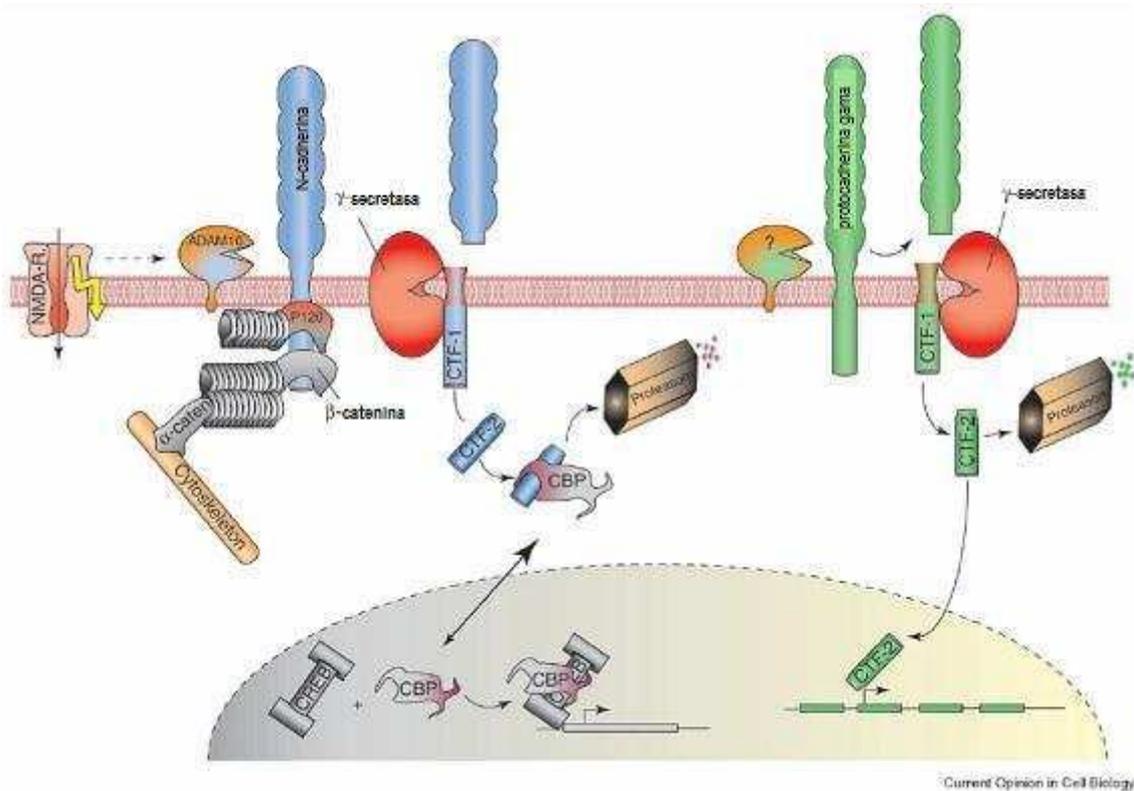


Figura I6. Ejemplo de clivaje proteolítico en cadherinas clásicas y Pcdh gamma. Adaptada de Junghans et al. 2005. Tal y como mencionamos en el texto, en la figura se puede ver cómo el CTF2 soluble, que se libera a partir de la proteólisis de Ncad (azul), secuestra a CBP en el citosol e inhibe la expresión dependiente del complejo CREB/CBP. En el caso de las Pcdh gamma (verde), aún se desconoce qué función puede cumplir el CTF2 soluble.

Cadherinas clásicas: los miembros más conocidos de la superfamilia

Como mencionamos al comienzo de la introducción, las cadherinas conforman una superfamilia de proteínas de membrana, entre las cuales se encuentran las cadherinas clásicas. Estas constituyen moléculas que intervienen en la adhesión homofílica entre células dependiente de Ca^{2+} . Las cadherinas clásicas, con rol en adhesión celular, constan de 5 EC (a diferencia de las Pcdh en cluster que poseen 6) seguidos de un TM y un dominio citosólico, que es reconocido por proteínas del citoesqueleto.

Las funciones de las cadherinas no se limitan únicamente a la adhesión mecánica entre células sino que se extienden a procesos relacionados con la morfogénesis de tejidos, incluyendo reconocimiento entre células y su separación específica o *sorting*, la formación de límites de los tejidos y su mantenimiento, movimiento celular coordinado

e inducción y mantenimiento de polaridad celular y tisular. Por ejemplo, las cadherinas están implicadas en la provisión de un código de adhesión para la formación de circuitos neuronales durante el desarrollo del cerebro, juegan un rol muy importante en la regulación dinámica de contactos adhesivos entre células en diversos procesos morfogénicos como el mencionado (Yagi and Takeichi 2000; Gumbiner 2005).

Se expresan en diversos tejidos y tipos celulares distintos: la E-cadherina (Ecad, cadherina epitelial) se expresa principalmente en células epiteliales y se acumula en uniones estrechas; la N- y R-cadherina (-Ncad- cadherina neuronal y -Rcad- cadherina retinal, respectivamente) se expresan ampliamente en el sistema nervioso y están asociadas a uniones celulares que tienen lugar en las sinapsis; y la VE-cadherina (VEcad, cadherina del endotelio vascular) se expresa en las células endoteliales que recubren la vasculatura y se concentran en las uniones estrechas entre las células para formar una barrera de transporte.

Como mencionamos más arriba, el dominio citosólico de las cadherinas clásicas es reconocido por proteínas de la maquinaria del citoesqueleto que contribuyen a formar las uniones estrechas y a darles fortaleza. Por ejemplo, unen p120 y también beta-catenina. A través de esta última se vinculan con alfa-catenina y con el citoesqueleto de actina.

Aún no se han reportado proteínas que interactúen en forma comprobada con la porción citoplasmática de las Pcdh en cluster, aunque las Pcdh alfa fueron descubiertas al estudiar las proteínas a las cuales se une Fyn (una kinasa de tirosinas de la familia Src) que se expresa en sistema nervioso (Kohmura et al. 1998). Las Pcdh alfa poseen en su dominio citoplasmático un motivo PXXP, típico de unión a dominios SH3 que son característicos de las kinasas Src. Esto podría sugerir un posible rol de las Pcdh alfa en señalización intracelular.

Tanto Ecad como Ncad pueden ser clivadas por el complejo gama-secretasa. Un primer clivaje del N-terminal es llevado a cabo por una metaloproteasa de matriz (ADAM10), liberando un fragmento extracelular soluble. A continuación, el C-terminal intracelular sufre un clivaje dependiente de presenilina (proteína que forma parte del complejo gama-secretasa). Se cree que este procesamiento modula las propiedades de adhesión de Ecad (Marambaud et al. 2002); mientras que en la Ncad, este fragmento citoplasmático soluble (el CTF2) afectaría la expresión génica al unir e inducir la degradación de la proteína que une CREB -CBP-, esencial para la transcripción mediada por el factor CREB (Marambaud et al. 2003; Junghans et al. 2005). La unión del CTF2 de Ncad con

CBP produce la relocalización de esta última proteína de núcleo hacia el citosol, promoviendo su ubiquitinización y consiguiente degradación por el proteasoma, disminuyendo los niveles de CBP (figura I6).

De manera interesante, la proteólisis de Ncad por ADAM10 es estimulada por la despolarización de la membrana así como por la activación directa de los receptores NMDA (Reiss et al. 2005). Tomando estos datos en conjunto, se puede pensar en un mecanismo que permita regular la expresión génica en neuronas frente a estímulos extracelulares.

Teniendo en cuenta las similitudes entre cadherinas clásicas y Pcdh en cluster, es probable que estas últimas intervengan en procesos similares a los descritos para Ecad y Ncad, cumpliendo funciones en señalización intracelular.

Dscam1: un ejemplo en *Drosophila* a tener en cuenta para estudiar las Pcdh

La familia de moléculas de adhesión del síndrome de Down de *Drosophila*, o Dscam1 por sus siglas en inglés, codifica para receptores de la superficie celular cada uno de los cuales posee una porción extracelular con 10 dominios tipo inmunoglobulina (Ig) y 6 repeticiones de fibronectina tipo III, un dominio transmembrana y una cola C-terminal. Splicing alternativo entre tres grandes bloques de exones alternativos que codifican para los Ig2, Ig3 e Ig7, permiten generar 19.008 variantes distintas de esta proteína (figura I7) (Schmucker 2007). También, existen dos variantes posibles de exón para el dominio transmembrana lo que eleva el número de variantes de Dscam1 a algo más de 38.000. Al igual que mencionamos que ocurre con las Pcdh en cluster, en *Drosophila*, distintas neuronas expresan diferentes isoformas de Dscam1 de manera estocástica (Neves et al. 2004). Por ende, la probabilidad de que dos células vecinas expresen el mismo set de isoformas de Dscam1 es muy baja.

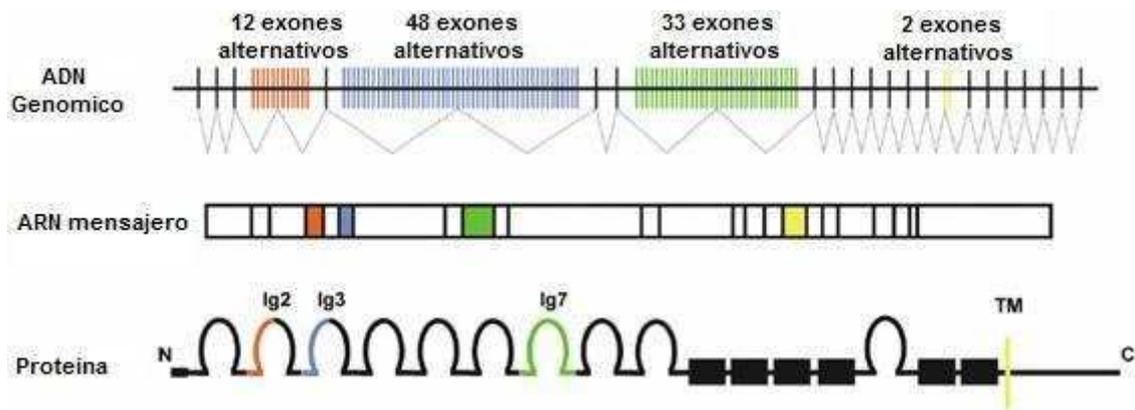


Figura I7. Esquema del gen de *Dscam1* de *Drosophila*. Adaptada de Wojtowicz et al. 2004. Se ve que la proteína *Dscam1* posee tanto regiones constantes como variables. Las regiones variables de Ig2, Ig3 e Ig7 son codificadas por exones alternativos (en rojo, azul y verde respectivamente). También existen exones alternativos para el dominio transmembrana. De las posibles combinaciones entre estos exones es que a partir de este gen pueden expresarse 38.016 isoformas para *Dscam1*.

Esta gran variabilidad es de suma importancia en un mecanismo que permite a las neuritas que se proyectan a partir de las neuronas de las moscas distinguirse entre sí (Chen et al. 2006; Hughes et al. 2007; Millard and Zipursky 2008). *Dscam1* media una reacción llamada “repulsión homofílica”: si las neuritas que entran en contacto expresan exactamente las mismas variantes de *Dscam1*, se desata un mecanismo de repulsión entre ambas proyecciones. El poder discriminar lo “propio” de lo “no-propio” es clave para establecer el patrón de los campos dendríticos de las neuronas (figura I8): permite la formación de campos dendríticos separados y bien definidos (fenómeno conocido como *tiling*) y, también, evita que dendritas hermanas (provenientes de una misma neurona) inerven el mismo sitio del SN en la mosca (Wang, Zugates et al. 2002; Zhan et al. 2004; Matthews et al. 2007; Soba et al. 2007).

En 2009, un grupo utilizó una estrategia de reemplazo genómico en el locus de *Dscam1* para eliminar exones variables y así limitar el número de potenciales isoformas que pueden generarse (Hattori et al. 2009). Obtuvieron animales que no expresaban ninguna isoforma (*null*), 12, 24, 576, 1.152, 4.752 o 14.256 isoformas. Excepto en los animales *null*, el auto-reconocimiento entre neuritas (y su consiguiente repulsión homofílica) no se vio afectado. Sin embargo, la distinción entre proyecciones propias y no propias no fue correcta si las moscas expresaban 1.152 isoformas de *Dscam1* o menos. Esto indicaría que son necesarias, como mínimo, miles de isoformas para permitir

discriminar dendritas provenientes de la misma célula o de células distintas y que la variabilidad de Dscam1 es central para su función.

Teniendo en cuenta las similitudes que existen entre Dscam1 y las Pcdh en cluster en cuanto a su variabilidad y su expresión en neuronas individuales, tomamos como referencia los numerosos estudios realizados sobre las proteínas de mosca para pensar posibles ensayos para el presente trabajo de tesis. En particular, buscamos adaptar el ensayo de adhesión con microesferas de Wojtowicz et al 2004 para trabajar con las Pcdh en cluster, tal y como se describirá más adelante.

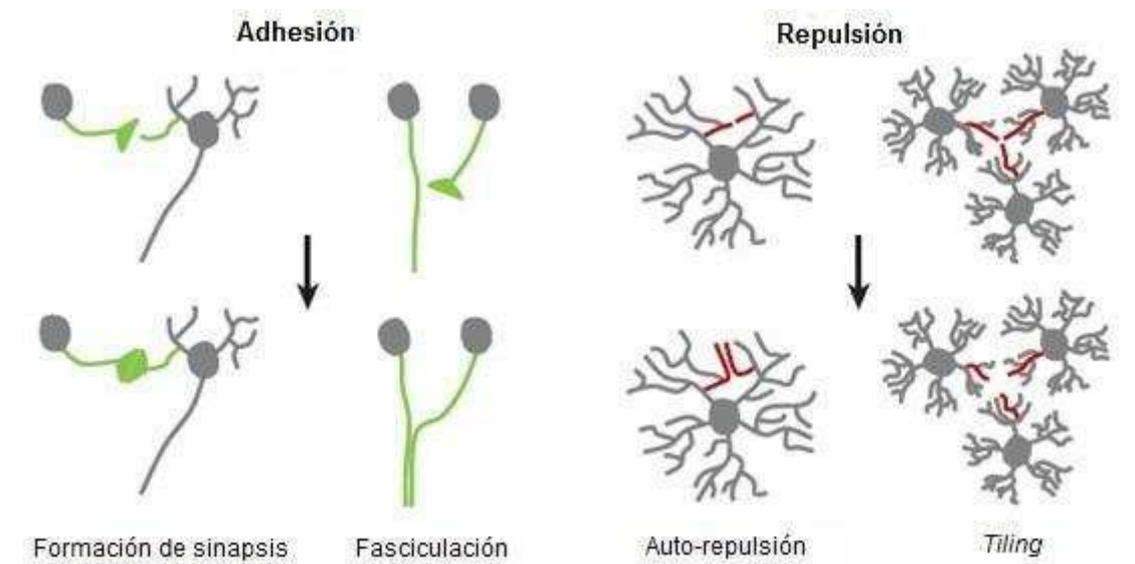


Figura I8. Resultado funcional de señalización dependiente de contacto. Adaptada de Hattori et al. 2008. El reconocimiento entre proteínas de adhesión en el SNC trae como consecuencia la formación de sinapsis y la fasciculación de las proyecciones neuronales. Lo que se descubrió en el caso de Dscam1 en *Drosophila* es que el reconocimiento homofílico desencadena la repulsión de las proyecciones. Esto produce, por un lado, que dendritas provenientes de una misma célula se auto-eviten y, por otro lado, contribuye al fenómeno de *tiling* en el que las células vecinas se ordenan de modo tal que no ocurra la superposición de sus campos dendríticos.

En resumen, por más que se tienen algunos indicios (en especial para las Pcdh gama) la función de las Pcdh en *cluster* es aún desconocida.

Como ya mencionamos, las Pcdh en *cluster* poseen los dominios EC típicos de las cadherinas involucradas en adhesión celular, incluyendo motivos de unión a Ca^{2+} , pero carecen de los dominios de unión a beta-cateninas para interacción con el citoesqueleto. Ensayos preliminares para testar la función sugieren un posible rol en adhesión celular. La transfección de líneas celulares con el ADNc de la Pcdh beta 12 demostró que esta interacción sería débil comparada con la de las cadherinas clásicas (Sago et al. 1995),

así como la transfección de ADNc de Pcdh gama A3 o c3 (Obata et al. 1995; Frank et al. 2005).

Nuestro objetivo en la presente tesis es establecer qué tipo de interacciones establecen entre células las Pcdh alfa y si estas interacciones desencadenan procesos de adhesión celular y/o de señalización intracelular. Teniendo en cuenta las diferencias observadas en los mecanismos regulatorios de la expresión de las protocadherinas de tipo c, nos interesa saber si estas cumplen funciones diferentes a los demás miembros de los *clusters*.

En el caso de hallar evidencias de un rol en adhesión, nos proponemos caracterizar los tipos de interacciones que se establecen en este proceso (dependencia de cationes divalentes, dominios y/o o motivos proteicos involucrados) y estudiar si se establece alguna clase de interacción entre el dominio citoplasmático de las Pcdh alfa y proteínas pertenecientes a la maquinaria de remodelación del citoesqueleto.

Por otro lado, analizaremos si las Pcdh alfa sufren un procesamiento proteolítico tal y como se describió para las Pcdh gama, y qué efectos tiene esto sobre la célula. Un posible rol en señalización intracelular se ve sustentado por el hecho que las Pcdh alfa fueron descubiertas al estudiar las proteínas a las cuales se une Fyn (una quinasa de tirosinas de la familia Src) que se expresa en sistema nervioso (Kohmura et al. 1998). Las Pcdh alfa poseen en su dominio citoplasmático un motivo PXXP, típico de unión a dominios SH3 que son característicos de las kinasas Src.

Además, se ha descrito que las Pcdh alfa y gama se unirían a las kinasas PYK2 y FAK, y la interacción con estas Pcdhs regularía negativamente la actividad de dichas quinasas. En el caso de PYK2, esta inhibición permitiría controlar su actividad proapoptótica en las neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso en pollos (Chen et al. 2009). Recientemente se ha observado que las Pcdh forman parte de complejos de señalización constituidos por múltiples isoformas de Pcdh, receptores con función de quinasa de tirosinas, fosfatasa y moléculas de adhesión (Han et al. 2010). Por último, se encontró que el receptor-quinasa de tirosinas Ret se une a las Pcdh en células de neuroblastoma diferenciadas y es necesaria para la estabilización y fosforilación de estas proteínas (Schalm et al. 2010).

En resumen, a través de esta tesis nos proponemos contribuir a aumentar, en lo posible, el conocimiento actual sobre las Pcdh alfa e intentaremos profundizar sobre qué función cumplen en la célula.

Hipótesis de trabajo

Hipótesis central:

Las Pcdh en cluster alfa tipo c se comportan de manera diferente que los demás miembros de su mismo cluster.

Las Pcdh en cluster proveen el potencial de expresar una enorme variedad de glicoproteínas de superficie en neuronas. Esta variabilidad se ha mantenido desde la aparición de las Pcdh en cluster en los vertebrados: el número de clusters y el número de exones variables por cluster difiere de especie a especie, pero en todas las especies estudiadas, desde los peces hasta los mamíferos, se encuentra un altísimo número de exones variables. Curiosamente, los estudios de expresión de Pcdh en cluster a nivel de células aisladas muestran que éstas se expresan de a una o dos isoformas por célula y la elección de las variantes a expresar es estocástica (Kaneko et al. 2006). Tomando en cuenta todas estas evidencias, se puede especular que las Pcdh constituirían algún tipo de marcador de superficie involucrado en la identidad neuronal. Dada la baja probabilidad de que neuronas vecinas expresen una misma combinación de Pcdh, la expresión de una determinada Pcdh -o combinación de Pcdh- en su membrana le permitiría a cada neurona discriminar entre procesos pertenecientes a la misma célula y aquellos provenientes de otras distintas. Este reconocimiento podría tener consecuencias a nivel de “establecimiento” o “rechazo” en la formación de contactos neuronales, lo que resultaría particularmente importante durante estadios embrionarios o de inmadurez del SNC, en los cuales se establecen numerosos contactos nuevos que no siempre permanecerán en el individuo adulto.

Como se explicó en la introducción, análisis filogenéticos indican que las distintas isoformas codificadas por cada cluster de Pcdh son altamente homólogas. Sin embargo, como explicamos en la introducción, los exones de tipo c de los clusters alfa (c1 y c2) y gama (c3, c4 y c5) constituyen una rama separada de los demás exones en cuanto a su secuencia codificante: son evolutivamente divergentes respecto de los demás miembros de su mismo cluster pero son muy similares entre sí (Wu and Maniatis 1999; Wu and Maniatis 2000; Wu et al. 2001; Zou et al. 2007). En el caso del exón c2 del cluster alfa, se sabe que su expresión está sujeta a una regulación diferencial. La expresión de los demás exones variables depende de la activación del promotor que precede a cada uno

por su interacción con un elemento *enhancer* que se encuentra en la región intergénica entre los cluster alfa y beta. El promotor de c2 carece de una secuencia conservada (*CSE, conserved sequence element*) que es necesaria para la regulación por este enhancer (Wu et al. 2001; Tasic et al. 2002; Ribich et al. 2006). Además, los exones de tipo c presentan un patrón de expresión temporal distinto a los demás, aumentando su expresión postnatal, mientras que la expresión de las demás isoformas disminuye (Takei et al. 2001). Es posible entonces que las isoformas de tipo c cumplan algún rol distinto. Hasta el momento se desconoce la función de las Pcdh en cluster, pero se presume que podrían participar en adhesión celular y/o señalización intracelular.

Para comenzar a responder estas hipótesis, nuestro objetivo fue establecer si las Pcdh alfa entablan interacciones homo o heterofílicas. De producirse, investigamos qué condiciones afectan el establecimiento de dichas interacciones y si las mismas promueven o no la adhesión celular. Teniendo en cuenta las diferencias observadas en los mecanismos regulatorios para la expresión de las protocadherinas de tipo c, nos interesa saber si estas cumplen funciones diferentes a los demás miembros de los clusters en este aspecto.

Por otro lado, analizamos si las Pcdh alfa sufren un procesamiento proteolítico tal y como se describió para las Pcdh gama (Haas et al. 2005). Usualmente, el procesamiento controlado de proteínas de membrana es un mecanismo que permite regular su función. En el caso de cadherinas clásicas (E-cadherina y N-cadherina), su clivaje en la membrana permite desorganizar focos de adhesión entre células cuando esto sea necesario y, además, el fragmento liberado en el citosol puede translocar al núcleo y activar la transcripción de ciertos genes, o interactuar con otras proteínas provocando su relocalización (Marambaud et al. 2002; Maretzky et al. 2005; Uemura et al. 2006).

Las hipótesis presentadas pretenden cubrir diversos aspectos aún desconocidos de la función de las Pcdh en cluster.

Objetivo general

Caracterizar, al menos en parte, la función de las protocadherinas en cluster alfa.

Objetivos particulares:

- Entender qué tipo de interacciones establecen las protocadherinas alfa entre células vecinas (interacciones en *trans*) y qué factores las afectan
- Estudiar si las Pcdh alfa pueden promover la adhesión celular
- Analizar si las Pcdh alfa sufren algún tipo de procesamiento proteolítico (como se ha observado para las gama)
- Y, en todas las instancias anteriores, estudiar qué diferencias presentan el subtipo c de Pcdh alfa, respecto de los demás miembros del cluster

Resultados

Presentación del sistema para el estudio de las Pcdh en cluster

Para estudiar si las Pcdh en cluster entablan interacciones entre sí, y si éstas son de naturaleza homo o heterofílica, necesitamos un ensayo que evidencie tales interacciones. Los antecedentes indican que las Pcdh en cluster beta y gama no establecerían contactos de adhesión fuertes (Sago et al. 1995-beta 12-; Frank et al. 2005-gama a3 y gama c3-), por lo cual medir adhesión de estas proteínas en su forma *wild type* (WT) no sería viable para evaluar este objetivo. Como se mencionó en la introducción, sólo sabemos que el dominio citosólico de las Pcdh alfa interactuaría con la kinasa Fyn (Kohmura et al. 1998). Por ello, construimos proteínas con la región variable de una determinada isoforma de Pcdh, pero reemplazamos sus dominios citoplasmáticos por aquellos de la cadherina clásica Ecad, siguiendo una estrategia de Obata et al. 1995. El dominio citoplasmático de las cadherinas clásicas juega un rol importante en su función porque es mediante el mismo que estas proteínas pueden interactuar con el citoesqueleto, lo que es necesario para su fuerte actividad en adhesión celular. Si el dominio extracelular de las Pcdh tiene la capacidad de establecer interacciones entre moléculas presentes en células vecinas (porque posee características similares a los de las cadherinas clásicas: dominios tipo cadherina, motivos de unión a Ca^{2+} , etc), el reemplazo de su dominio citoplasmático propio por el de una cadherina clásica podría fortalecer dichas interacciones entre Pcdh. Esperamos que estas herramientas den, en nuestros ensayos, un resultado o *output* claro, el cual nos permita responder si las Pcdh son capaces de establecer interacciones homo o heterofílicas, por más que las interacciones entre estas proteínas normalmente sean débiles o efímeras.

Dado que entre nuestros objetivos figura investigar si las Pcdh alfa pueden incrementar la adhesión celular y establecer interacciones en trans, decidimos usar una cadherina clásica como control positivo. Elegimos la cadherina epitelial o E-cadherina (Ecad) de ratón pues la misma está muy bien caracterizada. También servirá como control de expresión de las proteínas en la membrana plasmática.

Chequeo de la expresión de distintas construcciones en una línea celular neuronal

+ Las distintas variantes de Pcdh alfa tendrían un diferente nivel de acumulación en la membrana plasmática

Para comenzar a evaluar la expresión de las Pcdh alfa seleccionadas, transfectamos en forma transitoria células de ratón de linaje neuronal (Neuro-2a, N2a) con plásmidos que permiten la expresión de una sola isoforma por vez y que presentan una fusión a EGFP en su extremo C-terminal. Esto permite visualizarlas mediante microscopía confocal.

Tal como se observa en la figura R1a, todas las proteínas se expresan en el sistema elegido y llegan a la membrana plasmática, aunque el nivel de acumulación en membrana para cada una es distinto.

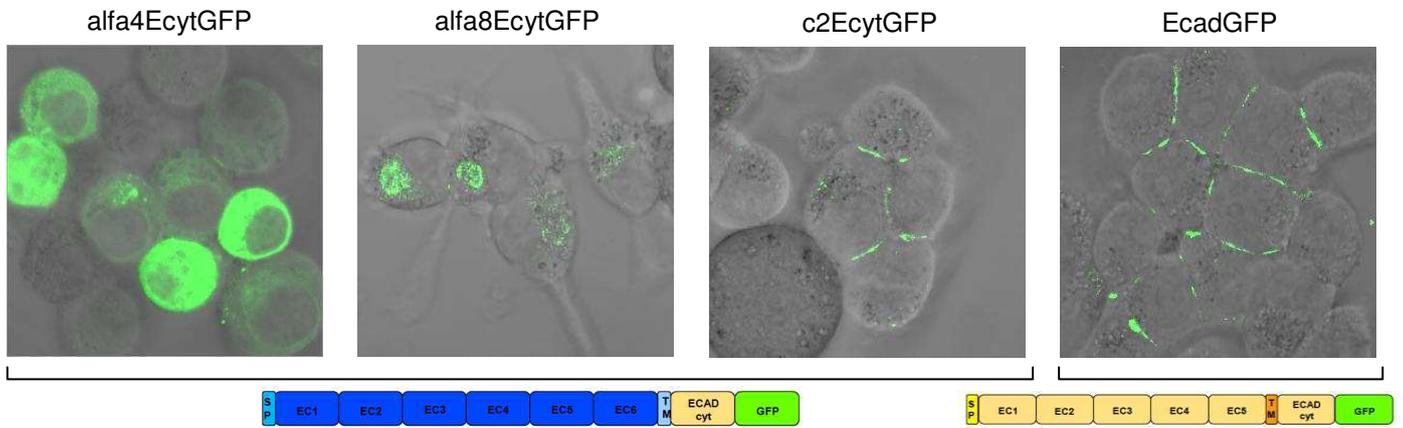
Para que esta comparación resulte más evidente, decidimos cuantificar el nivel de acumulación en membrana (como describimos en “Materiales y Métodos”), siguiendo un método utilizado con fines similares por otros autores (Fernández-Monreal et al. 2009). En forma breve, contamos todos los contactos establecidos entre células GFP positivas (GFP+) y calculamos qué proporción de estos muestran señal de GFP acumulada sobre el contacto (ya sea todo a lo largo del contacto o en un punto del mismo). Realizamos este cálculo en 4-5 campos distintos y, después, promediamos las proporciones obtenidas.

Como mencionamos más arriba, las proteínas llegan a membrana en la línea celular elegida. Utilizamos siempre como referencia el comportamiento de una cadherina clásica, la E-cadherina (Ecad), en nuestro modelo de estudio. Vemos como Ecad se acumula en los contactos entre células en forma evidente (figura R1a, panel de la derecha), según lo esperado para una cadherina clásica y que se asemeja a lo obtenido por otros autores (Hirano et al. 1987; Le et al. 1999; Steinhusen et al. 2001; Lorch et al. 2004; Maretzky et al. 2005). Para alfa 4 y alfa 8 esta acumulación es más sutil (flechas), mientras que para c2 es fácil reconocer los contactos donde se acumuló proteína.

Resulta claro que, de las isoformas ensayadas, c2 es la que presenta un patrón de acumulación en membrana más claro y muy similar al de Ecad, distribuyéndose todo a lo largo del contacto, mientras que alfa 4 y alfa 8 tienen una distribución más puntual (flechas). No tenemos en claro si esta diferencia en el patrón de acumulación es

consecuencia de las condiciones experimentales (si se debe a un problema técnico) o si se trata de una diferencia real en cuanto a la acumulación en membrana entre variantes de Pcdh alfa.

a)



b)

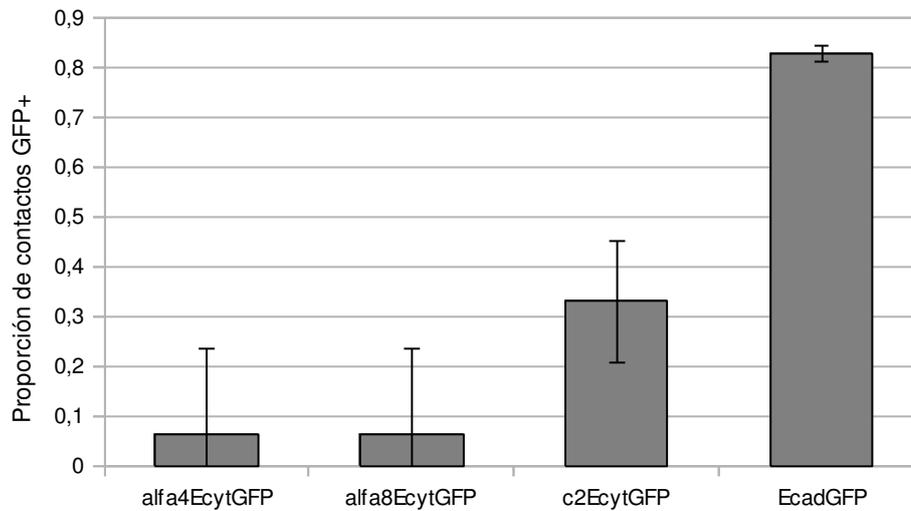
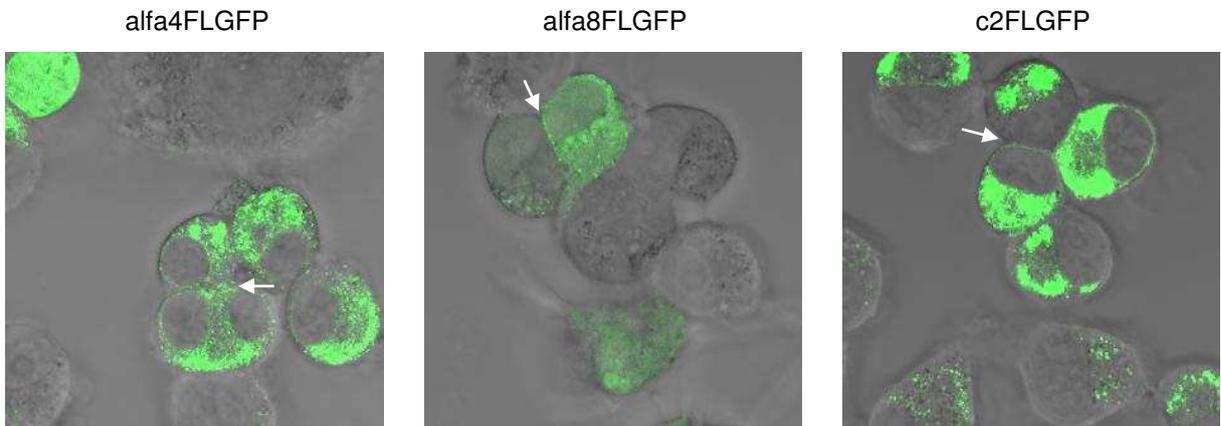


Figura R1: a) Imágenes de microscopio confocal de células N2a transfectadas en forma transitoria con las construcciones señaladas, debajo de las imágenes incluimos el esquema de las construcciones. Las flechas indican contactos entre células donde vemos acumulación de proteína. b) Cuantificación de las imágenes de a), las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%.

Como mencionamos antes, nuestra intención al clonar las Pcdh con el dominio citoplasmático de Ecad era generar una herramienta que nos permitiera observar de manera certera si las Pcdh alfa tienen la capacidad de establecer interacciones en trans a través de su porción extracelular. Sin embargo, sabemos que esto constituye una limitación pues las interacciones que establezcan a través del dominio citoplasmático de Ecad no son biológicamente relevantes para las Pcdh. Dadas las diferencias que observamos en la acumulación en membrana de las distintas isoformas, nos preguntamos si esto en realidad no podría ser un artificio de dichas construcciones quiméricas.

Para evaluar esto, clonamos las Pcdh alfa mencionadas con su dominio citoplasmático propio (Pcdh FL) y con EGFP en su extremo C-terminal. Transfectamos células N2a en forma transitoria con los plásmidos correspondientes para chequear la expresión en membrana de estas proteínas y, nuevamente, las analizamos mediante microscopía confocal. En este caso, la acumulación en membrana fue muy baja para todas las isoformas (figura R2). La gran proporción de señal de fluorescencia intracelular nos hace sospechar problemas en el transporte de las Pcdh hacia la membrana, quizás por sobreexpresión de las mismas (recordemos que fueron clonadas bajo el promotor de CMV, un promotor “fuerte”, por lo que tendrán un alto nivel de transcripción). Esto no nos permite descartar que las diferencias que observamos en la figura R1 sean inherentes a las Pcdh y no un efecto del reemplazo de su dominio citoplasmático por el de Ecad.

a)



b)

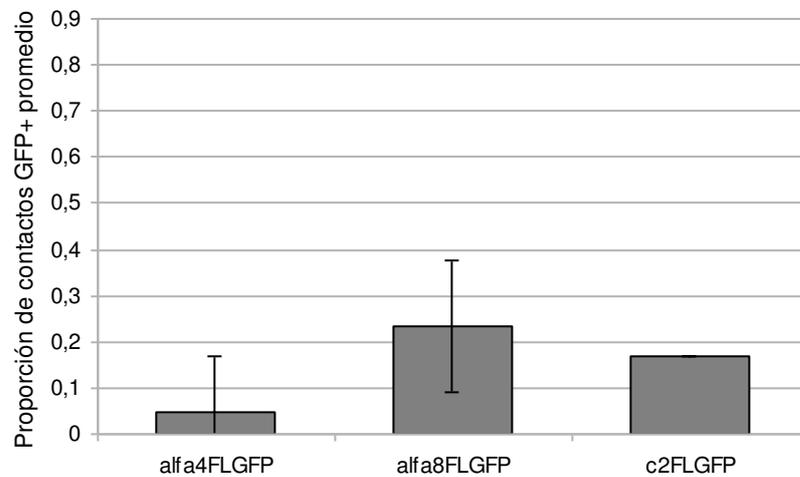


Figura R2: a) Imágenes de microscopio confocal de células N2a transfectadas en forma transitoria con las construcciones señaladas, debajo de las imágenes incluimos el esquema de las construcciones. Las flechas indican contactos entre células donde se acumuló proteína. b) Cuantificación de las imágenes de a), las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%.

Decidimos generar líneas celulares de N2a que expresen en forma estable las distintas construcciones para PcdhEcytGFP y para PcdhFLGFP, de modo que los niveles de expresión de cada una sean algo más bajos y ver si esto soluciona los inconvenientes observados con las transfecciones transitorias de las PcdhFLGFP. Hay que aclarar que las líneas estables son *pooles* de clones pues no nos fue posible diluir a punto final las células N2a para obtener clones aislados: estas células comienzan a diferenciarse cuando su densidad en cultivo es muy baja y ya no se dividen.

Los resultados obtenidos en este caso están ilustrados en la figura R3.

En las líneas de expresión estable, encontramos que mejoran especialmente los niveles de acumulación en membrana de alfa4EcytGFP y c2EcytGFP (comparar figuras R1b y R3b), y de c2FLGFP (figuras R2b y R3b). Para alfa4FLGFP, al haber una menor intensidad de señal de GFP en citoplasma, es posible distinguir algunos contactos que muestran acumulación de proteína aunque la señal es más tenue que en los casos recién enumerados. Para alfa 8, no se detecta una mejora significativa en ningún caso: siempre presenta un nivel bajo de acumulación en membrana. Por más que en la transfección transitoria con alfa8FLGFP detectamos una mayor proporción de contactos con proteína acumulada que para c2 (si comparamos con las versiones Ecyt de ambas Pcdh alfa), esto no mejora al generar la línea estable correspondiente como sí vemos que ocurre para alfa 4 y c2.

Algo que podemos asegurar en este punto, ya sea considerando las construcciones quiméricas (transfecciones transitorias o estables) o las FL (líneas de expresión estable), es que c2 parece acumularse efectivamente en una proporción mayor de contactos entre células que alfa 4 en nuestro modelo de trabajo.

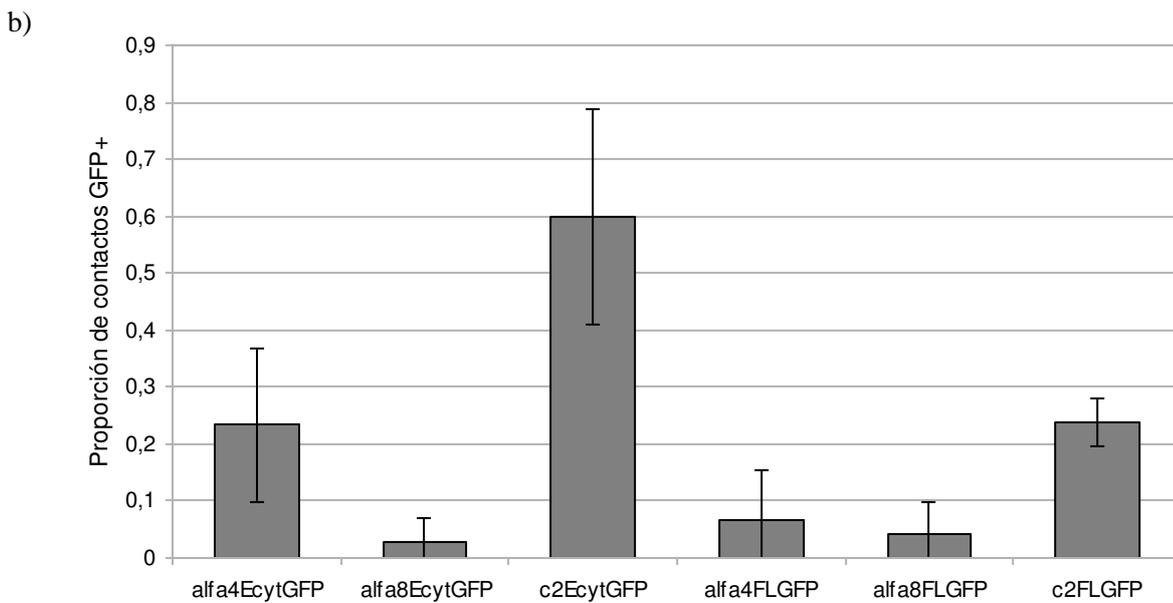
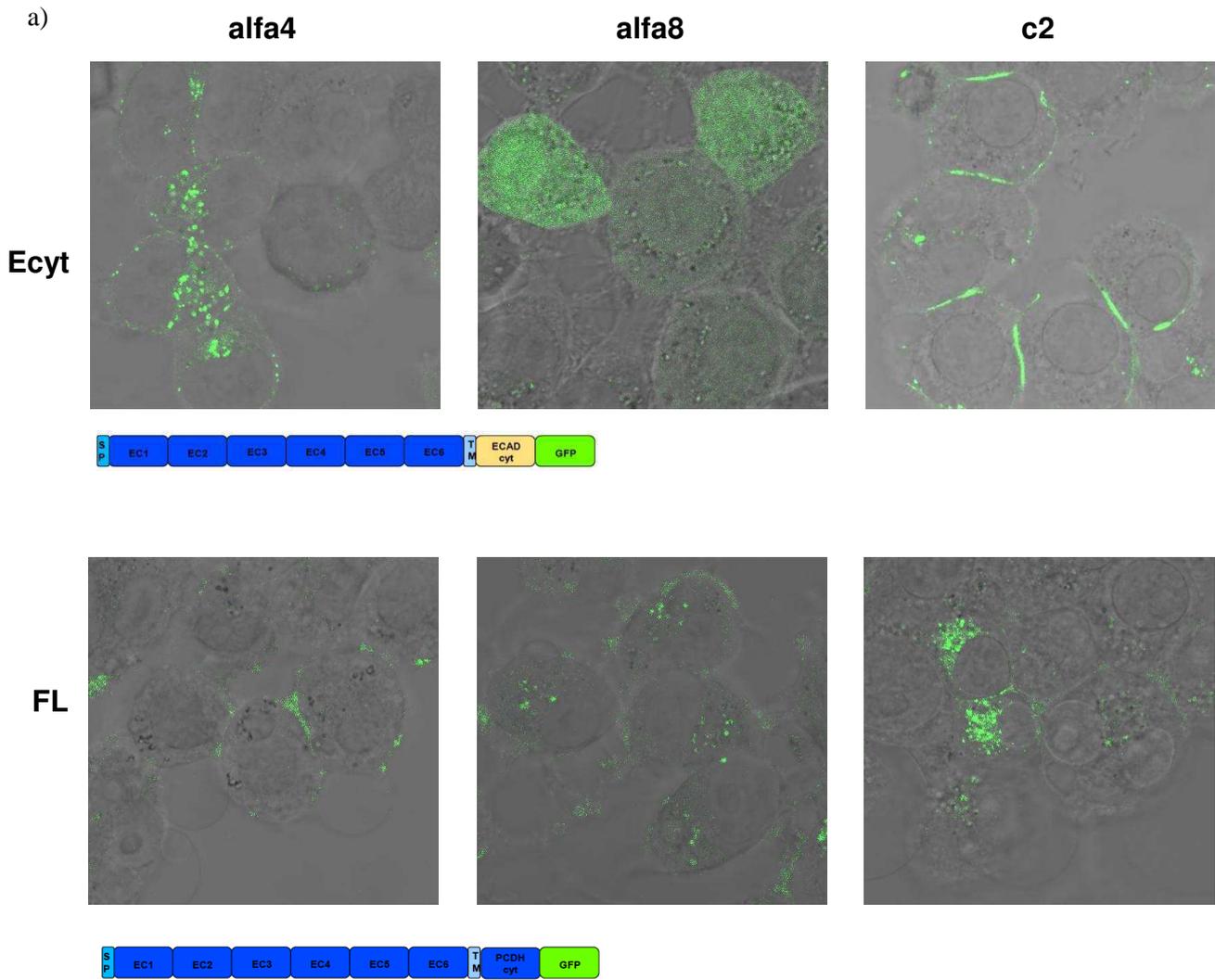


Figura R3: a) Imágenes de microscopio confocal de células N2a transfectadas en forma estable con las construcciones señaladas, comparando quimeras (con el dominio citoplasmático de Ecad) y versiones FL (con el dominio citoplasmático propio de las Pcdh alfa), debajo de las imágenes incluimos el esquema de las construcciones. b) Cuantificación de las imágenes de a). Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%.

En la bibliografía encontramos que las Pcdh a las cuales se les elimina su dominio citoplasmático se acumulan en membrana aún mejor que las versiones FL (Fernández-Monreal et al. 2009; Schreiner and Weiner 2010). Para terminar de despejar nuestras dudas respecto de las diferencias que observamos para alfa 4 y c2, generamos estas construcciones truncadas (figura R4) y transfectamos en forma transitoria células N2a con las mismas. Observamos que, nuevamente, c2 se acumula mejor en los contactos entre células transfectadas que alfa 4. Esto nos permitió descartar que las diferencias que observamos fueran debidas a los distintos dominios citoplasmáticos (no usamos alfa 8 porque ya mostraba niveles en membrana muy bajos).

Sin embargo, no consideramos que las versiones truncadas muestren un nivel de acumulación en membrana mucho mejor que las versiones Ecyt, por lo que decidimos continuar con estas últimas y las FL en los experimentos que siguen.

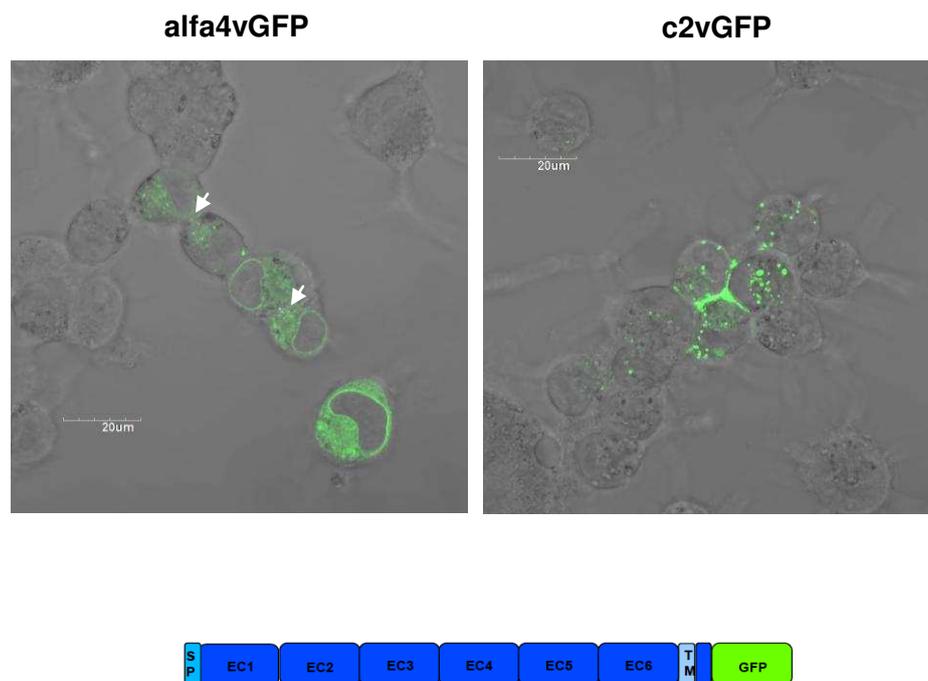


Figura R4: imágenes de microscopio confocal de células N2a transfectadas en forma transitoria con las construcciones señaladas, debajo de las imágenes incluimos el esquema de las mismas.

Al observar siempre la misma tendencia en la acumulación de proteína en la membrana celular, en los contactos entre células vecinas, podemos afirmar con cierta confianza que las diferencias observadas son debidas a la variante de Pcdh analizada y no a las modificaciones introducidas en su dominio citoplasmático.

Hasta el momento, observamos que la isoforma c2 presenta diferencias en su nivel de acumulación en los contactos entre células respecto de las variantes alfa 4 y alfa 8.

Sabemos que las limitaciones en la resolución de la microscopia confocal no permiten asegurar por completo que la señal de GFP que vemos depositada en el contacto entre dos células vecinas, efectivamente represente proteína que se encuentra en membranas opuestas y que establece interacciones entre sí. El máximo de resolución de la microscopía confocal (es decir, la distancia mínima en la cual es posible distinguir dos puntos como entidades separadas) ronda los 200 nm, mientras que el ancho de una membrana es del orden de 10 nm. Sin embargo, está comúnmente aceptado en el estudio de este tipo de interacciones que una imagen como las que obtuvimos, sugiere un contacto en trans entre proteínas que están expuestas en la membrana plasmática (para cadherinas clásicas ver: Hirano et al. 1987; Le et al. 1999; Niessen & Gumbiner 2002; Marambaud et al. 2002; Lorch et al. 2004; Balzac et al. 2005; Benjamin et al. 2010; para Pcdh beta: Sago et al. 1995; para Pcdh gama: Obata et al. 1995; Haas et al. 2005; Frank et al. 2005; Fernández-Monreal et al. 2009; Schreiner & Weiner 2010; para Pcdh de pez cebra: Biswas et al. 2010)

Basándonos en esto y en la comparación con las imágenes obtenidas por nosotros para Ecad, es que extraemos nuestras conclusiones.

+ Las Pcdh testadas establecen interacciones exclusivamente homofílicas

Hasta el momento, sabemos que las Pcdh alfa tienen la capacidad de establecer interacciones homofílicas en trans, evidenciadas por la acumulación de proteína fusionada a GFP en los contactos entre células vecinas (que ya mostramos en secciones anteriores).

Sin embargo, esto no prueba que no tengan la capacidad de establecer interacciones *heterofílicas* en trans.

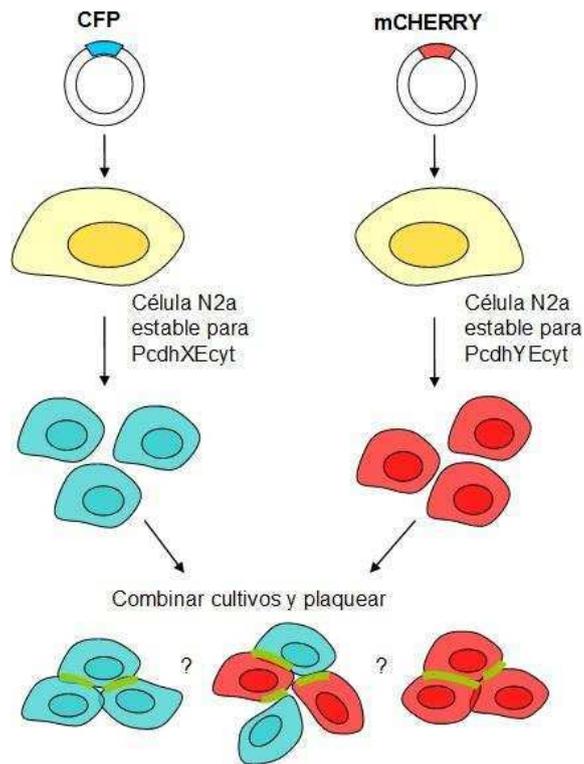
Basándonos en la bibliografía (Fernández-Monreal et al. 2009), diseñamos un ensayo que nos permitiera identificar qué tipo de interacciones establecen las Pcdh alfa, y lo denominamos “ensayo de co-cultivos”.

En este ensayo usamos células N2a que expresan en forma estable variantes de las Pcdh alfa 4 o c2 cuyo dominio citoplasmático fue reemplazado por el de la Ecad y fusionado a GFP (en todos los ensayos que siguen en esta tesis utilizamos líneas de expresión estable para las Pcdh, a menos que indiquemos lo contrario). Además las transfectamos con un plásmido que codifica para una proteína fluorescente de distinto color (CFP o mCherry). Luego, combinamos células que expresen uno u otro color en igual proporción y las incubamos por 48hs en estufa con CO₂. Transcurrido ese tiempo, las fijamos y observamos con microscopio de fluorescencia. El esquema del ensayo se muestra en la figura R5a. Claramente, en el caso del cultivo combinado (figura R5b, paneles de la derecha, y R5c), solamente detectamos acumulación de señal de GFP en los contactos entre células vecinas cuando éstas tienen el mismo color, es decir, sobreexpresan la misma Pcdh. Cuando las células sobreexpresan la misma isoforma, vemos acumulación de señal de GFP entre células del mismo o distinto color (figura R5b, paneles de la izquierda, y R5c), lo que refuerza la noción de que las interacciones que establecen estas Pcdh alfa son homofílicas.

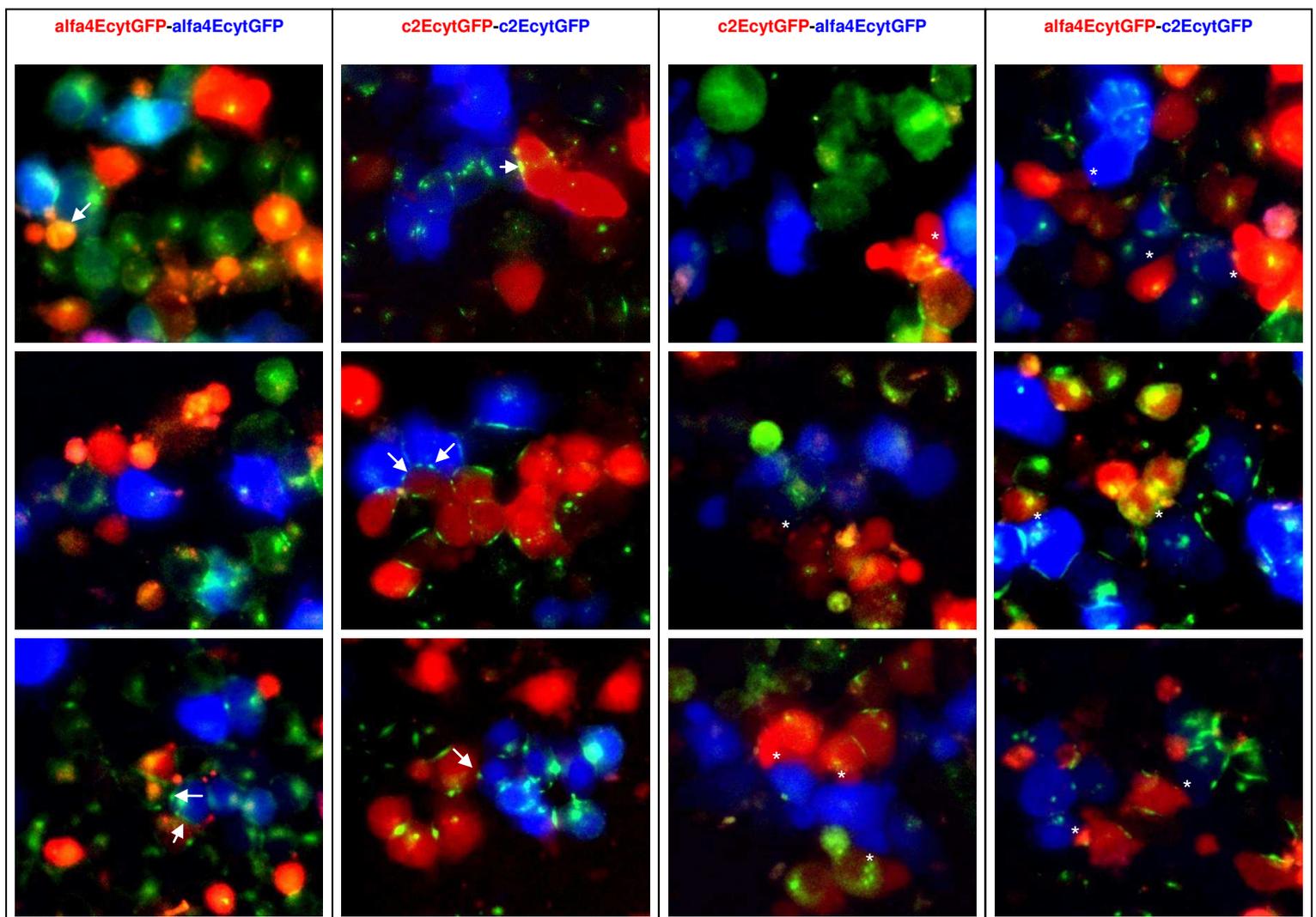
No utilizamos células que expresaran alfa 8 en este ensayo pues su expresión en la membrana celular y acumulación en los contactos entre células fue siempre muy bajo, tal como mencionamos en la sección anterior.

Entonces podemos afirmar que, en estas condiciones, tanto Pcdh alfa4 como c2 sólo establecen interacciones homofílicas.

a)



b)



c)

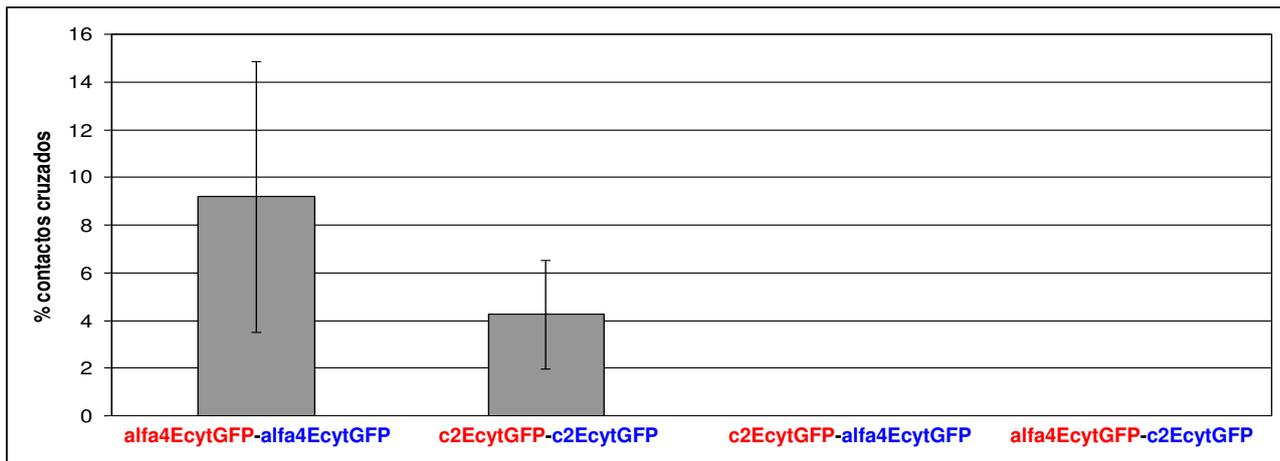


Figura R5: a) esquema del ensayo de co-cultivos; b) imágenes obtenidas con microscopio de fluorescencia de células N2a que expresan en forma estable la PcdhEcytGFP indicada y, en forma transitoria, una proteína fluorescente de distinto color. Las flechas indican acumulación de proteína marcada con GFP. Los asteriscos marcan contactos entre células que sobreexpresan distintas Pcdh. c) cuantificación de las imágenes de b). Las barras indican el intervalo de confianza del 95%.

Factores que influyen la acumulación de las Pcdh en la membrana celular

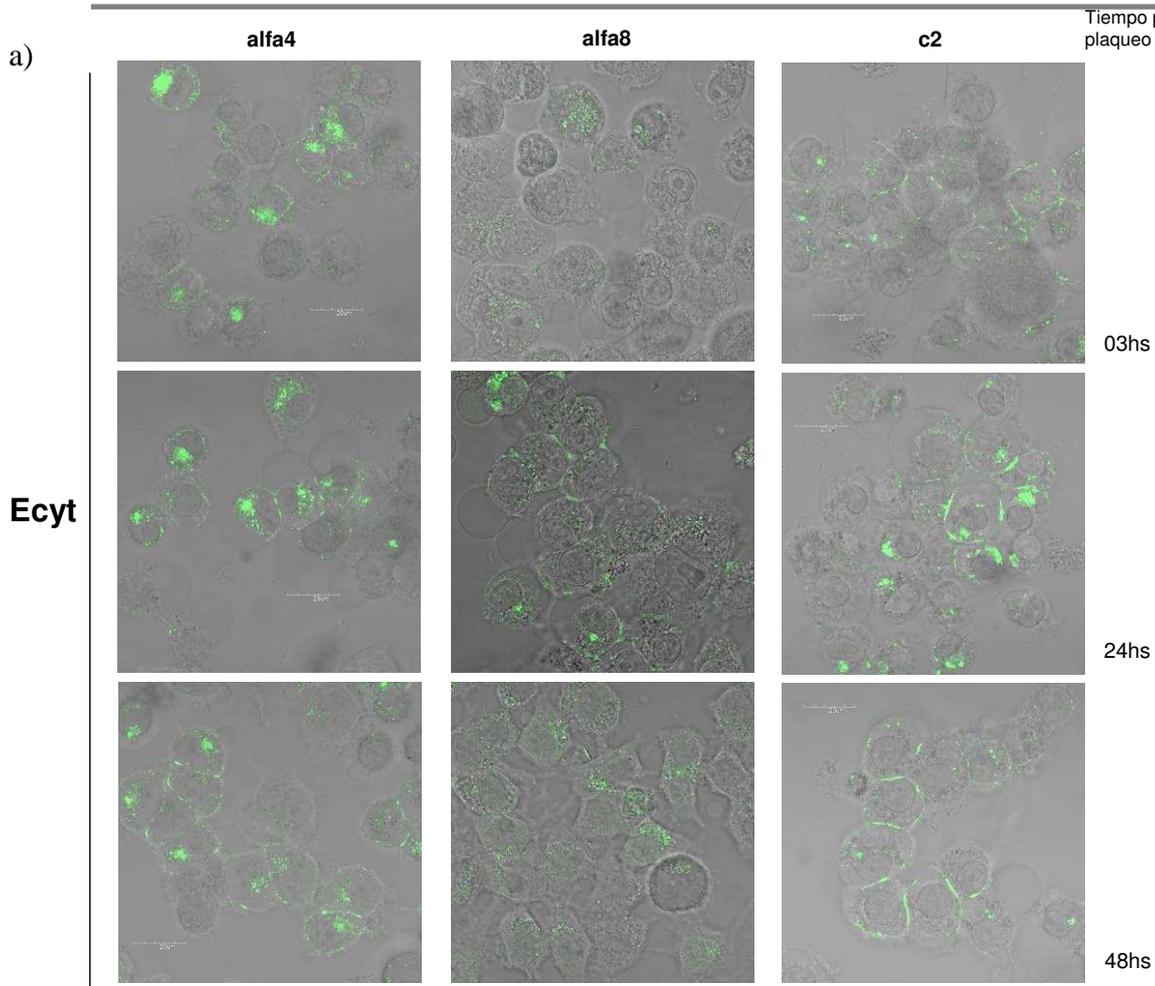
+ Las isoformas analizadas presentan diferencias en el patrón temporal con que se acumulan en los contactos entre células

Como mencionamos en una sección previa, los cambios de dominio citoplasmático no modificaron las diferencias que observamos entre isoformas en la acumulación en membrana. A continuación nos preguntamos si esta diferencia se mantiene en el tiempo, es decir, si es siempre c2 la isoforma con mayores niveles de acumulación, o si existe algún momento en el cual dicha relación entre los niveles de acumulación varíe.

Para ello, realizamos un ensayo de “tiempos de plaqueo”, tal y como lo detallamos en la sección “Materiales y Métodos” de la presente tesis. Usamos células N2a que expresan en forma estable las construcciones que detallamos en la figura R6.

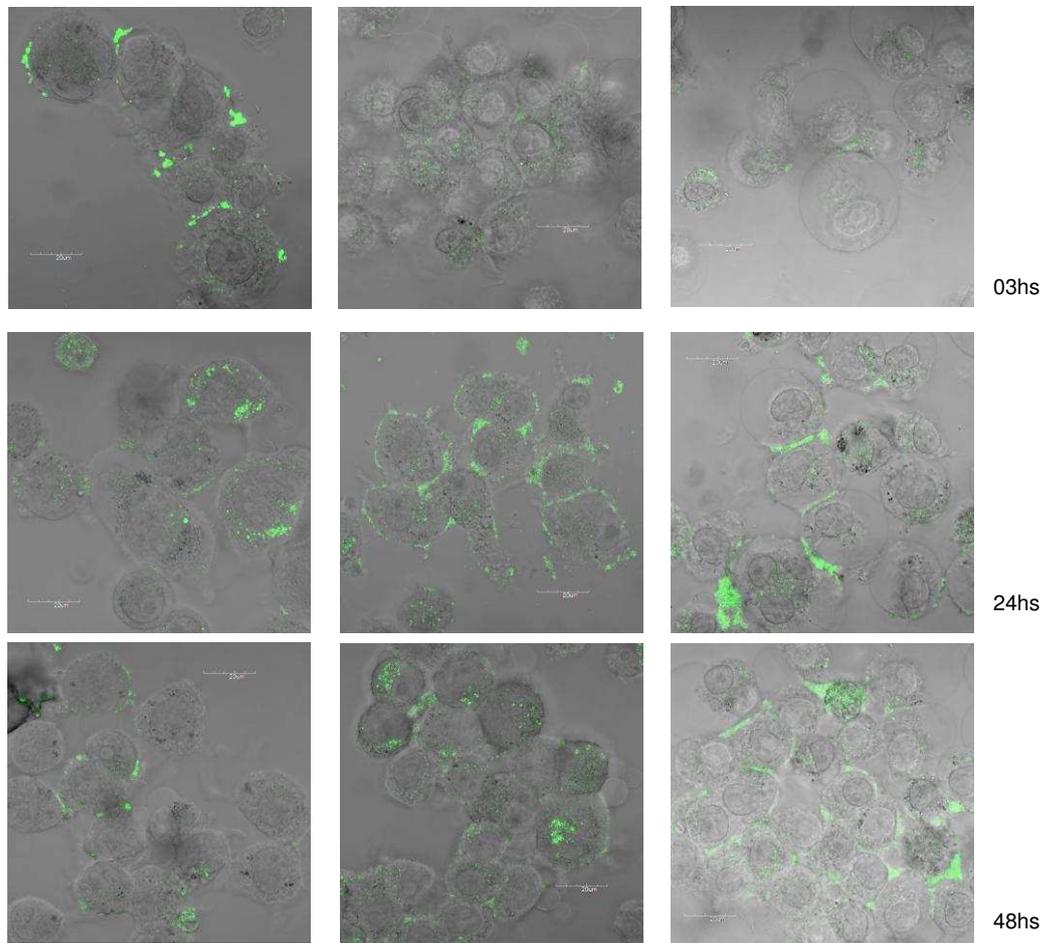
En este ensayo plaqueamos las células en una concentración tal que se encuentren aproximadamente en la misma densidad en todos los tiempos que observamos. Con esto buscamos que las posibilidades de establecer contactos entre células -donde pueda ocurrir la acumulación de Pcdhs- sean las mismas en cada caso.

a)



EC1 EC2 EC3 EC4 EC5 EC6 ECAD GFP

FL



EC1 EC2 EC3 EC4 EC5 EC6 ECAD GFP

b)

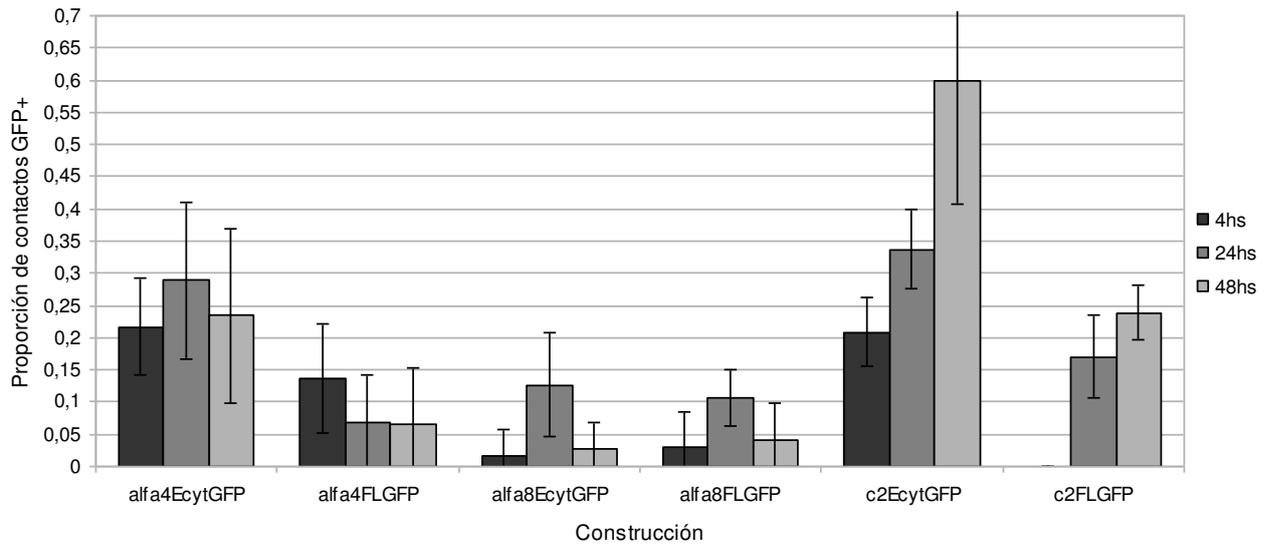


Figura R6: a) Imágenes de microscopio confocal de células N2a transfectadas en forma estable con las construcciones señaladas, comparamos construcciones quiméricas y FL, analizamos las mismas a distintos tiempos luego de plaquearlas. Debajo de las imágenes incluimos el esquema de las construcciones correspondientes. b) Cuantificación de las imágenes de a), las barras indican los intervalos de confianza del 95%.

Como se ve en la figura R6, excepto para alfa 8, en todos los tiempos que analizamos la acumulación en membrana (evidenciada por un contacto entre células con señal de GFP) fue mayor para las versiones con Ecyt que para las FL.

Para aquellas líneas estables para c2, ya sea la versión con Ecyt o FL, aumenta la cantidad de proteína acumulada en contactos entre células a medida que pasa el tiempo. A las 48hs post-plaqueo, c2 siempre tiene mayores niveles de acumulación que la construcción correspondiente para las otras isoformas.

Mientras que para alfa 4, el número de contactos en los que vemos acumulación de GFP no parece modificarse mucho a medida que pasa el tiempo, pero este nivel de acumulación a las 24hs post-plaqueo para la versión quimera es comparable al de c2EcytGFP a ese mismo tiempo.

Esto nos sugiere, por un lado, que para que tenga lugar la acumulación de Pcdhs en los contactos entre células, sería necesario que transcurra un cierto tiempo desde que dos células entran en contacto.

Por otro lado, c2 muestra mayores niveles de acumulación en membrana a mayores tiempos luego que comienzan a formarse los contactos entre células, mientras que para alfa 4 y alfa 8 esto no ocurriría así. La isoforma c2 claramente se comporta en forma diferente frente a los otros miembros del cluster alfa que analizamos de esta manera y su patrón de acumulación es el que más se asemeja al de Ecad.

+ No existiría un reciclado de Pcdhs una vez que estas están involucradas en una interacción en trans entre células

Hasta ahora sabemos que las Pcdh alfa que analizamos presentan diferencias al acumularse en los contactos entre células. De ellas, sólo c2 presenta un patrón similar al de Ecad .

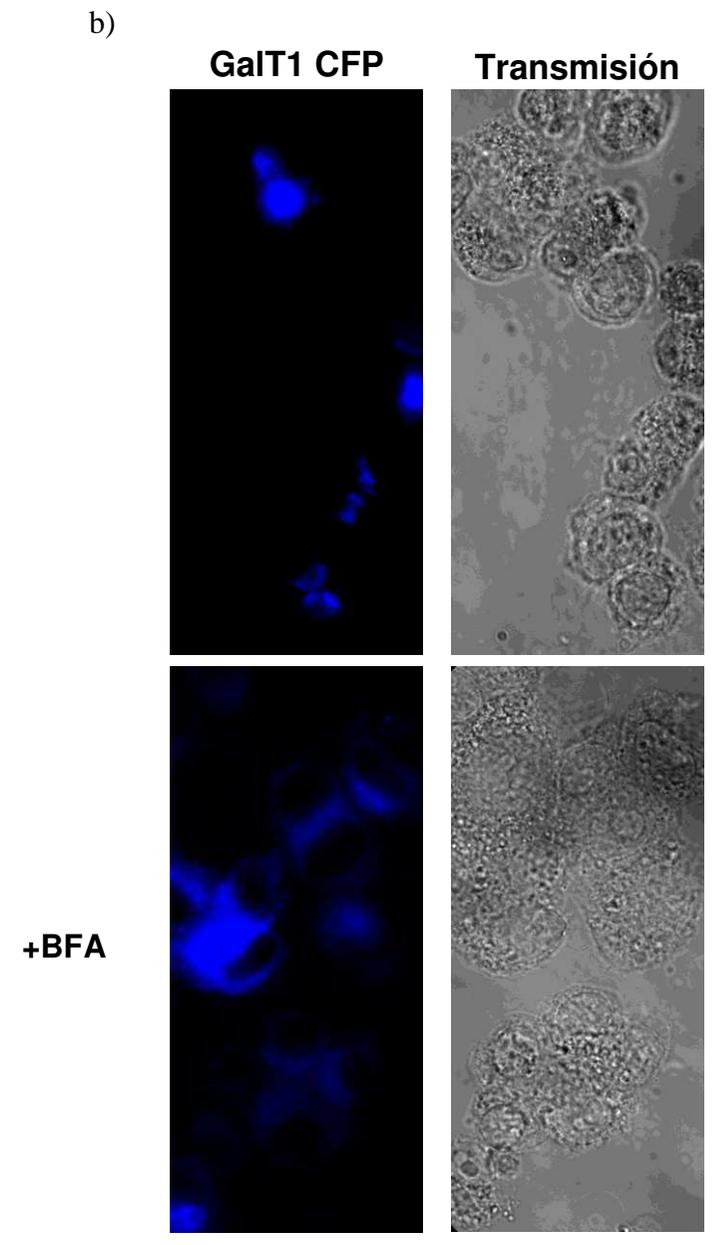
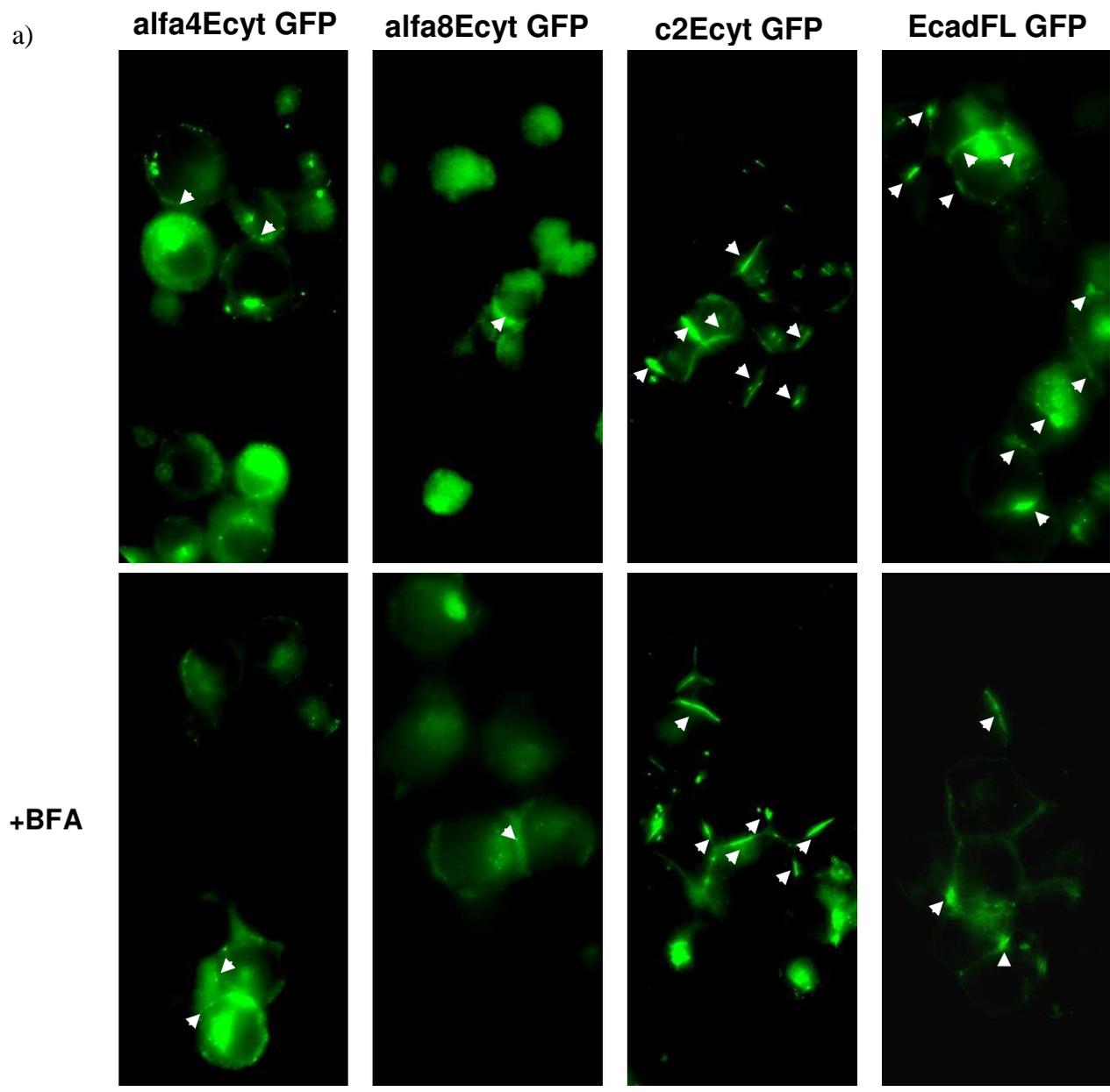
Ecad tiene roles críticos en procesos de adhesión celular, desarrollo de epitelios y mantenimiento de la polaridad epitelial. La literatura señala que el reciclado de Ecad, mediante endocitosis, puede ser un mecanismo que permita regular la disponibilidad de esta proteína en forma rápida y dinámica para la formación de uniones estrechas durante el desarrollo, el remodelado de tejidos e, incluso, la tumorigénesis (Le et al. 1999; Paterson et al. 2003). Le *et al* muestran que existiría un *pool* de Ecad en la membrana

plasmática que es internalizado en forma constante y reciclado hacia la superficie celular, aún en monocapas confluentes donde las células hayan establecido uniones estrechas entre sí. Si se altera de alguna manera este equilibrio dinámico en el reciclado hacia la membrana, aumenta la proporción de Ecad perteneciente a la población que fue internalizada.

En base a lo mencionado, nos preguntamos si existiría un proceso similar para las Pcdh alfa, ya que esto nos proveería de cierta evidencia sobre su función y si ésta es similar en algún aspecto a la de las cadherinas clásicas.

Para analizar esto decidimos afectar el transporte de proteínas hacia la membrana. Utilizamos Brefeldin A (BFA), un compuesto que inhibe el transporte anterógrado de membrana desde el retículo endoplasmático (RE) hacia el aparato de Golgi y, al mismo tiempo, favorecería el movimiento inverso (el transporte retrógrado). Esto genera la redistribución del Golgi en el RE, dejando una estructura de Golgi alterada, y bloqueando el transporte de proteínas recién sintetizadas hacia compartimientos post-Golgi (ya sean proteínas destinadas a la membrana plasmática o de secreción) (Lippincott-Schwartz et al. 1989; Lippincott-Schwartz et al. 1990; Klausner et al. 1992). La BFA no afecta los procesos de endocitosis, pero al alterar el tránsito hacia la membrana, si una proteína transmembrana es endocitada, podría ver dificultado su regreso hacia la membrana o su correcta localización subcelular (Hunziker et al. 1991). El blanco principal de BFA parecería ser un factor de ribosilación de ADP (ARF), el cual es responsable de la asociación entre las proteínas que recubren las vesículas de transporte (*coat protein*) y la membrana de Golgi (Donaldson et al. 1991).

Para poder verificar la desorganización de este compartimiento subcelular frente al tratamiento con la droga, seguimos la distribución de la galactosiltransferasa 1, proteína asociada a cisternas del trans-Golgi (Lippincott-Schwartz et al. 1990; Uliana et al. 2006). Realizamos cultivos de células N2a que expresan en forma estable las construcciones de Pcdh alfa indicadas en la figura R7 o que fueron transfectadas en forma transitoria con EcadFLGFP, y que en ambos casos fueron transfectadas con un plásmido que codifica para galactosiltransferasa 1 fusionada a la proteína fluorescente cian (GalT1CFP).



c)

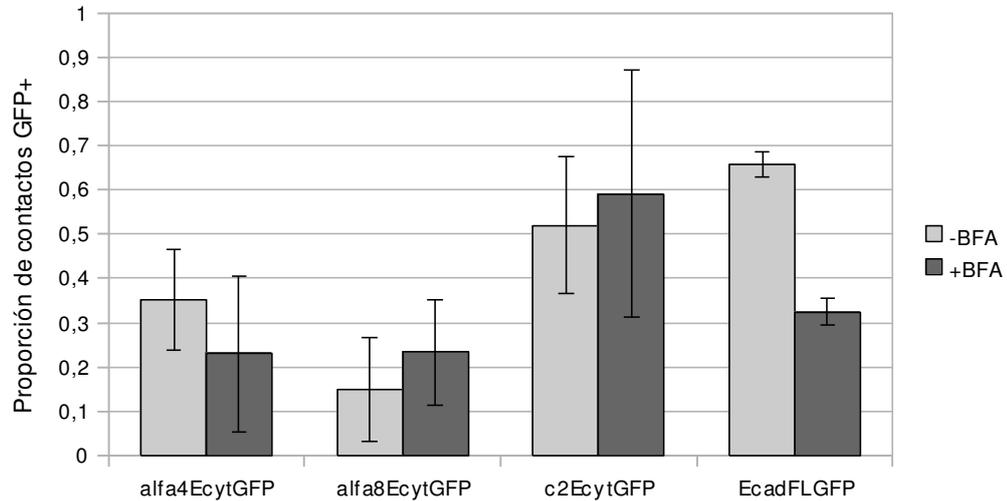


Figura R7: a) Imágenes de microscopio de fluorescencia de células N2a transfectadas en forma estable con las construcciones señaladas para las Pcdh alfa o transfectadas en forma transitoria para Ecad. Incubamos las células por 24hs luego de plaquearlas y las fijamos antes de adquirir las imágenes. Los paneles inferiores corresponden a células que fueron tratadas por 30 minutos con 5ug/ml BFA, antes de fijarlas. Debajo de las imágenes incluimos el esquema de las construcciones. Las Pcdh o Ecad están fusionadas a GFP (verde). b) Control de la desorganización del aparato de Golgi por el efecto de BFA: transfectamos las células en forma transitoria con la proteína marcadora de Golgi GalT1, fusionada a CFP (azul). c) Cuantificación de las imágenes de a), las barras corresponden al intervalo de confianza del 95%.

En el caso de Ecad (figura R7a), vemos que frente al tratamiento con BFA la acumulación de señal de GFP en los contactos es menos intensa, indicando que hay menos cantidad de esta proteína acumulada en los contactos entre células. Mientras que para las Pcdh no notamos grandes diferencias entre tratamientos. En el gráfico (figura R7c), cuantificamos el ensayo ilustrado en las imágenes, considerando solamente aquellos contactos donde hay señal intensa de GFP como positivos para acumulación de proteína, ya sea esta en un punto del contacto o todo a lo largo del mismo (flechas blancas). Para controlar el efecto de BFA, transfectamos los cultivos en forma transitoria con GalT1CFP. En los paneles de la figura R7b mostramos un ejemplo de la apariencia del Golgi en uno y otro caso: es evidente el efecto de esta droga sobre la desorganización del aparato de Golgi.

Para resumir, en estas condiciones vemos que frente al tratamiento con BFA disminuye en forma notable la cantidad de Ecad acumulada en los contactos entre células. Al alterar el tránsito normal intracelular hacia la membrana plasmática con su aporte de nueva proteína, forzamos que aumente la proporción de Ecad presente en endosomas de reciclado en detrimento de su presencia en la membrana celular.

Sin embargo, no vemos grandes diferencias en los niveles de Pcdh alfa acumulados en la membrana entre 2 células en contacto: la proporción de contactos GFP+ se mantiene para cada isoforma aún frente al tratamiento con BFA (sólo detectamos las diferencias en los niveles de acumulación de proteína que ya fueron mencionados anteriormente para cada isoforma).

Es importante destacar que esto ocurre aunque hayamos utilizado las variantes con el dominio citoplasmático de Ecad, lo que sugiere que la estabilidad en la membrana de estas proteínas estaría dada por su dominio extracelular o transmembrana, es decir, esta propiedad residiría en la porción correspondiente a las Pcdh.

Estos resultados nos llevan a pensar que las Pcdh no estarían sujetas a un proceso de reciclado por endocitosis, como sí ocurre con Ecad y, que una vez que establecen interacciones en trans entre células vecinas, permanecen en la membrana en forma estable.

Funciones de las Pcdh alfa en adhesión celular e interacciones en trans

+ Las Pcdh alfa evaluadas no inducirían una fuerte adhesión celular

Teniendo en cuenta lo que observamos en las secciones previas, la acumulación de proteína en los contactos entre células podría sugerir un rol de las Pcdh alfa en adhesión celular, dado que, al menos c2, se deposita en una manera similar a como lo hace Ecad. En consecuencia, buscamos en la literatura diversos ensayos que nos permitieran evaluar si las Pcdh alfa poseen la capacidad de inducir o participar en procesos de adhesión celular. En base a esto diseñamos el ensayo de adhesión en suspensión, el cual se describe con detalle en la sección de “Materiales y Métodos”. Para el mismo, usamos células transfectadas en forma transitoria con todas las construcciones porque no poseemos una línea que exprese en forma estable EcadFLGFP. En estas condiciones, el *background* de adhesión para todos los cultivos será el mismo, ya que las N2a presentan un cierto nivel de adhesión entre sí.

Brevemente, co-transfectamos en forma transitoria células N2a con alguna fusión de Pcdh al dominio citoplasmática de Ecad, marcada con el epítotope HA y con un plásmido que codifica para una proteína fluorescente (o GFP -verde- o mCherry -rojo-). Tal y como esquematizamos en la figura R8a (basado en Nose et al. 1988), 24 hs post-transfección, las levantamos con EDTA (evitando el uso de tripsina) para preservar los dominios extracelulares, y realizamos el ensayo combinando células que sobreexpresan la misma isoforma de Pcdh alfa en su membrana y una proteína fluorescente de distinto color. Mezclamos los cultivos en una relación 1:1 y los incubamos con agitación suave por 2 hs a 37°C. Luego, fijamos las células y obtuvimos imágenes de las mismas mediante un microscopio de fluorescencia.

Es sabido que el Ca^{2+} es importante para las cque adherinas clásicas puedan mediar adhesión celular (Takeichi 1988; Le et al. 1999). Como se dijo en la Introducción, las Pcdh alfa poseen sitios de unión a Ca^{2+} (Kohmura et al. 1998; Wu and Maniatis 1999; Wu 2005). Nos intriga averiguar qué rol cumplen dichos sitios en estas proteínas, por ejemplo: si de mediar adhesión celular a través de Pcdh alfa, el Ca^{2+} resulta de tanta importancia como para las cadherinas clásicas.

Es así como decidimos incluir un tratamiento con EGTA para secuestrar el Ca^{2+} presente en el medio y ver cómo afecta esto el resultado del ensayo de adhesión.

a)

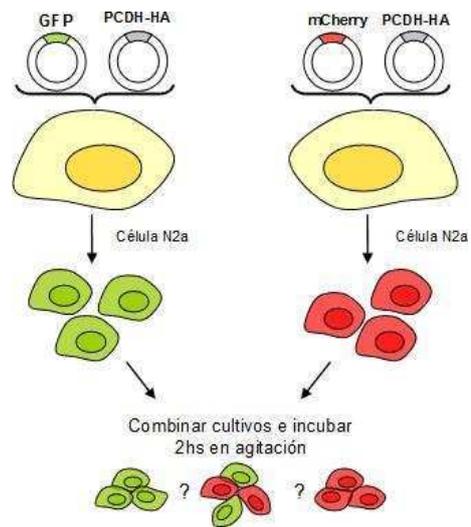
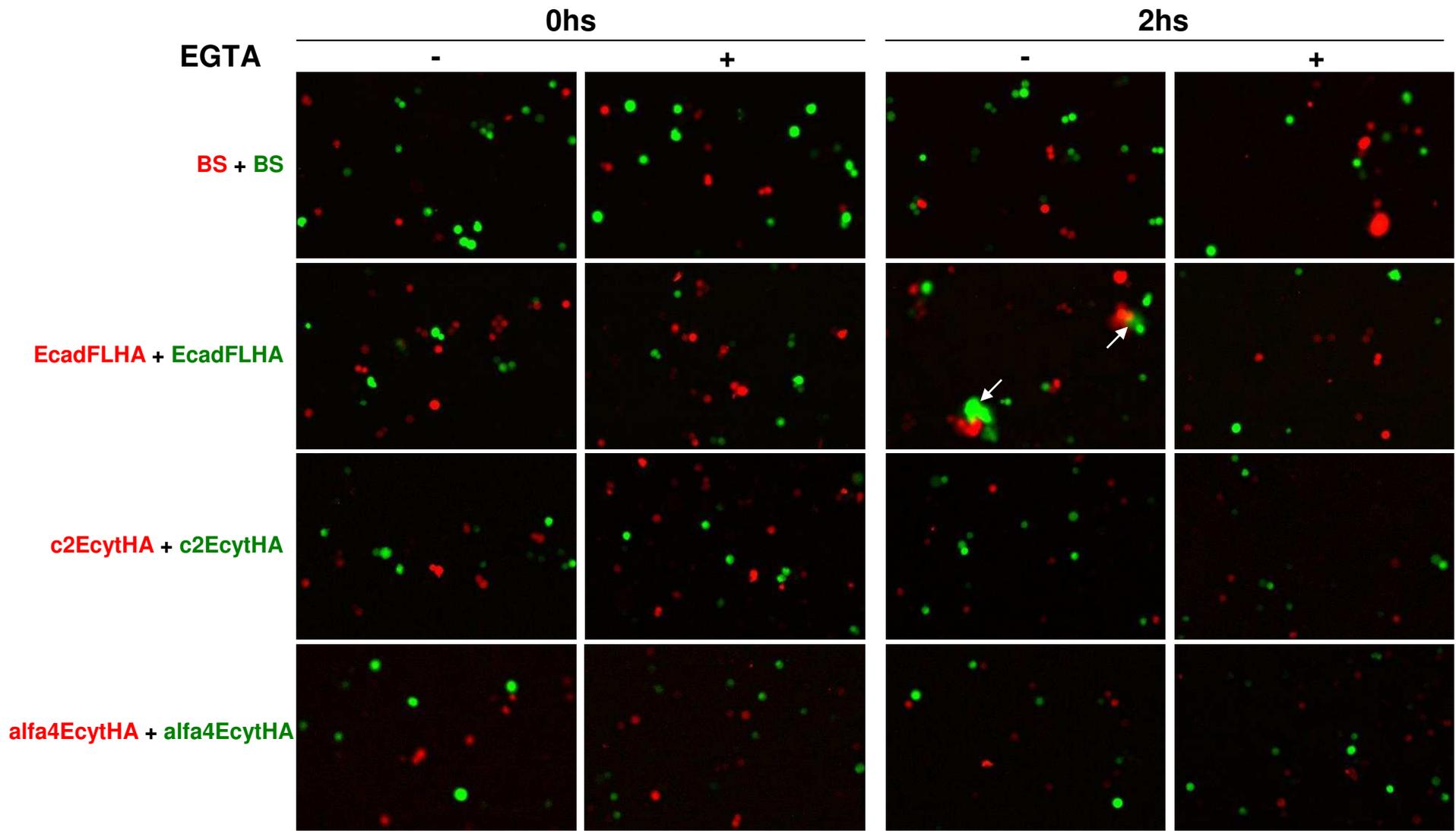


Figura R8: a) esquema del ensayo de adhesión en suspensión; b) imágenes del ensayo, se superpusieron imágenes de transmisión y de fluorescencia. Las células fueron transfectadas con la construcción indicada.

b)



Comparando las imágenes obtenidas luego de 2 hs de adhesión (figura R8b, imágenes de la derecha), resulta claro que en el caso de las células tranfectadas con Ecad, estas forman acúmulos celulares en ausencia de EGTA (flechas blancas), es decir, poseen una capacidad de adhesión incrementada. Sin embargo, esto no es evidente en el caso de las células mock transfectadas o de aquellas que fueron transfectadas con Pcdh alfa 4 o c2: no observamos acúmulos celulares de células fluorescentes en ningún caso. La imagen que obtuvimos es similar a la de células mock transfectadas.

En todos los casos, frente al tratamiento con EGTA las células no forman acúmulos celulares. Esto tiene sentido si consideramos que, como mencionamos antes, la adhesión mediada por Ecad y otras cadherinas clásicas que expresan las N2a depende del Ca^{2+} extracelular.

En el caso de Ecad, luego de 2 hs de adhesión y en ausencia de EGTA, las células que sobreexpresan esta proteína (y una proteína fluorescente) forman acúmulos celulares.

Sin embargo, tanto para las células que sobreexpresan alfa 4 como c2, no detectamos diferencias en el nivel de adhesión entre las mismas: no observamos que formen acúmulos celulares luego de 2 hs de incubación. En principio esto nos indica que las Pcdh alfa al menos no promoverían fuertemente la agregación de células en las condiciones de este ensayo.

Como ya mencionamos, la sobreexpresión afecta la acumulación en la membrana plasmática de las distintas isoformas, lo que podría afectar sus posibilidades para interactuar entre sí.

Decidimos probar otra clase de ensayo para testar si las Pcdh alfa poseen la capacidad de mediar adhesión utilizando la técnica de cultivo en gota colgante o *hanging-drop*. Sin embargo, no conseguimos poner a punto el ensayo de modo tal que esto nos permitiera evaluar la capacidad de las Pcdh alfa de inducir o no adhesión celular (en la sección “Discusión” mencionaremos esto con más detalle).

Hasta el momento, mediante los ensayos realizados, no pudimos establecer que las Pcdh alfa participen de la adhesión celular, ni tampoco los resultados resultan concluyentes respecto del posible rol del Ca^{2+} en la función de las Pcdh alfa.

+ Las Pcdh alfa no mediarían interacciones dependientes del Ca^{2+} extracelular

Hasta ahora no conseguimos evaluar qué efecto tiene el Ca^{2+} (o la falta del mismo) sobre las Pcdh alfa que, como ya dijimos, poseen motivos de unión a Ca^{2+} . Está documentado que este es necesario para la adhesión mediada por cadherinas clásicas y que su depleción con EGTA tiene consecuencias respecto de la función de estas proteínas (evidente en la figura del ensayo de adhesión en suspensión) y de su localización subcelular (Balzac et al. 2005 -E-cadherina-).

Entonces decidimos evaluar si la depleción de Ca^{2+} afecta la localización de las Pcdh alfa, lo que podría sugerir un rol de este catión en la estabilidad de dichas proteínas en la membrana celular.

Para eso, plaqueamos células N2a que expresan en forma estable alfa4EcytGFP o c2EcytGFP y 48 hs después les colocamos medio fresco con o sin agregado de 5 mM EGTA por 30 minutos. Luego lavamos y fijamos las células antes de observarlas con microscopio de fluorescencia.

Como se ve en las células control que fueron tranfectadas en forma transitoria con EcadFLGFP (figura R9a, paneles de la derecha), la concentración de EGTA y el tiempo de incubación que utilizamos fueron suficientes para desorganizar la proteína acumulada en los contactos (esto coincide con lo que otros autores observaron con anterioridad), pero no ocurrió lo mismo con las Pcdh alfa evaluadas. Esto queda más claro si miramos el gráfico en la figura R9b: la depleción de Ca^{2+} claramente afecta la capacidad de Ecad de depositarse en los contactos entre células vecinas y vemos una gran diferencia en la proporción de contactos con proteína acumulada entre ambas condiciones, pero no se ve que ocurra eso con las Pcdh alfa 4 y c2.

A pesar de la presencia de motivos de unión a Ca^{2+} en sus EC, las Pcdh alfa este ión no parecería jugar un rol en la acumulación de las proteínas en la membrana en contactos entre células vecinas o afectar en forma evidente su localización subcelular.

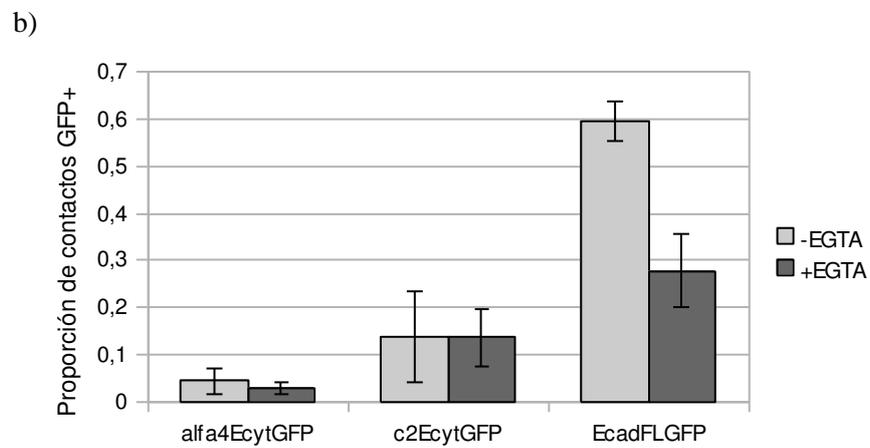
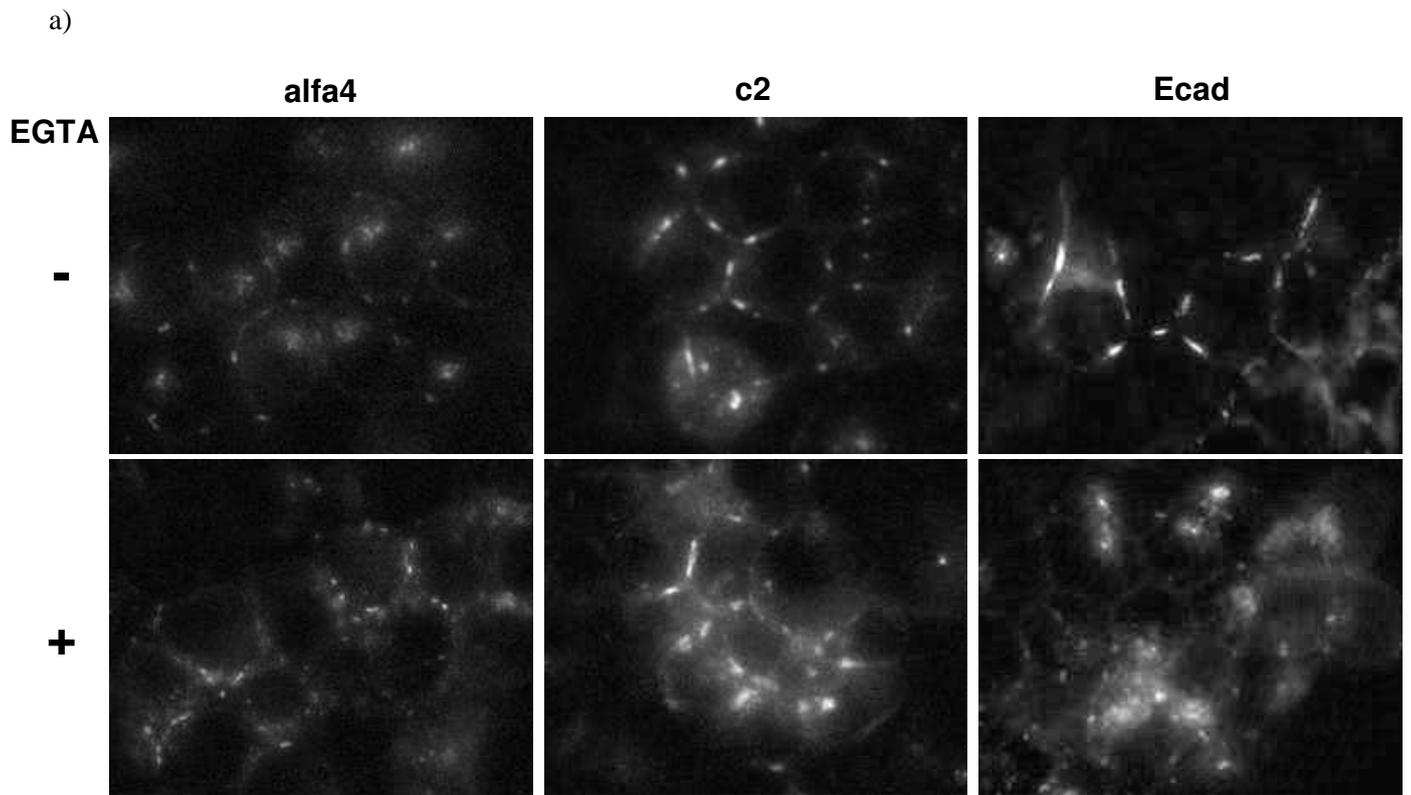


Figura R9: a) imágenes de microscopio de fluorescencia de células N2a que expresan en forma estable alfa4EcytGFP o c2EcytGFP, y células transfectadas en forma transitoria con EcadFLGFP; b) cuantificación del ensayo ilustrado en a), las barras corresponden al intervalo de confianza del 95%.

Las Pcdh alfa sufren procesamiento proteolítico

La adhesión entre células mediada por cadherinas es modulada a través de cambios en los niveles de cadherina en la superficie celular. Como ya mencionamos en la Introducción, esta modulación podría ocurrir en parte por el clivaje de las mismas en la membrana plasmática. Se sabe que en el caso de la Ecad dicho clivaje es secuencial: primero, por la acción de metaloproteasas en la porción extracelular y, luego, por Presenilina-1 del lado intracelular (figura R10). En 2002, Marambaud et al. vieron que este procesamiento provoca la desorganización de las uniones estrechas en las que se acumuló Ecad.

Las Pcdh del cluster gama, además de establecer interacciones homofílicas, sufren procesamiento en la membrana debido a la acción de diferentes proteasas, en forma similar a como ocurre con Ecad (Haas et al. 2005). Primero, son clivadas por una metaloproteasa de matriz en la base de los EC, dando como resultado el fragmento C-terminal 1 (CTF1, por sus siglas en inglés). Este permanece anclado a la membrana a través del dominio TM hasta que es clivado por otra proteasa (por ejemplo, el complejo PS1/gama-secretasa), esta vez del lado citoplasmático, lo que libera un fragmento C-terminal 2 (CTF2) soluble. Este CTF2 podría translocar al núcleo para actuar sobre la transcripción de ciertos genes. Además, el clivaje también podría ser un mecanismo que permita modular las interacciones mediadas por estas Pcdh en la superficie celular (Bonn et al. 2007; Buchanan et al. 2010).

Está descripto que Ecad sufre un clivaje adicional en su porción citoplasmática por Caspasa-3 en células apoptóticas, lo cual libera un fragmento C-terminal 3 (CTF3) (Steinhusen et al. 2001). Aún no ha sido reportado que las Pcdh alfa están sujetas a este procesamiento.

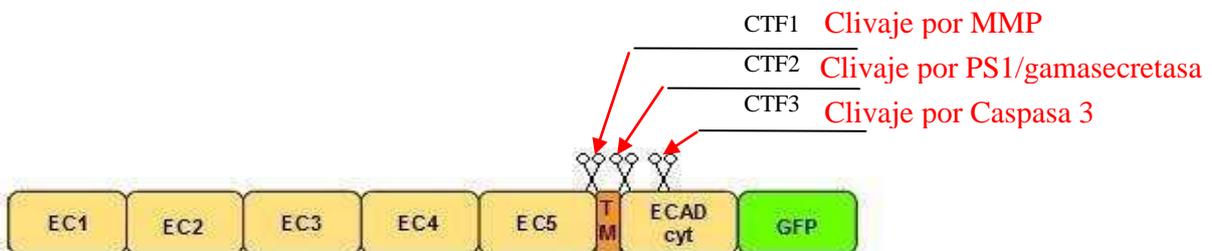


Figura R10: esquema de los clivajes que sufre Ecad en la membrana plasmática por acción de distintas proteasas

Con esta evidencia en mente nos preguntamos si las Pcdh alfa también sufrirían alguna clase de procesamiento. Además, quisimos explorar la posibilidad de que existan diferencias a este nivel entre Pcdh alfa 4 y la variante c2.

Como no conseguimos buen nivel de expresión de Pcdh en células N2a que nos permitiera extraer suficiente proteína para analizar mediante la técnica de Western Blot (WB), decidimos transfectar en forma transitoria células HEK293 (previamente, chequeamos por microscopia confocal que las Pcdh se expresaran en membrana en esta línea celular también).

En primer lugar, utilizamos las construcciones de Pcdh que poseen el dominio citoplasmático de Ecad pues sabemos que son las que presentan mejores niveles de expresión en transfecciones transitorias. El dominio citoplasmático de Ecad presente en estas construcciones incluye una secuencia de reclutamiento para el complejo PS1/gama-secretasa. Como se ve en la figura R11a, nuestra construcción de Ecad sufre los procesamientos descritos en la literatura para esta cadherina, ya que logramos detectar todos sus productos de clivaje: CTF1, 2 y 3.

Por otro lado, todas las construcciones quiméricas de Pcdh también sufren procesamiento. En todas ellas se detectaron varios productos de clivaje, con distinta proporción de cada uno, como se ve en la figura R11b. Es probable que los CTF2 detectados sean consecuencia de la presencia de una secuencia provista por la porción de Ecad de nuestra construcción, que recluta el complejo PS1/gama-secretasa. Aún así, el sitio de corte propiamente dicho sí correspondería a las Pcdh. Es decir, las Pcdh alfa pueden ser clivadas por dicho complejo si este es reclutado sobre las mismas. El fragmento de procesamiento CTF3 corresponde siempre a Ecad, porque el sitio de clivaje se encuentra dentro de la secuencia que corresponde al dominio citoplasmático de esta proteína.

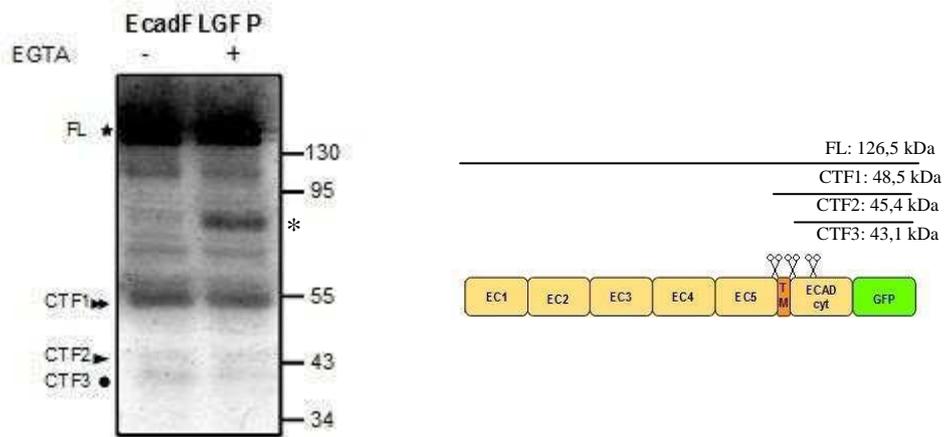
En secciones anteriores mencionamos que nos intriga analizar el posible rol de los motivos de unión a Ca^{2+} presentes en los EC de las Pcdh alfa. En otros ensayos que ya mencionamos no pudimos detectar diferencias en la acumulación de proteína en los contactos entre células frente a la depleción de Ca^{2+} extracelular. Entonces, nos preguntamos si esto tendría alguna consecuencia a nivel de procesamiento proteolítico.

Frente al tratamiento con EGTA, detectamos cambios en el procesamiento proteolítico de EcadFL, aunque en un fragmento no identificado (asterisco en la figura R11a), como esperábamos que ocurriera. Sin embargo, no pudimos detectar efecto del EGTA sobre el

procesamiento proteolítico de las Pcdh alfa: para las isoformas evaluadas no se altera el patrón de clivaje frente al tratamiento con EGTA.

Esto sólo refuerza lo que observamos mediante microscopia: en las condiciones evaluadas, las Pcdh alfa serían insensibles a la depleción de Ca^{2+} .

a)



b)

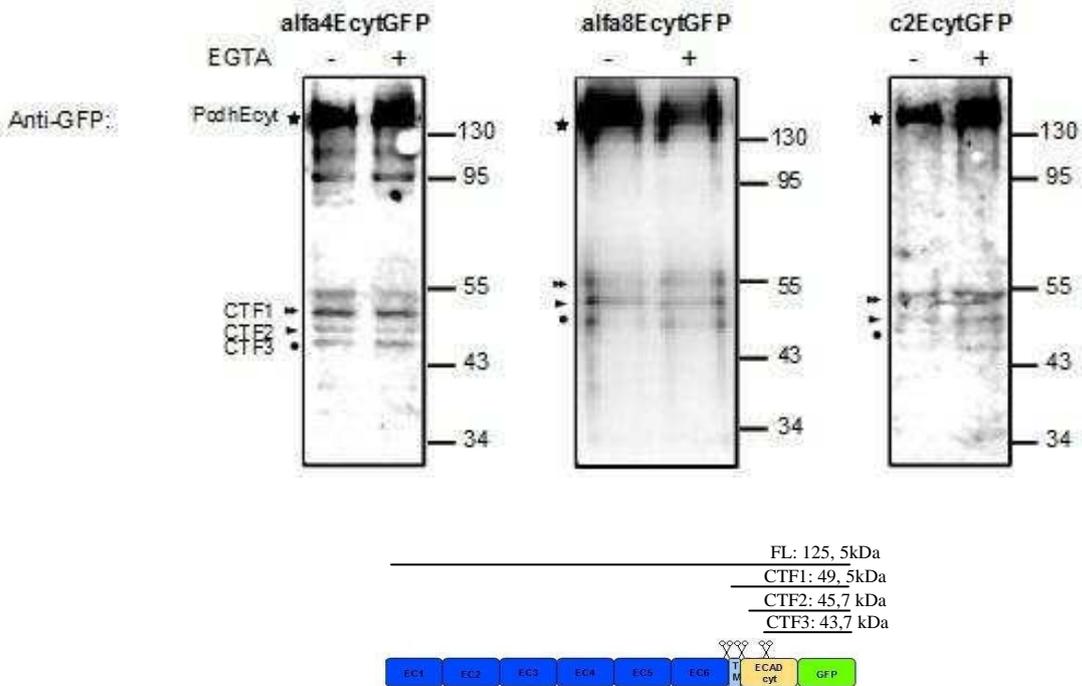


Figura R11: ensayos de WB realizados a partir de extractos de células que fueron transfectadas en forma transitoria con Ecad (a) o con alguna construcción quimérica de una Pcdh alfa (b). La estrella señala la proteína sin clivar; la doble flecha el CTF1; la flecha simple, CTF2, y el punto el CTF3. Todas las membranas fueron reveladas con anti-GFP. Debajo de los paneles hay un esquema que indica los sitios de clivaje para cada construcción y los productos del mismo.

Las construcciones quiméricas son herramientas útiles que usamos a lo largo de esta tesis por numerosas ventajas que ya enumeramos en los distintos ensayos. Sin embargo, el procesamiento que detectamos para éstas probablemente no sea biológicamente relevante.

Por eso decidimos transfectar en forma transitoria células HEK293 con construcciones que permitan la expresión de las Pcdh en su versión completa (FL). Para poder detectar el procesamiento proteolítico, en su extremo amino terminal poseen el tag c-Myc y en el carboxilo terminal, GFP.

Como se ve en la figura R12, al revelar con un anticuerpo anti-GFP (paneles superiores) podemos detectar productos de clivaje que contienen el dominio citoplasmático, ya que este anticuerpo nos permite seguir la porción C-terminal de estas proteínas. Detectamos poco CTF1 para la isoforma c2 respecto de alfa 4 y alfa 8. Además, sólo para alfa 4 detectamos CTF2, mientras que para las otras dos proteínas este producto de clivaje es difícil de distinguir. Esto se apoya en lo hallado por otros grupos que también evaluaron el clivaje proteolítico de alfa 4 (Bonn et al. 2007; Buchanan et al. 2010).

Cuando revelamos con un anticuerpo anti-myc (figura R12, paneles inferiores), que nos permite ver el extremo N-terminal de estas proteínas, no detectamos con igual intensidad la proteína sin clivar que con el anti-GFP (comparar las bandas señaladas con estrellas). Sin embargo, sí podemos detectar una banda que creemos que corresponde al dominio extracelular de Pcdh más el dominio transmembrana (flecha doble, paneles inferiores). Esto nos sorprende ya que lo reportado por otros grupos indica que este segmento es clivado primero y que eso es requisito necesario para que tenga lugar el clivaje de la porción intracelular que libera el CTF2.

En el panel central se muestra actina como control de carga.

Teniendo en cuenta lo expuesto en esta sección, podemos concluir que las Pcdh alfa pueden ser clivadas por proteasas de una manera que recuerda el procesamiento que sufre Ecad y este clivaje parece ser diferente entre isoformas: c2 es clivada en mucha menor proporción que alfa 4 o alfa 8.

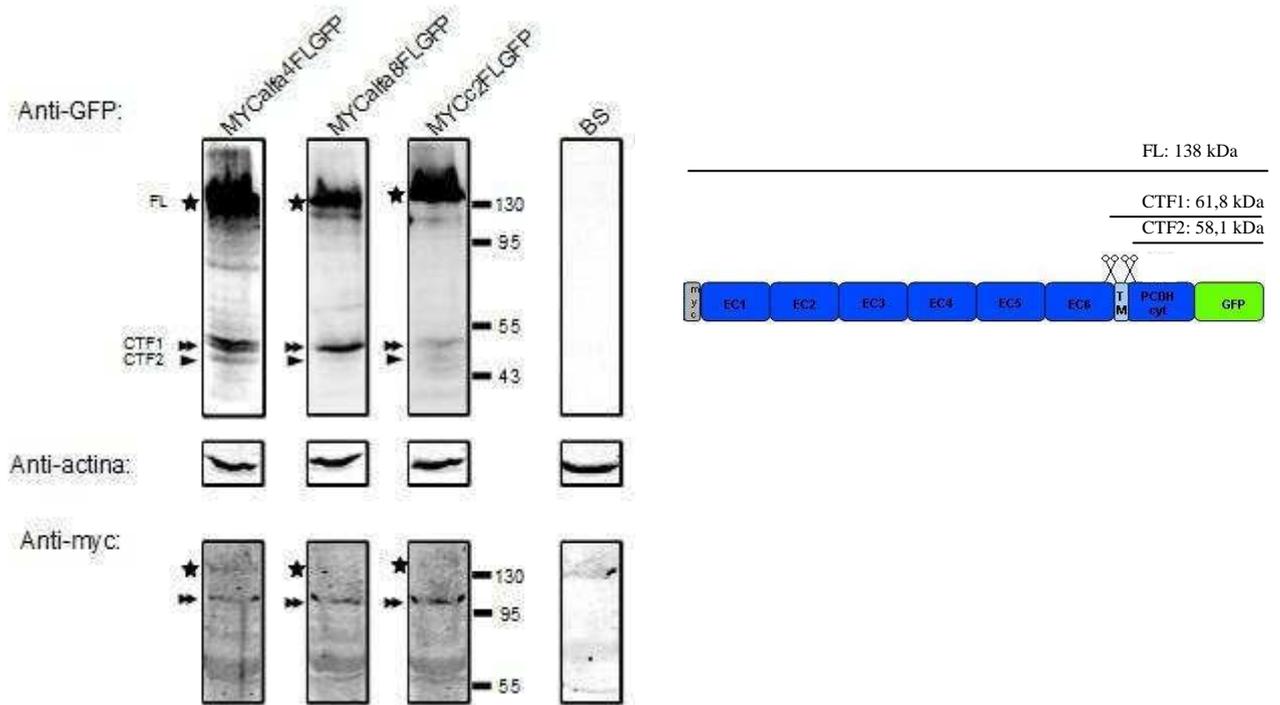


Figura R12: ensayos de WB realizados a partir de extractos de células que fueron transfectadas en forma transitoria con las construcciones indicadas. La estrella señala la proteína sin clivar; la doble flecha, el CTF1 (panel superior) o el dominio extracelular más dominio transmembrana (panel inferior); y la flecha simple, CTF2. Las membranas superiores fueron reveladas con anti-GFP, las centrales con anti-actina y las inferiores con anti-MYC. Debajo de los paneles hay un esquema que indica los sitios de clivaje y los productos resultantes del mismo.

Discusión

Al comenzar esta tesis nuestro objetivo era contribuir, al menos en parte, al conocimiento de la función de las Pcdh en cluster alfa. Intentado, por un lado, responder qué tipo de interacciones establecen y qué factores las afectan. Y, por otro lado, evaluando si sufren procesamiento proteolítico ya que, hasta ese momento, sólo había sido descrito para las Pcdh gama.

Como mencionamos en la Introducción, en la bibliografía había información disponible sobre la regulación de la expresión génica de las Pcdh alfa a nivel de células individuales: es monoalélica y estocástica para las isoformas alfa 1 a 12, pero bialélica y constitutiva para c1 y c2; la expresión de una isoforma depende de la interacción física entre el promotor de la misma y el LCR, mediada por CTCF (con excepción de c2); y, también, está sometida a regulación epigenética (los promotores de las isoformas que se expresan en una célula dada, están hipometilados). Pero existía una menor cantidad de datos sobre la *función* que podrían cumplir estas proteínas en el SNC.

En particular, nos interesaba analizar si las isoformas tipo c presentaban alguna diferencia respecto de los demás miembros del cluster, ya que todos los datos existentes sobre la regulación de su expresión génica las hacían destacar dentro de la subfamilia.

A continuación, discutiremos los experimentos ya expuestos en la sección “Resultados” con los que intentamos responder las hipótesis presentadas en un principio, para cubrir diversos aspectos aún desconocidos de la función de las Pcdh en cluster alfa.

+ Las distintas variantes de Pcdh alfa tendrían un diferente nivel de acumulación en la membrana plasmática

Lo primero que observamos en las células N2a es que, de las isoformas ensayadas, c2 es la que presenta un patrón de acumulación en membrana más evidente y muy similar al de Ecad. No tenemos en claro si esta diferencia en el patrón de acumulación es consecuencia de las condiciones experimentales (por ejemplo, si se debe a un problema técnico) o si se trata de una diferencia real en cuanto a la acumulación en membrana entre variantes de Pcdh alfa. Existe evidencia que muestra que las Pcdh alfa necesitan ser co-expresadas junto a una Pcdh perteneciente al cluster beta o gama para ser transportadas hacia la membrana plasmática, a excepción de c2 (Murata et al. 2004; Thu et al. 2014, discutimos este último trabajo en más detalle en el epílogo). Si bien las células N2a expresan también ciertas Pcdh del cluster gama (Tasic et al. 2002), es posible que los niveles de proteína de estas isoformas no sean los necesarios para

transportar las isoformas alfa 4 y alfa 8 al ser sobreexpresadas. Es posible, entonces, que esta sea la causa de la menor acumulación en la membrana plasmática que observamos para estas dos isoformas y, como c2 no dependería de otras isoformas para su transporte, da el patrón de acumulación en membrana que ya describimos.

Si distintos miembros del cluster alfa tienen diferentes funciones tampoco resulta ilógico pensar que puedan acumularse en distinta proporción en la membrana plasmática, en los contactos entre células vecinas.

Además, si tenemos en cuenta que actualmente se supone que la unidad básica de reconocimiento para las Pcdh es un multímero formado por isoformas de los distintos clusters (Murata et al. 2004; Bonn et al. 2007; Han et al. 2010; Schalm et al. 2010; Schreiner & Weiner 2010; Prasad & Weiner 2011; Yagi 2012; Hirano et al. 2012; Chen & Maniatis 2013), que éstas lleguen en distinta proporción a la membrana plasmática agrega un nuevo nivel de variabilidad. Así, de una forma sencilla se puede afectar la composición de los multímeros y, por ende, el reconocimiento mediado por Pcdhs.

Encontramos que la isoforma c2 presenta diferencias en su nivel de acumulación en los contactos entre células respecto de las variantes alfa 4 y alfa 8. Observamos que c2 parece acumularse efectivamente en una proporción mayor de contactos entre células, ya sea considerando las construcciones quiméricas (transfecciones transitorias o estables) o las FL (líneas de expresión estable). Como observamos siempre la misma tendencia en la acumulación de proteína en la membrana celular en los contactos entre células vecinas, suponemos que las diferencias encontradas se deben a la variante de Pcdh analizada y no a las modificaciones que introdujimos en su dominio citoplasmático. Estas diferencias estaban presentes en transfecciones transitorias y estables de células N2a y en transfecciones transitorias de células HEK293 y CHOK1 (resultados no mostrados), tanto para variantes con el dominio citoplasmático de Ecad como para aquellas que tenían su propio dominio citoplasmático.

Sin embargo, no tenemos la certeza de que esas diferencias sean reales y biológicamente relevantes. Podría deberse sencillamente a que la acumulación en membrana de alfa 4 y 8 requiera de otros componentes celulares que, al no ser sobreexpresados, resulten limitantes para el transporte de estas variantes (retomaremos esto en el epílogo a la luz de trabajos más recientes).

El uso de un sistema de expresión inducible en este tipo de experimentos permitiría comparar los resultados en condiciones de niveles de proteína decrecientes, y por ende podría confirmar lo que observamos en los ensayos ya mencionados.

+ Las Pcdh alfa testadas establecen interacciones exclusivamente homofílicas

A través del ensayo de co-cultivos confirmamos que tanto Pcdh alfa 4 como c2 establecen exclusivamente *interacciones homofílicas* en trans. Esta observación es consistente con lo observado por otros autores para las Pcdh gama (Schreiner and Weiner 2010). Consideramos que este hallazgo es un aporte fundamental y que es el corazón de este trabajo de tesis, porque tiene importantes implicancias sobre las posibles funciones de estas proteínas. Tal como ocurre con la proteína Dscam en *Drosophila*, la existencia de un inmenso repertorio de isoformas en el genoma, combinada con la expresión estocástica de muy pocas isoformas por célula, y el reconocimiento homofílico, sugieren un rol en la determinación de la identidad neuronal. Específicamente, es posible proponer un rol de las Pcdh alfa en la discriminación de contactos entre neuritas propias de una determinada neurona versus contactos con neuritas no propias. Los contactos entre neuritas propias generarían señales intracelulares que desembocarían en repulsión del contacto. Es decir, las Pcdh alfa contribuirían al establecimiento de contactos entre células vecinas.

Se sospecha que la unidad básica para la interacción no sería una sola isoforma sino un multímero, como mencionamos antes, formado por isoformas de los 3 clusters expresadas estocásticamente en células individuales. Esto expande la diversidad de posibles marcadores de membrana que puede poseer una célula sólo por expresión estocástica de las distintas isoformas apoyando aún más la idea de que estas proteínas pueden ser, al menos en parte, responsables de determinar la identidad neuronal.

Era nuestra idea reforzar estos resultados utilizando proteína recombinante producida en células de insecto mediante el sistema de expresión de baculovirus (en colaboración con el Dr Oscar Taboga, del INTA-Castelar). Esta proteína fue acoplada a microesferas fluorescentes y dicho complejo se usó para desafiar células N2a que expresaban en forma estable la misma isoforma que la acoplada a la esfera o una distinta. Incluso generamos una versión quimérica con los dominios EC1 a 3 de alfa 4 y los EC4 a 6 de c2 para evaluar la necesidad de los distintos dominios en el reconocimiento homofílico.

Lamentablemente, la cantidad de proteína que llegamos a producir no fue suficiente para obtener resultados.

Seguimos creyendo que este ensayo representa una herramienta valiosa para el estudio de interacciones entre las Pcdh. De producir mayores cantidades de proteína recombinante, podríamos obtener resultados que no sólo reforzaran la idea de que las interacciones en trans entre Pcdh alfa son homofílicas sino que también nos proveería de datos fácilmente cuantificables que permitieran distinguir si existen diferencias entre isoformas en el grado de reconocimiento de cada una y, también, realizar un estudio sobre los dominios necesarios para el reconocimiento homofílico.

También intentamos usar la proteína recombinante producida para hacer ensayos mediante la tecnología Biacore (GE), con ayuda de los Dres. Marisa Fernández y Mauricio DeMarzi del IDEHU. La misma permite analizar mediante *resonancia de plasmón superficial* (o SPR, por sus siglas en inglés) la interacción entre moléculas sin necesidad de marcarlas y en tiempo real. Brevemente, uno de los componentes a evaluar se inmoviliza sobre una placa de vidrio y el otro se deja fluir en solución sobre el primero. De ocurrir interacción entre ambos componentes, cambia el ángulo de salida de un haz de luz que incide sobre la placa de vidrio. El equipo puede interpretar estos datos para ofrecer datos tales como constantes de asociación/disociación o la cinética de la interacción. Si bien este sistema permite trabajar con pequeñas cantidades de muestra, la concentración de nuestras proteínas fue nuevamente muy baja y no se encontraban lo suficientemente purificadas como para poder realizar el ensayo en forma satisfactoria. De todos modos, creemos que esta nueva tecnología permitiría obtener datos interesantes en un futuro sobre la interacción entre distintas Pcdh, que complementarían con los obtenidos en un ensayo con microesferas.

+ Las isoformas analizadas presentan diferencias en el patrón temporal con que se acumulan en los contactos entre células

Gracias al ensayo de “tiempos de plaqueo” encontramos que, excepto para alfa 8, en todos los tiempos analizados la acumulación de Pcdh en membrana fue mayor para las versiones con Ecyt que para las FL. Es posible que la secuencia citoplasmática de las Pcdh alfa contenga algún elemento que afecte en cierta medida su tránsito hacia la membrana plasmática. Realizamos una búsqueda a través de una plataforma de análisis

de motivos proteicos disponible online (Motif Scan: http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan), pero no encontramos en la secuencia de su dominio citoplasmático motivos que explicaran la retención intracelular de las Pcdh alfa FL.

Por otro lado, c2 muestra mayores niveles de acumulación en membrana a mayores tiempos luego de que comienzan a formarse los contactos entre células, mientras que para alfa 4 y alfa 8 esto no ocurriría así. La isoforma c2 se comporta en forma diferente frente a los otros miembros del cluster alfa que analizamos de esta manera y su patrón de acumulación es el que más se asemeja al de Ecad. Puede ocurrir que la mayor acumulación de c2 se deba simplemente a que una mayor proporción de moléculas de c2 llega en forma correcta a la membrana o puede ser que efectivamente c2 se concentre en mayor proporción que otras isoformas en los contactos entre células, diferenciándose en esto de otros miembros del cluster alfa.

Lo que obtuvimos en el ensayo de “tiempos de plaqueo” nos sugiere, por un lado, que para que tenga lugar la acumulación de Pcdhs en los contactos entre células no basta simplemente con que dos células estén en contacto sino que requiere un cierto tiempo para ocurrir (hay que recordar que plaqueamos las células en este ensayo de forma tal que en cada tiempo analizado la densidad de células fuera la misma).

Tiene sentido pensar que si en la membrana de las neuronas existen moléculas que permiten sensar la identidad de las neuronas vecinas, este proceso puede requerir de un cierto tiempo para que se acumulen todas las señales necesarias en el punto de contacto entre membranas. Teniendo en cuenta que cada neurona expresa un subset de variantes de Pcdh de cada cluster, si el reconocimiento mediado por Pcdh es perfectamente homofílico (formen estas parte de complejos proteicos o no), implicaría que esa proyección está contactando a la misma célula de la cual se originó. Esto puede llevar, por ejemplo, a la retracción de un cono de crecimiento de una dendrita o axón. Para que esto ocurra puede que no sea necesario un alto nivel de expresión en membrana de estas Pcdh: un exceso en la expresión de determinadas isoformas podría generar un reconocimiento homofílico desmedido que repercuta negativamente en el correcto establecimiento de conexiones entre neuronas generando repulsión en un caso donde no sea necesaria.

Los mayores niveles de acumulación de c2 que observamos, junto con la información que aportaron otros grupos sobre su aumento de expresión postnatal, simultáneamente con la disminución en la expresión de las otras isoformas (Kaneko et al. 2006), nos

hacen pensar que la función de esta proteína puede estar relacionada con interacciones que tienen lugar en una conexión entre células correctamente establecida, más que en el sentido de la “identidad” de las células vecinas.

En ratones transgénicos, donde se trunca la región citoplasmática de las Pcdh alfa, los animales crecen y resultan fértiles (su delección no es letal como en el caso de las Pcdh gama) pero presentan alteraciones en la formación de la memoria (Fukuda et al. 2008). También, las neuronas serotoninérgicas de estos animales muestran proyecciones axonales incompletas hacia sus sitios blanco y carecen de la suficiente arborización dendrítica (Katori et al. 2009). Todo esto hace pensar que las Pcdh alfa estarían involucradas en la maduración de las conexiones neuronales.

Es necesario profundizar en este aspecto para evaluar si las diferencias en acumulación en contactos entre células son relevantes y si tienen alguna consecuencia biológica (en el “Epílogo” discutimos los recientes hallazgos de Thu et al. 2014 en este tema).

+ No existiría un reciclado de Pcdhs una vez que estas están involucradas en una interacción en trans entre células

Encontramos que las Pcdh alfa que analizamos presentan diferencias al acumularse en los contactos entre células. De ellas, sólo c2 presenta un patrón similar al de Ecad. Esto podría responder a diferencias propias de las isoformas que elegimos para desarrollar este trabajo de tesis o a problemas en el sistema de expresión elegido. Si tenemos en cuenta que ensayamos la expresión de nuestras construcciones en distintas líneas celulares, que evaluamos su expresión tanto en forma estable como transitoria, que probamos distintas versiones de las Pcdh alfa elegidas (FL, con el dominio citoplasmático de Ecad, sin dominio citoplasmático), nos resulta extraño pensar que siempre hayamos observado el mismo comportamiento si este no es propio de las Pcdh alfa.

La endocitosis y reciclado de Ecad constituyen mecanismos que, se supone, permiten regular la disponibilidad de esta proteína en forma rápida y dinámica en la membrana plasmática. Esto se puede estudiar tratando cultivos celulares con brefeldina A (BFA). Si bien no afecta directamente la endocitosis, la BFA genera la redistribución del Golgi en el retículo endoplasmático y provoca la internalización de la Ecad.

Nuestros ensayos no nos permitieron detectar la existencia de un proceso similar para las Pcdh alfa, al menos no mediante los mecanismos por los que se sabe que sí ocurre para Ecad.

Efectivamente, encontramos que en nuestras manos, frente al tratamiento con BFA, disminuye en forma notable la cantidad de Ecad acumulada en los contactos entre células. Al alterar el tránsito normal intracelular hacia la membrana plasmática con su aporte de nueva proteína, inducimos que aumente la proporción de Ecad presente en endosomas de reciclado en detrimento de su presencia en la membrana celular. En cambio, la proporción de contactos GFP+ de cada isoforma de Pcdh alfa testada se mantiene invariable aún frente al tratamiento con BFA.

Entonces, podemos especular que las Pcdh no estarían sujetas a un proceso de reciclado por endocitosis similar al de Ecad y que, aparentemente, una vez que establecen interacciones en trans entre células vecinas en las condiciones que evaluamos, permanecen en la membrana plasmática en forma estable o, al menos, hasta que reciben las señales adecuadas para ser internalizadas, las cuales aún son desconocidas.

El hecho de que una célula exponga o no ciertas Pcdh en cluster en su membrana podría afectar la capacidad de esa célula de “establecer su identidad” frente a las vecinas. Suponemos que la internalización de Pcdh alfa debe ser un proceso regulado pues en ciertos momentos del desarrollo del sistema nervioso es crítico que las células tengan la capacidad de distinguirse a sí mismas frente a las vecinas para establecer las conexiones correctas. Y, como ya expusimos, se cree que las Pcdh en cluster juegan un rol en este proceso, aunque sigue sin estar claro cómo ocurre.

Además, de acuerdo a lo que dicen Buchannan et al, si el procesamiento proteolítico de las Pcdh alfa depende de su endocitosis previa, su permanencia en la membrana en una situación en la que forzamos el reciclado sugiere que la vía por la cual tiene lugar la endocitosis de estas proteínas debe obedecer a un mecanismo distinto al que evaluamos en nuestro experimento. Y suponemos que el mismo debe estar muy regulado pues la proteólisis de las Pcdh alfa podría derivar en señalización intracelular (más adelante volveremos sobre este punto, al discutir el procesamiento proteolítico de las Pcdh alfa en más profundidad).

+ Las Pcdh alfa evaluadas no inducirían una fuerte adhesión celular

Teniendo en cuenta las similitudes estructurales de las Pcdh y las cadherinas clásicas, nos planteamos evaluar su posible participación en procesos de adhesión celular.

Además, como ya se mencionó, observamos la acumulación de distintas Pcdh alfa en los contactos entre células, detectando que al menos la isoforma c2, lo hace de una manera similar a Ecad.

Para testar esta idea, primero pusimos a punto las condiciones de transfección y cultivo de modo tal que la sobreexpresión de una cadherina clásica en células en cultivo indujera la adhesión celular en respuesta a la manipulación del Ca^{2+} extracelular, como está reportado en la literatura.

Utilizando esas mismas condiciones, sin embargo, no logramos detectar un incremento en la adhesión celular para células que sobreexpresaran Pcdh alfa 4 o la isoforma c2, sin importar la presencia o no de Ca^{2+} extracelular.

Probamos otra clase de ensayo para testar si las Pcdh alfa poseen la capacidad de mediar adhesión utilizando la técnica de cultivo en gota colgante o *hanging-drop* (resultados no mostrados). En la misma, nos independizamos de la adhesión de las células al sustrato para evaluar exclusivamente la adhesión entre sí. Brevemente, las células crecen formando acúmulos celulares dentro de las gotas que cuelgan invertidas sobre la tapa de una placa de Petri plástica. Si las células poseen una capacidad de adhesión incrementada (por sobreexpresar una cadherina clásica o una Pcdh), los acúmulos celulares que formen deberían ser más compactos y, en consecuencia, más difíciles de disgregar mecánicamente con una micropipeta p20. No nos fue posible detectar diferencias entre cultivos de células N2a que sobreexpresaban Ecad y otras mock transfectadas: la disgregación que observamos luego de pasar las gotas 10 veces por un tip con un p20 fue similar en ambos cultivos. Suponemos que esto obedece a que la línea N2a posee una adhesión basal demasiado alta que afecta este tipo de ensayo pues en el de adhesión en suspensión que se mencionó antes, sí notamos un comportamiento diferente para cultivos equivalentes. Repetimos el ensayo de hanging-drop con otra línea celular que posee un menor nivel de adhesión basal, la línea CHOK1. Tampoco en este caso logramos obtener diferencias entre células que sobreexpresan Ecad versus

otras mock transfectadas, ni siquiera secuestrando el Ca^{2+} del medio de cultivo con EGTA. En consecuencia, no pudimos utilizar este ensayo para extraer conclusiones sobre la posibilidad de que las Pcdh alfa puedan mediar adhesión celular.

Hasta el momento no pudimos detectar que las Pcdh alfa promuevan una fuerte adhesión entre células, al menos no como una cadherina clásica, tal y como vimos en el ensayo con células en suspensión.

Sin embargo, no necesariamente la interacción en trans de las Pcdh alfa tiene que generar adhesión para promover reconocimiento o repulsión entre dos células en contacto, ya que es posible que su función en este aspecto no requiera que las células se mantengan vinculadas por un tiempo prolongado. Si este fuera el caso, sería suficiente con que las Pcdh alfa medien reconocimiento homofílico para que pudieran cumplir su rol.

En línea con esto, se encontró recientemente que en células amácrinas y células de Purkinje de ratones KO para el cluster gama, se altera la autorepulsión entre dendritas provenientes de una misma neurona. Si expresan una sola isoforma, las células recuperan la capacidad de autorepulsión aunque no son capaces de distinguir dendritas provenientes de una misma neurona respecto de otras provenientes de neuronas vecinas ya que todas expresan la misma Pcdh gama (Lefebvre et al. 2012). Estos resultados apoyan fuertemente la noción de que las Pcdh en cluster, a través de sus interacciones hemofílicas en trans, son en parte responsables de la autorepulsión entre proyecciones que provienen de una misma neurona.

+ Las Pcdh alfa no mediarían interacciones dependientes del Ca^{2+} extracelular

Es sabido que el Ca^{2+} extracelular es necesario para la adhesión mediada por cadherinas clásicas (Hirano et al. 1987; Alattia et al. 1997; Alattia et al. 1999; Van Roy and Berx 2008). Las Pcdh en cluster han conservado los motivos de unión a Ca^{2+} presentes en las cadherinas clásicas. Es por eso que a pesar de haber descartado la idea de que las Pcdh en cluster participen en la adhesión celular, nos interesaba estudiar si este catión tiene algún rol sobre la expresión o la localización de las Pcdh. Primero pusimos a punto un ensayo de adhesión celular que nos permitiera verificar los efectos de manipulación de los niveles de Ca^{2+} . Usando células que sobreexpresan Ecad pudimos comprobar que la

depleción del Ca^{2+} del medio afecta la capacidad de las células de adherirse entre sí, así como la localización subcelular de Ecad: frente a este tratamiento, la proteína es internalizada y ya no puede participar en adhesión entre células.

Cuando realizamos este estudio en células que sobreexpresan alfa 4 o c2, a pesar de presentar motivos de unión a Ca^{2+} en sus EC, este no parecería afectar en forma evidente su acumulación en la membrana en contactos entre células vecinas ni su localización subcelular. Por esto suponemos que este tampoco sería un mecanismo que permita regular la función de las Pcdh alfa.

En este aspecto, las Pcdh alfa se comportan de manera muy diferente a la Ecad, cuya función y procesamiento sí están afectados por la depleción de este ión (mencionaremos el procesamiento en la próxima sección). Esto apoya la noción de que la función de las Pcdh en cluster está diferenciada de las cadherinas clásicas, a pesar de poseer características similares a las de estas últimas en su estructura.

+ Las Pcdh alfa sufren procesamiento proteolítico

El clivaje de las cadherinas clásicas en la superficie celular ayuda a modular la cantidad de esta proteína expuesta en la membrana y, en consecuencia, afecta la capacidad de adhesión de una célula a sus vecinas. Como ya mencionamos, las cadherinas clásicas como Ecad o Ncad sufren un clivaje secuencial. Primero, se cliva la porción extracelular por una metaloproteasa de matriz generando un fragmento llamado CTF1. Luego, el complejo gama secretasa libera la fracción intracelular de la cadherina en el citosol, generando el fragmento CTF2. Para Ecad incluso se encontró que, en células apoptóticas, ocurre un tercer clivaje dentro del CTF2 dando origen al CTF3 (ver figura 11 para más detalles) (Marambaud et al. 2002; Reiss et al. 2005; Maretzky et al. 2005; Ferber et al. 2008).

Nuevamente basándonos en las similitudes estructurales entre cadherinas clásicas y las Pcdh en cluster, decidimos analizar si las Pcdh alfa sufren algún tipo de procesamiento proteolítico. Encontramos que las tres isoformas que testamos (alfa 4, alfa 8 y c2) muestran productos de clivaje. El patrón que obtuvimos es similar al reportado para

cadherinas clásicas y, además, logramos reproducirlo con Ecad en nuestro sistema de trabajo.

Sin embargo, las proporciones de los distintos CTF son distintas para las Pcdh alfa estudiadas: vemos poca acumulación de CTF1 para c2 respecto de alfa 4 y alfa 8, y sólo para alfa 4 se detecta claramente el fragmento CTF2.

Esto es coherente con los resultados obtenidos simultáneamente por Buchanan et al: ellos encuentran que el clivaje de las Pcdh alfa depende de su internalización previa. Nosotros encontramos que entre estas isoformas, c2 es la que tiene mayor acumulación en la membrana plasmática y, entonces, tiene sentido que sea la isoforma para la que vemos menor cantidad de productos de clivaje. Mientras que para alfa 4 y 8, donde la mayor parte de la señal de proteína recombinante la observamos en compartimentos intracelulares, claramente detectamos aparición de los CTF1/2. Creemos que las diferencias que vimos en el clivaje de estas tres isoformas obedece a las diferencias que notamos en su localización en las células.

A la luz de estos resultados, proponemos que el reconocimiento homofílico Pcdh-Pcdh entre células vecinas estabilizaría las versiones FL de estas proteínas en la membrana plasmática, impidiendo su internalización y, por ende, su clivaje proteolítico. Este podría ser un punto interesante de regulación de la función de las Pcdh alfa, porque el impedir la producción de los CTF frenaría la señalización intracelular disparada por estos fragmentos.

Previamente, mencionamos que la localización subcelular de las Pcdh alfa sería independiente de los niveles de Ca^{2+} extracelular, a diferencia de lo que ocurre para Ecad. De acuerdo con nuestros resultados, la depleción o no de este ión tampoco influiría sobre el procesamiento proteolítico de las Pcdh, mientras que sí vemos diferencias para Ecad. Esto también está dentro de lo esperado si tenemos en cuenta que al no alterarse la distribución de estas proteínas frente al tratamiento con EGTA, tampoco deberíamos observar diferencias en su procesamiento proteolítico.

Esto sólo refuerza la noción de que las Pcdh alfa serían insensibles a la depleción de Ca^{2+} , tanto para su localización subcelular como para su procesamiento.

El procesamiento de las Pcdh alfa podría constituir una herramienta que permita modular su función y expresión, de la misma manera que sucede con otras proteínas de

membrana (por ejemplo, NCAM, N-cadherina y E-cadherina). Se ha reportado que el clivaje de las Pcdh alfa y gama disminuye durante el desarrollo del sistema nervioso y al diferenciar células de tipo neuronal en cultivo (Buchanan et al. 2010). También, existen reportes de que en estas condiciones (favoreciendo la diferenciación en estos tipos celulares) aumenta la asociación entre sí de isoformas alfa y gama en la misma célula. Esto va acompañado de una disminución en el clivaje de las Pcdh, lo que sugeriría que se “protegen” de las proteasas al interactuar físicamente (Bonn et al. 2007; Buchanan et al. 2010). El mayor nivel de proteólisis de Pcdh durante etapas tempranas del desarrollo embrionario en ratón podría indicar la gran necesidad de una señalización dependiente de Pcdh en períodos de activa neurogénesis, sinaptogénesis y crecimiento de neuritas (Buchanan et al. 2010).

Todo lo que mencionamos en esta última parte sugiere fuertemente que la proteólisis es un proceso que puede estar involucrado en la regulación de la función de las Pcdh en cluster.

Epílogo

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo concuerdan con lo hallado por otros laboratorios alrededor del mundo y ayudan a entender la complejidad que encierran las Pcdh en cluster.

Como vimos, las Pcdh alfa entablan interacciones homofílicas en trans (al igual que otros observaron para las Pcdh gama). Esto, en conjunto con la expresión estocástica de distintas isoformas en neuronas individuales y el conocimiento actual de que la unidad de interacción es un multímero formado por isoformas de los tres clusters, apoya la noción de que estas proteínas proveen un gran número de posibles marcadores de membrana que ayudarían a determinar la identidad neuronal.

Su procesamiento proteolítico, que recuerda al de las cadherinas clásicas, sugiere que este puede ser un mecanismo que permita regular su función aunque aun no hay mucha más información disponible en este aspecto (para más detalles, ver los *reviews* Weiner & Jontes 2013; Yagi 2013; Keeler et al. 2015).

Recientemente, se encontró que ratones KO para las isoformas tipo c del cluster gama (c3, c4 y c5) son fenotípicamente indistinguibles de ratones KO para el cluster gama completo: mueren al nacer. Sin embargo, si se bloquea genéticamente la apoptosis con

ratones KO para Bax (como ya se hizo exitosamente, ver Weiner et al. 2005), se rescata la letalidad neonatal de los ratones KO para las isoformas c, lo que no ocurre cuando se elimina todo el cluster. El rol de las Pcdh gama en supervivencia neuronal estaría primordialmente mediado por las isoformas tipo c, mientras que la diversidad de isoformas tendría un rol esencial para el desarrollo post-natal (probablemente en la formación de conexiones neuronales correctas) (Chen et al. 2012). Esto apoya la noción de que la variabilidad de isoformas de las Pcdh en cluster es esencial para su función en el SNC.

Desde que finalizaron los experimentos descritos en este trabajo (en mayo 2013) y se elaboró este manuscrito se han publicado algunos artículos y revisiones bibliográficas sobre el tema consistentes con varias de las ideas que aquí se discuten. Por sus hallazgos y su impacto en el estudio de las Pcdh en cluster, creemos necesario comentarlos en esta sección.

+ *La expresión estocástica de las Pcdh está regulada por modificaciones epigenéticas durante el desarrollo*

Por un lado, se encontró que los promotores de Pcdh son metilados diferencialmente por la metilasa *de novo* Dnmt3b y que este proceso tiene lugar durante etapas tempranas del desarrollo embrionario en ratón. Las isoformas que se expresan en forma estocástica (alfa 1 a alfa 12) presentan patrones de metilación diferentes que se corresponden con su expresión en células de Purkinje individuales (si el promotor está desmetilado, hay mayor probabilidad de que esa isoforma se exprese). Mientras que, en aquellas isoformas que se expresan en forma constitutiva (alfa c1 y c2), los promotores se encuentran mayormente desmetilados (Toyoda et al. 2014).

En neuronas de ratones KO para Dnmt3b, la metilación en zonas promotoras de las isoformas 1 a 12 del cluster alfa es menor y se observa un aumento en el número de isoformas que expresa cada neurona. Sin embargo, esto no altera la expresión constitutiva de c1 y c2. Tampoco se modifican los niveles globales de expresión de Pcdh alfa. En consecuencia, los autores de este trabajo postulan que Dnmt3b regularía la probabilidad de expresión de cada isoforma de Pcdh que se expresa de manera estocástica en neuronas individuales, pero no sería responsable por el nivel de expresión total de los genes pertenecientes al cluster alfa o gama.

Cuando observan células de Purkinje KO para Dnmt3b, su árbol dendrítico resulta anormal, con dendritas que se agrupan y se cruzan entre sí. De otros trabajos, saben que las Pcdh en cluster están involucradas en este proceso (Lefebvre et al. 2012) por lo que asumen que las deficiencias observadas son consecuencia del patrón aberrante de expresión de Pcdh.

La metilación por Dnmt3b también dependería de la estructura génica en el caso de las Pcdh alfa ya que, al evaluar células de animales en donde se eliminaron las variantes alfa 11 a c2, el promotor de alfa 10 aparece mayormente desmetilado y, en consecuencia, su expresión se vuelve constitutiva.

Finalmente, Toyoda et al proponen un modelo para la identificación neuronal en el que la metilación diferencial en los promotores de las Pcdh durante etapas tempranas del desarrollo embrionario regularía la probabilidad de expresión génica dependiente de enhancer de las distintas isoformas en neuronas individuales. Como las marcas epigenéticas pueden heredarse en la división celular, este mecanismo podría generar heterogeneidad epigenética de progenitores neuronales, conduciendo en la expresión preferencial de las mismas isoformas de Pcdh en neuronas hermanas. Suponen que, potencialmente, puede tratarse de un mecanismo para la especificación de la identidad neuronal basado en linaje celular.

+ El patrón de expresión de cada isoforma del cluster alfa está determinado por su ubicación en el cluster génico

Otro laboratorio encontró que la duplicación en tándem dentro del cluster alfa expande el repertorio de isoformas disponibles para expresión estocástica (Kaneko et al. 2014). Al generar un alelo mutante en el cual se duplican los exones variables desde alfa 2 hasta alfa c2 con sus promotores y se los inserta entre el exon para c2 y los exones constantes, se observa que las isoformas duplicadas mantienen la expresión estocástica en células individuales. Llamativamente, la isoforma c2 ubicada hacia 5' adquiere expresión estocástica aún cuando, como ya mencionamos, en el WT c2 tiene expresión constitutiva. Vieron además que el promotor del “nuevo exón de c2”, ubicado río arriba del exón c2 original, adquiere un patrón de metilación mosaico, coincidente con el de aquellas isoformas de expresión estocástica. Por lo que suponen que el patrón de

metilación dentro del cluster alfa es, al menos en parte, dependiente de la estructura génica (algo que también observaron en el trabajo de Toyoda et al 2014 que comentamos más arriba).

Al igual que ocurrió en el caso de células KO para Dnmt3b, donde se altera la expresión estocástica pero el nivel general de expresión de Pcdh en cluster se mantiene, en el caso de ratones que poseían alelos con la duplicación del cluster alfa el nivel general de expresión de los genes de Pcdh alfa se mantenía. Pero el de isoformas individuales se veía alterado: las isoformas duplicadas ubicadas hacia 5' tenían niveles de expresión significativamente más bajos que los de aquellas ubicadas hacia 3', a pesar de poseer promotores idénticos. La única excepción es c2 5' que, aún cuando adquiere expresión estocástica, conserva un nivel de expresión similar al del WT. Esto les sugiere que la duplicación génica y el arreglo del DNA resultante afectan la regulación de la expresión génica en el cluster alfa.

El modelo que proponen a partir de sus hallazgos es uno en donde la expresión estocástica de los genes de Pcdh duplicados es adquirida inmediatamente después de la duplicación en tándem, antes de que tenga lugar la divergencia de las secuencias.

+ En el establecimiento de las interacciones homofílicas colaboran isoformas de los tres clusters

En otro trabajo, se reportó que las 3 subfamilias de Pcdh en cluster pueden involucrarse en interacciones homofílicas altamente específicas (Thu et al. 2014). Lo que profundiza lo hallado en esta tesis y por otros grupos que ya hemos mencionado.

Por un lado, transfectaron la línea celular K562, sin adhesión basal y que no expresa Pcdh en cluster, con cada una de las 58 isoformas de Pcdh. Comprobaron que los clusters beta y gama y las isoformas c2, c3 y c5 promueven la agregación celular a través de interacciones homofílicas. No vieron que esto ocurriera para las Pcdh alfa 1 a 12, c1 y c4. Ya existía evidencia previa de que las isoformas de Pcdh alfa no eran correctamente enviadas a la membrana plasmática cuando se las expresa por si solas (Murata et al. 2004). Una vez que las coexpresan junto a otra isoforma (ya sea del cluster beta o gama), las Pcdh alfa llegan a la membrana y se produce agregación celular, en el caso de células que expresan las mismas variantes.

En nuestro caso, dado que las N2a expresan distintas Pcdhs, no creímos necesario sobreexpresar una segunda variante en la misma célula. Pero esto podría explicar las diferencias observadas en nuestros cultivos: c2 no necesita de otra variante para ser llevada a la membrana, por eso se acumula mejor en los contactos entre células. Mientras que, como es necesaria otra isoforma para el transporte de alfa 4 y alfa 8, el nivel de expresión de las Pcdh propias de la línea celular con la que trabajamos podría no ser suficiente para transportar toda la proteína sobreexpresada hacia la membrana.

En el mismo trabajo, corroboraron que las Pcdh en cluster no admiten reconocimiento heterofílico, aún entre variantes que presentan un 90% o más de identidad de secuencia en sus dominios EC2 y EC3, los responsables de la especificidad en el reconocimiento (Schreiner and Weiner 2010 lo vieron para las Pcdh gama). Así, dado que las Pcdh más relacionadas dentro de un mismo cluster fallan en reconocerse entre sí en interacciones heterofílicas, concluyen que es poco probable que tenga lugar reconocimiento alguno entre isoformas más distantes.

La agregación de células mediada por Pcdh en cluster depende de que se expresen las mismas variantes: la presencia de una sola isoforma no reconocida puede interferir con la coagregación (aún si es solo 1 de 5). Esto les sugiere a los autores que las Pcdh alfa beta y gama interactuarían en *cis* para crear nuevas “especificidades” para el reconocimiento homofílico en *trans*. En el proceso de distinción de lo “no propio” en el caso de neuronas, mediado por algún marcador de membrana que provea de identidad a la célula (por ejemplo, las Pcdh en cluster o Dscam1), es importante la *tolerancia de isoformas comunes*. Esta se define como el porcentaje máximo de isoformas en común que pueden tener 2 células en contacto sin reconocerse erróneamente como la misma célula. El trabajo de Thu et al muestra una tolerancia mucho mayor para las Pcdh que para Dscam1, lo que probablemente sea consecuencia de que el reconocimiento homofílico en el caso de las Pcdh sea mediado por multímeros, mientras que Dscam1 aparentemente actúa como monómero. Las isoformas no comunes entre dos células podrían interferir con el reconocimiento entre ellas al diluir el número de unidades de reconocimiento (multímeros de Pcdh) comunes entre ambas. Si bien esto explica como distinguir lo no propio, este modelo resulta insuficiente para explicar cómo dos neuritas provenientes de una misma célula pueden reconocerse entre sí.

En lo que mencionamos más arriba, encontramos alguna explicación de por qué pueden haber fallado nuestros ensayos de agregación: si bien la isoforma sobreexpresada era la misma en todas las células, las Pcdh propias de cada célula eran distintas y esto podría interferir con la agregación. Aunque no afectaría el reconocimiento homofílico mediado por la isoforma sobreexpresada (y por eso vemos su acumulación en la membrana plasmática).

Por último, son cautelosos y explican que, aunque el reconocimiento que involucra interacciones en cis y en trans acopladas se encuentra en el centro del mecanismo a través del cual las Pcdh establecerían la identidad neuronal, la naturaleza de las unidades de reconocimiento de Pcdh así como el mecanismo de sus interacciones son aún desconocidos.

+ Las Pcdh alfa participan de la correcta formación de terminales en neuronas del sistema visual

Ya existía evidencia de que el déficit en la expresión de Pcdh alfa traía aparejado patrones de proyección anormales de los axones de las neuronas olfatorias hacia los glomérulos del bulbo olfatorio en ratón (Hasegawa et al. 2008). También, se había observado agregación anormal de axones serotogénicos en ratones KO para estas Pcdh (Katori et al. 2009).

Meguro et al. evaluaron qué ocurría en estos ratones en los cuales se eliminó la región constante de las Pcdh alfa (y, por lo tanto, se abolió su expresión) en neuronas del sistema visual. Estas proteínas se expresan en las fibras del nervio óptico, el núcleo geniculado lateral y la corteza visual primaria por dos semanas luego del nacimiento. Este período, antes de la apertura de los ojos, resulta de gran importancia para la segregación y maduración de distintos componentes del sistema visual. Encontraron que en ratones que no expresan las Pcdh alfa, se producen agregados aberrantes de terminales de estas neuronas, principalmente en el núcleo geniculado lateral dorsal, aunque no parece haber efectos sobre la morfología de la corteza visual primaria. La agregación de terminales no es evidente 10 días luego del nacimiento de los ratones KO, sino que aparece justo antes de la apertura de los ojos, el día 14. Entre estos días tiene lugar el proceso de refinamiento de las conexiones nerviosas en el sistema visual donde

muchas terminales presentes en exceso deben ser eliminadas. En la adultez, los ratones KO para Pcdh alfa mostraron una agudeza visual deteriorada, probablemente consecuencia de lo mencionado antes.

Estos hallazgos, junto con los datos ya existentes, sugieren que las Pcdh alfa serían importantes para el desarrollo normal de patrones de proyección axonal derivados de tipos **específicos** de neuronas o sinapsis, por más que se expresen en la mayoría de las neuronas (Meguro et al. 2015).

Finalmente, en un comentario que fue publicado en marzo de 2015, Hayashi y Takeichi mencionan que no es común considerar como factores de repulsión a proteínas con capacidad de promover adhesión. Las Pcdh en cluster son importantes para la auto-repulsión de neuritas aunque, en ciertas condiciones experimentales, promueven agregación celular. Ellos razonan que es muy probable que las interacciones homofílicas entre Pcdh, a través de sus dominios extracelulares, sean requisito para producir luego señales citoplasmáticas de repulsión. La agregación observada por tantos investigadores puede estar dada por esta interacción inicial de reconocimiento que promueve la unión mecánica de membranas celulares opuestas. Aún es necesario profundizar en la investigación de los factores citoplasmáticos que interactúan con las Pcdh en cluster para lograr responder a esta paradoja y entender los mecanismos a través de los cuales las Pcdh controlan la formación del correcto patrón de las neuritas en el sistema nervioso de los vertebrados.

La función de las Pcdh en cluster aún es desconocida pero a medida que podamos comprender más sobre lo que gobierna su expresión y procesamiento en distintos momentos del desarrollo neuronal, estaremos más cerca de comprender por qué se ha conservado tal diversidad en esta familia de proteínas en distintas especies.

Materiales y Métodos

1. Cultivo de líneas Celulares

Neuro-2a (ATCC® CCL-131; Células derivadas a partir de un neuroblastoma de ratón): fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) alta glucosa con piruvato (Life technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L- glutamina 2 mM (Sigma), y una solución de penicilina y estreptomicina (Life technologies), a 37°C y 5% de CO₂.

HEK 293T (ATCC® CRL-11268™; Células embrionarias humanas de hígado, “human embryonic kidney”, inmortalizadas con el antígeno T): fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) alta glucosa con piruvato (Life technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L- glutamina 2 mM (Sigma), y una solución de penicilina y estreptomicina (Life technologies), a 37°C y 5% de CO₂.

CHO K1 (ATCC® CRL-9618™; Células epiteliales de ovario de hámster chino): fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) alta glucosa (Life technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L- glutamina 2 mM (Sigma), y una solución de penicilina y estreptomicina (Life technologies), a 37°C y 5% de CO₂.

2. Transfecciones

En todos los casos, al momento de la transfección, las células deben encontrarse aproximadamente en un 60% de confluencia.

Seguimos el protocolo del fabricante tanto para las transfecciones realizadas con *PEI* (CELLnTEC) como para aquellas hechas con *lipofectamina* o *lipofectamina 2000* (Life technologies).

3. Plásmidos y construcciones

Usamos el plásmido pEGFP-N2 (Clontech) para generar proteínas con la proteína fluorescente verde en su extremo carboxilo terminal. Para las construcciones con c-myc

en su amino terminal, tomamos las versiones ya clonadas de las distintas Pcdh e insertamos la secuencia de c-myc río abajo del péptido señal de cada una.

Para las construcciones con HA en su carboxilo terminal, usamos el plásmido pEGFPN2 y lo modificamos. Primero, cortamos el plásmido con las enzimas XmaI y NotI para extraer la porción que codifica para GFP. Lo religamos e insertamos entre los sitios KpnI y ApaI un oligo que contiene la secuencia para HA, además de las secuencias de enzimas de restricción mencionadas (ver figura M1a).

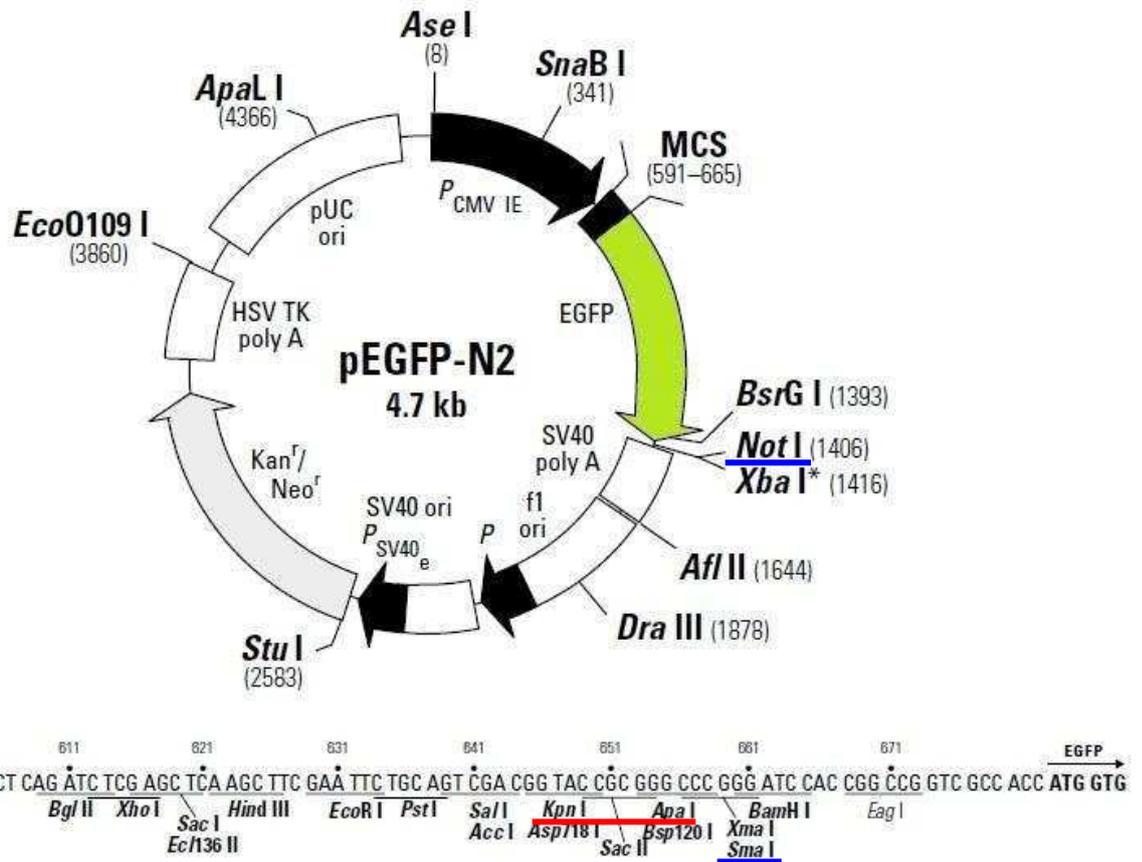
En la figura M1b mostramos un esquema de las construcciones que diseñamos para el estudio de las Pcdh en cluster.

A continuación, detallamos los aminoácidos incluidos en cada construcción, así como el código de secuencia de referencia del NCBI que utilizamos:

Construcción	Aminoácidos que incluye
alfa 4 FL	del 1 al 963 de alfa 4
alfa 8 FL	del 1 al 962 de alfa 8
c2 FL	del 1 al 1022 de c2
Ecad FL	del 1 al 898 de Ecad
alfa 4 Ecyt	del 1 al 722 de alfa 4 y del 564 al 711 de Ecad
alfa 8 Ecyt	del 1 al 722 de alfa 8 y del 564 al 711 de Ecad
c2 Ecyt	del 1 al 730 de alfa 4 y del 564 al 711 de Ecad
alfa 4 v	del 1 al 737 de alfa 4 (incluye 16 aminoácidos del dominio citoplasmático de la región variable)
c2 v	del 1 al 752 de c2 (incluye 24 aminoácidos del dominio citoplasmático de la región variable)

Secuencia	Número de secuencia de referencia de NCBI
Pcdh alfa 4	NP_001167625.1
Pcdh alfa 8	NP_957695.1
Pcdh c2	NP_001003672.1
Ecad	NP_033994.1

a)



b)



Figura M1: a) Representación esquemática del plásmido pEGFP-N2. MCS: sitio múltiple de clonación, abajo se detalla su secuencia con los sitios de corte para enzimas de restricción que contiene. En verde, GFP. Subrayado en azul, sitios que utilizamos para remover GFP. Subrayado en rojo, sitios en los que insertamos la secuencia para HA. b) Construcciones generadas para el estudio de las Pcdh alfa. SP: péptido señal de Pcdh (celeste) o de Ecad (amarillo); EC1-6: dominios extracelulares de Pcdh (azul) o de Ecad (naranja); TM: dominio transmembrana de Pcdh (azul) o de Ecad (naranja oscuro); ECADcyt: dominio citoplasmático de Ecad; PCDHcyt: dominio citoplasmático de Pcdh alfa; GFP: proteína fluorescente verde; HA y myc: tags. Pcdh (Ecyt, FL o v) GFP fue clonado en el vector pEGFPN2, bajo el promotor de CMV. Pcdh Ecyt HA fue clonado en un vector pEGFPN2 modificado según se describe en el texto (pΔEGFPN2).

Los nombres de las secuencias clonadas, junto con los primers utilizados para generarlas por reacción en cadena de la polimerasa (ver en el punto 4), figuran en la siguiente tabla:

Secuencia clonada	Primer Forward	Primer Reverso	Enzimas de restricción para el clonado	Secuencia amplificada
alfa4FL	ACTCGAGGCACTGTGCACTTGAAA	AGGTCGACACTGGTCACTGTTGT	XhoI/SalI	Entre -16 y +2850 de la secuencia de Pcdh alfa4
alfa8FL	ACTCGAGCCAAGCTCCTGAGATGC	AGGTCGACACTGGTCACTGTTGT	XhoI/SalI	Entre -13 y +2839 de la secuencia de Pcdh alfa8
c2FL	AAGCTAGCGGAGCAGGCTGCCAAG	AGGTCGACACTGGTCACTGTTGT	NheI/SalI	Entre -64 y +3019 de la secuencia de Pcdh c2
EcadFL	TATGCTAGCGGGTCCGCCATGG	ATGGTACCAGTCGTCTCGCCAC	NheI/KpnI	Entre -9 y +2652 de la secuencia de Ecad
alfa4V	ACTCGAGGCACTGTGCACTTGAAA	ATAAGCTTCGCAGCGCTGTGTACAG	NheI/HindIII	Entre -16 y +2165 de la secuencia de Pcdh alfa4
alfa8V	ACTCGAGCCAAGCTCCTGAGATGC	ATCTCGAGCGCAGCGCTGTGTACAG	XhoI/XhoI	Entre -13 y +2165 de la secuencia de Pcdh alfa8
c2V	AAGCTAGCGGAGCAGGCTGCCAAG	CAGAATTCGCACTTAATGATGCTC	NheI/EcoRI	Entre -64 y +2190 de la secuencia de Pcdh c2
alfa4 EcoRV	CGGTGGGAGGTCTATATAAGCA	ATGATATCGTGGATCTGGCTGTTCC	XhoI/EcoRV (para insertar sitio EcoRV después del SP de alfa4)	Entre -49 de pEGFPN2 (respecto del sitio NheI) con alfa4FL clonado hasta +97 de alfa4
alfa8 HindIII	CGGTGGGAGGTCTATATAAGCA	ATAAGCTTGTGGAGCTGGCCGCTCC	XhoI /HindIII (para insertar sitio HindIII después del SP de alfa8)	Entre -49 de pEGFPN2 (respecto del sitio NheI) con alfa4FL clonado hasta +97 de alfa8
c2 PvuI	CGGTGGGAGGTCTATATAAGCA	ATCGATCGTCGTAGCTGGGAGGCCGC	NheI/PvuI (para insertar sitio PvuI después del SP de c2)	Entre -49 de pEGFPN2 (respecto del sitio NheI) con alfa4FL clonado hasta +132 de c2
Myc alfa4	ATGATATCGAACAAAACTCATCTCAG AAGAGGATCTGTACTCCATCCCTGAGGAG	TTTGAATTCCAATTCTGGAACA	EcoRV/EcoRV (para insertar c-myc después del SP)	Entre +97 y +1059 de alfa4, incluye secuencia de c-myc
Myc alfa8	ATAAGCTTGAACAAAACTCATCTCAG AAGAGGATCTGTACTCTATCCCCGAGGAG	GTCCAGATCCAAGCAACAT	HindIII/HindIII (para insertar c-myc después del SP)	Entre +97 y +1709 de alfa8, incluye secuencia de c-myc
Myc c2	ATCGATCGGAACAAAACTCATCTCAG AAGAGGATCTGTACTCCGTGCCGAGGAG	AGAGCTGTCTCTCCCGGTCT	PvuI/PvuI (para insertar c-myc después del SP)	Entre +133 y +919 de c2, incluye secuencia de c-myc
Ecyt	GGAATTCACGGTGGTCAAAGAGCC	ATGAATTCGTCTCCTCGCCAC	EcoRI/EcoRI (para insertar c-myc después del SP)	Entre +2209 y +2652 de la secuencia de Ecad

FL: proteína completa o *full length*; V: región variable de una Pcdh; Ecyt: dominio citoplasmático de Ecad; SP: péptido señal o *signal peptide*..

4. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR

- Para clonar las secuencias de *Pcdh*:

Realizamos la reacción de PCR utilizando 1U de *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Life Technologies) en 50 µl de reacción, que contiene buffer de reacción, 1.5 mM de MgSO₄, 0,2 mM de dNTPs y 200 pM de cada primer.

Como molde, usamos ADN copia (ADNc) sintetizado por nosotros a partir de muestras de distintos tejidos de ratones C57BL/6J, o cromosomas artificiales de bacteria (BAC) que poseen un inserto de ADN genómico de ratón C57BL/6J el cual abarca una cierta porción del cluster alfa. Los BACs fueron obtenidos de la biblioteca de BACs del *Children's Hospital Oakland Research Institute* (bacpac.chori.org). Elegimos usar BACs siempre que nos fue posible ya que representan una fuente confiable a partir de la cual podíamos clonar los genes que nos interesaban de manera fiel y más eficiente que con ADNc.

En la siguiente tabla mostramos el molde utilizado según la secuencia que deseábamos clonar:

Secuencia a clonar	Molde	Volumen para PCR
alfa4	ADNc de cerebro de ratón	2 µl
alfa8	BAC RP23-6P18*	1 µl
c2	BAC RP23-6P18*	1 µl
Ecad	ADNc de hígado de ratón	2 µl

* RP23-6P18 abarca desde 4 kb río arriba de la secuencia para *Pcdh* alfa 4 hasta 8 kb río abajo del segundo exón alfa constante.

Las condiciones de ciclado térmico, en forma general, fueron las siguientes:

Desnaturalización	94°C	2'	25-27-28-30 ciclos**
Desnaturalización	94°C	15"	
<i>Annealing</i> o apareado	58-60-62°C*	2'	
Extensión	72°C	1'30"	
Extensión adicional	72°C	7'	

*la temperatura de apareado depende del par de primers utilizado

**obtuvimos productos de PCR con distinto número de ciclos para usar aquellos que tuvieran un buen nivel de amplificación con el menor número de ciclos posible, y así evitar la aparición de mutaciones en la secuencia.

Para controlar el producto de PCR obtenido, lo sembramos junto a un marcador de peso molecular, el *1 Kb plus Ladder* (Life Technologies), en un gel de agarosa 1.2 % en buffer TAE 1X + 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Visualizamos los gels con luz ultravioleta (UV) y los fotografiamos.

TAE 50X: 242 g Tris base, 57.1 ml acético glacial, 100 ml 0.5 M EDTA, pH 8, llevar a volumen final de 1 litro.

- Para analizar colonias de bacterias *E. coli* transformadas (colony PCR):

Realizamos la reacción de PCR utilizando 1.5 U de *Taq DNA polymerase* (Life Technologies) en 50 µl de reacción, que contiene buffer de reacción 10 X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs y 200 pM de cada primer. Como molde, picamos una colonia con un escarbadietes estéril y lo sumergimos en la mezcla de reacción.

Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes:

Desnaturalización	94°C	2'	35 ciclos
Desnaturalización	92°C	15"	
Annealing o apareado	58°C	15"	
Extensión	72°C	1'30"	
Extensión adicional	72°C	5'	

Sembramos el producto de PCR obtenido en un gel de agarosa como describimos más arriba. Analizamos el tamaño del producto obtenido para ver si coincidía con lo esperado comparando contra el marcador de peso molecular.

5. Clonado de productos de PCR

Clonamos los productos de PCR deseados en el vector pCR4-TOPO o pCR2.1-TOPO de "TOPO TA cloning kit" (Life Technologies). Dependiendo de la intensidad del producto amplificado, usamos entre 0.5 y 4 µl del mismo para la ligación en los vectores TOPO. Es importante que el producto de PCR sea *fresco*. Seguimos la siguiente tabla para armar la reacción:

Para transformar por electroporación	Para transformar por shock térmico	Volumen (µl)
Producto de PCR fresco	Producto de PCR fresco	0.5 - 4
Solución salina diluída 1:4	Solución salina	1
Agua miliQ autoclavada	Agua miliQ autoclavada	csp* 6
Vector TOPO	Vector TOPO	0.25
Volumen final	Volumen final	6

*csp: "cantidad suficiente para"

Incubamos por 30' a temperatura ambiente. Luego, usamos 2 µl de la reacción para transformar 50 µl de bacterias competentes (ya fuera por electroporación o por shock térmico, ver *Transformación bacteriana* en el punto 10)

Las colonias obtenidas fueron analizadas por PCR (*colony PCR*, ver más arriba) para hallar las que incorporaron el fragmento deseado. Por último, hicimos secuenciar aquellos de interés para chequear que las secuencias clonadas no poseían mutaciones (ver *Secuenciación* en el punto 14).

6. Digestión por enzimas de restricción

- *Para obtención de vectores e insertos para ligar*

Para las reacciones de digestión, utilizamos 10 U de la/s enzima/s de digestión que correspondiera por μg de ADN y seguimos las indicaciones del proveedor para las condiciones de la reacción (buffer, temperatura y tiempo). Utilizamos enzimas de NEB, Life Technologies y Promega, según estuvieran disponibles en el laboratorio. Si era posible, inactivamos las enzimas por calor luego de finalizada la reacción (20 minutos a 65°C).

Luego, realizamos electroforesis en geles de agarosa 1.2 % en buffer TAE + 0.5 $\mu\text{g/ml}$ bromuro de etidio. Observamos las bandas obtenidas por digestión mediante exposición a luz UV y purificamos los fragmentos deseados con el *QIAquick Gel Extraction kit* (Qiagen, ver en el punto 7).

- *Para chequeo de plásmidos*

La identidad de todos los plásmidos de esta tesis fue chequeada mediante mapeos por enzimas de restricción para asegurar la utilización de los plásmidos correctos (antes de enviarlos a secuenciar).

Para ello, el ADN plasmídico fue sometido a digestión por enzimas de restricción siguiendo las indicaciones del proveedor de las mismas. Luego de la electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio, observamos las bandas obtenidas por digestión mediante exposición a luz UV y comparamos el patrón obtenido con el esperado. Este último, fue calculado usando el programa *Serial Cloner*.

7. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction kit* (Qiagen). Los fragmentos de ADN a purificar se separaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1X con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio. La banda correspondiente al fragmento de interés se cortó bajo luz UV, y se siguieron las instrucciones del fabricante. El mismo kit se utilizó para

purificar fragmentos provenientes de reacciones de amplificación por PCR y de reacciones enzimáticas.

8. Cuantificación de ADN

Una vez disuelto en agua, cuantificamos el ADN (ya fuera como plásmido o fragmentos lineales obtenidos luego de digerir con enzimas de restricción) por alguno de los siguientes métodos:

- Absorbancia de la solución a 260 nm en un espectofotómetro GeneQuant (GE) o Nanodrop2000 (Thermo Scientific).
- Por electroforesis de las muestras (sólo para fragmentos lineales de ADN) en gel de agarosa, comparando las intensidades observadas bajo luz UV con las intensidades dadas por el marcador de peso molecular *High Mass DNA Ladder* (Life Technologies).

9. Ligación

Si el vector para clonado fue digerido con una única enzima de restricción, antes de la reacción de ligación, lo tratamos con la enzima SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*, USB) con el objetivo de evitar el religado del mismo sin inserto. Usamos 1 U de SAP por cada 100 pmol de extremos 5' (para calcular los pmol de extremos, usamos una herramienta de Promega disponible en el siguiente enlace: <http://www.promega.com/a/apps/biomath/index.html?calc=pmolends>) Incubamos la reacción por 30 minutos a 37°C e inactivamos la enzima por 15 minutos a 65°C.

Para la ligación, utilizamos relaciones inserto:vector de 0.5:1, 1:1 y 3:1. Una reacción típica lleva 100 ng de vector. Para calcular la cantidad necesaria de inserto según las relaciones que mencionamos, usamos otra herramienta de Promega disponible en: <http://www.promega.com/a/apps/biomath/index.html?calc=ratio>.

Las reacciones de ligación tuvieron un volumen final de 20 µl con 1 U de la ADN ligasa del fago T4 (Promega), buffer de reacción específico y ATP 1 mM. Incubamos la reacción a 15°C durante toda la noche. Incluimos los controles de ligación necesarios.

A continuación, transformamos bacterias competentes con 5 µl de la reacción de ligación (ver *Transformación bacteriana* en el punto 10). Plaqueamos 200 µl del medio con bacterias transformadas en placas de LB/agar con el antibiótico correspondiente y permitimos el crecimiento bacteriano durante una noche en una estufa a 37°C. En aquellos casos donde la eficiencia de ligación fue muy baja, concentramos las bacterias transformadas centrifugándolas

(5 minutos a 1500rpm) y, luego de resuspenderlas en un volumen de medio menor, las plaqueamos.

10. Transformación bacteriana

- *Shock térmico*

Descongelamos en hielo 50µl de bacterias competentes DH5alfa (eficiencia de al menos 10^7 colonias/µg ADN). Les agregamos 5 µl de reacción de ligación o 50 pg de ADN plasmídico e incubamos 30 minutos en hielo. Luego, aplicamos un shock térmico (calentar a 42°C por estrictamente 90 segundos) e, inmediatamente después, las colocamos en hielo. Agregamos 1ml de medio LB sin antibiótico y recuperamos durante 45-60 minutos a 37°C. Finalmente, plaqueamos 100 o 200 µl de medio con bacterias en placas de LB agar con el antibiótico correspondiente según el vector utilizado. En el caso de transformar reacciones de ligación, procedimos como se describió más arriba.

Medios utilizados:

LB: 0.5% extracto de levadura, 1% bacto-triptona, 1% NaCl

LB agar: LB + 1.5% bacto-agar

LB/ampicilina: 100 µg/ml (tanto en medio sólido como líquido)

LB/kanamicina: 50 µg/ml (tanto en medio sólido como líquido)

- *Electroporación*

Previamente, colocamos en hielo las cubetas de electroporación (*GenePulser/MicroPulser Cuvettes* con separación de 0.2 cm, BIO-RAD).

Para mezclar las bacterias con el ADN, procedemos igual que en el caso de shock térmico pero con bacterias electrocompetentes. Luego, colocamos dentro de la cubeta de electroporación la suspensión de bacterias + ADN, cuidando que no queden burbujas dentro de la misma, y damos un pulso eléctrico con el electroporador *MicroPulser* (#165-2100, BIO-RAD). Rápidamente, agregamos 1 ml de medio SOC sin antibiótico dentro de la cubeta y resuspendemos con cuidado las bacterias. Las transferimos a un tubo eppendorf y las incubamos durante 45-60 minutos a 37°C. Para el plaqueo, procedemos de igual manera que lo descripto más arriba.

Medios utilizados:

LB y LB agar, con y sin antibiótico: ver más arriba.

SOB: 2% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.05% NaCl.

SOC: SOB + Glucosa 20 mM.

11. Preparación de bacterias competentes

- *Bacterias electrocompetentes*

Partimos de una estría de *E.coli* fresca en una placa de LB agar y la incubamos ON a 37°C. Inoculamos 5 ml de LB con una colonia de esa placa y lo colocamos ON en un *shaker* a 37°C y 180 rpm. Con 2 ml de ese cultivo inoculamos 1 L de medio 2XYT (1% extracto de levadura, 1.6% bacto-triptona, 0.5% NaCl, pH 7) y lo incubamos a 37°C con agitación (180rpm) hasta que la densidad óptica a 600nm llegue a 0,5-0,6 (aproximadamente 4 hs). Enfriamos el cultivo en hielo por 5-10 minutos y cosechamos las bacterias centrifugando a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Lavamos y resuspendemos cuidadosamente las bacterias en 500 ml de glicerol 10% estéril y frío. Incubamos las bacterias resuspendidas por 30 minutos en hielo. Centrifugamos y repetimos el lavado 2 veces. Finalmente, resuspendemos en 10ml de glicerol 10% frío y preparamos alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf. Los congelamos inmediatamente en nitrógeno líquido y guardamos a -80°C hasta el momento de uso.

- *Bacterias competentes químicas*

Usamos bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5alfa como fuente de bacterias competentes. Seguimos el protocolo INOUE.

Al terminar, resuspendemos las bacterias en 20 ml de la solución Inoue. Agregamos 1.5 ml de DMSO. Alicuotamos y congelamos como se describió para las bacterias electrocompetentes.

12. Preparación de plásmidos en pequeña escala (miniprep)

Inoculamos tubos conteniendo 3ml de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente, con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés. Incubamos los cultivos aproximadamente por 18 hs a 37°C y 180 rpm. Seguimos un protocolo típico para minipreps.

Brevemente: centrifugamos los cultivos a 12000 rpm durante 1 minuto. Resuspendemos el pellet bacteriano en 100 µl de solución P1 (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; EDTA 10 mM) conteniendo RNAsa A (50 µg/ml). Luego, agregamos 200 µl de solución P2 (NaOH 0.2 N; SDS 1%), mezclamos por inversión e incubamos por no más de 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, agregamos 150 µl de solución P3 (KAcO 3 M, pH 5.2) fría y mezclamos por inversión inmediatamente. Centrifugamos a 12000 rpm durante 10 minutos. Pasamos el sobrenadante a un tubo nuevo y lavamos con 400 µl de una solución de PIC (fenol:cloroformo:isoamílico, 25:24:1) para retirar proteínas y ADN genómico. Tomamos la fase acuosa (superior) y le agregamos 900 µl de etanol absoluto frío. Dejamos a -20°C durante 20-30 minutos. Centrifugamos a 12000 rpm durante 15 minutos y descartamos el sobrenadante. Lavamos el pellet con 500 µl de etanol 70% para eliminar el remanente de sales. Dejamos secar el pellet a temperatura ambiente y resuspendemos en 50 µl de agua miliQ estéril.

13. Preparación de plásmidos en gran escala (maxiprep)

Para las maxipreps, usamos columnas de afinidad *tip500* (QIAGEN). Este protocolo está basado en un procedimiento de lisis alcalina modificado, seguido de una purificación de ADN plasmídico por medio de una columna de intercambio iónico. Seguimos el protocolo del fabricante.

Verificamos la calidad del ADN plasmídico obtenido mediante un gel de agarosa con bromuro de etidio y determinamos su concentración final por espectrofotometría.

14. Secuenciación

Chequeamos todos los ADNcs clonados y las secuencias subclonadas a través del servicio de secuenciación de Macrogen, Corea (<http://www.macrogen.com>).

15. Preparación de ADN copia o ADNc

Extrajimos ARN a partir de tejidos (cerebro o hígado de ratones C57/BL6) con TRIreagent (Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo del fabricante. Medimos la concentración del ARN obtenido por absorbancia a 260nm.

Para la síntesis de ADNc, preparamos una mezcla reacción que contiene 5µg totales del ARN extraído y random decámeros 5 µM (oligos de 10 bases de longitud de secuencia aleatoria). Desnaturalizamos a 70°C por 10 minutos y, luego, incubamos a 0°C por 2 min. A continuación, añadimos 4µl del buffer de reacción 5X, 1µl de DTT 0.1M, 1µl de

dNTPs 10mM y 40U de RNaseOUT (Life Technologies). Incubamos los tubos a temperatura ambiente por 10 minutos, luego a 50°C por 2 minutos y, cumplido este tiempo, rápidamente agregamos a la reacción 200U de Superscript III (Life Technologies). Continuamos con la incubación de los tubos a 50°C por 50 minutos más. Por último, inactivamos la enzima colocando los tubos a 70°C por 15 minutos.

16. Western Blot

a) Preparación de extractos celulares

Lavamos las células con PBS 1X frío. Agregamos 100 µl de buffer RIPA con *protease inhibitor cocktail* (Roche) para placas de 3.5 cm o 500 µl para placas de 10 cm (RIPA: 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 140 mM NaCl). Incubamos las placas por 15 minutos en hielo y las guardamos *overnight* a -80°C.

Levantamos los lisados celulares con un rastrillo plástico o *scraper*. Los pasamos a tubos eppendorf y sonicamos por 30 segundos a alta intensidad mediante un Bioruptor (Diagenode). Centrifugamos por 10 minutos a 10000 rpm y 4°C y separamos el sobrenadante. Usamos 40 µl de cada extracto para el ensayo de Western Blot.

Agregamos 10 µl de buffer Laemmli 5X (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol) por tubo y hervimos las muestras por 5 minutos. Pasamos rápido los tubos a hielo y los mantenemos en el mismo hasta sembrar el gel.

b) Cuantificación de proteína total en extractos celulares

Determinamos la concentración de proteínas a través de un ensayo colorimétrico (método de Bradford). Seguimos el protocolo del fabricante del reactivo concentrado (Bio-Rad). En la misma placa, realizamos una curva estándar de BSA abarcando concentraciones entre 0.5-10 µg/µl y medimos la absorbancia a 595 nm. Elaboramos una curva estándar relacionando la absorbancia de las muestras de BSA con la concentración de cada una y, a partir de la misma, interpolamos la absorbancia obtenida con cada una de las muestras para hallar su concentración. Sembramos diluciones 1:5 o 1:10 de las muestras para asegurarnos que su concentración se encuentre dentro del rango de resolución del ensayo.

c) Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (desnaturalizante)

Preparamos geles de poliacrilamida al 10% de 1.5 mm de espesor. Luego de sembrar las muestras, llevamos a cabo la corrida electroforética en una cuba de electroforesis (mini ProteanIII, Bio-Rad). Primero, corrimos las muestras a 100 V por 30 minutos hasta que estas ingresen en el gel separador. Luego, subimos el voltaje a 200 V y proseguimos hasta que el marcador de frente cae del gel (aproximadamente 45-50 minutos). El gel está inmerso en buffer de corrida (Buffer de corrida 5X: 15.1 g Tris; 94 g glicina; 50 ml de 10% SDS).

Preparación de geles:

Gel separador 10%: 4 ml de agua destilada, 2.5 ml de buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.6, 3.3 ml de acrilamida 30%/ bisacrilamida 0.8%; 10 µl de TEMED, 100 µl de SDS 10% y 100 µl de persulfato de amonio 10%.

Gel concentrador: 3 ml de agua destilada, 1.25 ml de buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.65 ml de acrilamida 30%/ bisacrilamida 0.8%, 10 µl de TEMED, 50 µl de SDS 10% y 50µl de persulfato de amonio 10%.

Como referencia, utilizamos un marcador de peso molecular de proteínas: *Pageruler pre-stained Protein Marker* (Fermentas).

d) Transferencia de proteínas a una membrana de PVDF o de nitrocelulosa

Transferimos las proteínas separadas por electroforesis a membranas de PDVF (GE) o de nitrocelulosa (Pierce), mediante un equipo Mini trans blot (Bio-Rad), en buffer de transferencia (1X Tris-glicina, 20% metanol; Tris-glicina 10X: 30.3 g Tris base, 144.1 g glicina, llevar a 1 L con agua destilada) a una corriente de 100 V por 80 minutos y en frío. Bloqueamos la membrana por 1 hs con 5% leche descremada en TTBS (1XTBS + 0.05 % Tween-20; TBS1X: Tris 20mM pH=7.5, NaCl 9g/litro) o TBS solo, según la membrana sea de PDVF o de nitrocelulosa respectivamente. Preparamos una dilución del anticuerpo primario a la concentración óptima (ver Tabla 1) e incubamos la membrana por 1 hs a temperatura ambiente u ON a 4°C. Lavamos 3 veces con TTBS por 15 minutos, con agitación suave. Incubamos con la dilución óptima del anticuerpo secundario (ver Tabla 2) por 1 hs a temperatura ambiente. Realizamos 3 lavados con TTBS de 10 minutos cada uno y un lavado con TBS solo, para eliminar exceso del segundo anticuerpo y restos de detergente. Revelamos la membrana por

quimioluminiscencia, si el anticuerpo secundario está acoplado a la enzima HRP (*horse-radish peroxidase* o peroxidasa de rábano picante), o por fluorescencia mediante el escáner Odyssey (LI-COR), si el anticuerpo secundario está acoplado a un fluoróforo.

Anticuerpo primario	Especie	Concentración (mg/ml)	Dilución óptima	Empresa	Nro. catálogo
Anti-GFP	ratón	No disponible	1:2000	Sigma	G6539
Anti-actina	conejo	0,1	1:1000	Santa Cruz	Sc-130656
Anti-Myc	conejo	1	1:2000	abCam	ab9106
Anti-V5	ratón	1,3	1:5000	Invitrogen	R960-25

Tabla 1: anticuerpos primarios utilizados en este trabajo

Anticuerpo secundario	Especie	Dilución óptima	Revelado	Empresa	Nro. catálogo
Anti-ratón HRP	cabra	1:10000	quimioluminiscencia	Santa Cruz	Sc-2005
Anti-conejo HRP	cabra	1:10000	quimioluminiscencia	Santa Cruz	Sc-2004
Anti-conejo alexa680	cabra	1:15000	Odyssey	LI-COR	926-68071
Anti-ratón alexa800	cabra	1:15000	Odyssey	LI-COR	926-32210

Tabla 2: anticuerpos primarios utilizados en este trabajo

e) Revelado de membrana por quimioluminiscencia

La HRP acoplada al anticuerpo secundario reacciona con el reactivo ECL (*Enhanced chemoluminescence*, Millipore) para dar quimioluminiscencia que podemos detectar con un dispositivo especial (FUJI phosphorimager) o mediante la exposición sobre placas fotosensibles. Allí donde detectamos señal lumínica corresponde a la localización de la/s proteína/s de interés.

f) Revelado por Odyssey

Si el anticuerpo secundario está acoplado a un fluoróforo que absorbe en el infrarrojo, escaneamos la membrana con el equipo Odyssey CLx (LI-COR). Donde registra señal de emisión los fluoróforos corresponde a la localización de la/s proteína/s de interés.

17. Tinción de gel con Coomassie

Para controlar la presencia de proteínas luego de la electroforesis, teñimos el gel de poliacrilamida con una solución de azul de Coomassie 0.25% (0.25 g de coomassie brilliant blue en 100 ml de solución de desteñido: H₂O destilada, metanol y ácido acético en proporción 50:40:10). Incubamos por 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave. Desteñimos entre 6hs y ON con la solución de desteñido, cambiando la misma a intervalos regulares.

Secamos el gel sobre papel Whatman (GE), por 2hs a 80°C con vacío, usando una secadora de geles (BIO-RAD).

18. Visualización de proteínas fluorescentes

Para visualizar las construcciones que poseen GFP en su extremo C-terminal, utilizamos células que expresan las mismas de manera transitoria o en forma estable.

En el caso de usar un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS IX-81), plaqueamos las células sobre cubreobjetos. Luego, las lavamos 2 veces con PBS 1X frío y las fijamos con paraformaldehído (PFA) 2% en PBS 1X por 30 minutos a 4°C. Lavamos 3 veces con PBS 1X frío y montamos en portaobjetos con una solución de glicerol 50% en PBS. Observamos en el microscopio con un objetivo 60X de inmersión en aceite (Olympus UplanSapo 63X, NA = 1.35) y capturamos imágenes de los preparados a través de una cámara acoplada al mismo, con el software Metamorph. Por cada preparado registramos un mínimo de 5 campos al azar.

Cuando usamos un microscopio confocal (Olympus FV300), fijamos las células directamente en la placa donde se las creció de la misma manera que mencionamos antes. Mantuvimos las células en PBS 1X y observamos usando un objetivo de aumento 20X o 60X de inmersión en agua. Registramos un mínimo de 5 campos al azar por cultivo.

19. Cuantificación de acumulación de proteína fluorescente en membranas

a) Para células transfectadas en forma transitoria

Calculamos la proporción de contactos entre células con acumulación de proteína fluorescente dividiendo el número de contactos que presentan acumulación de GFP por el total de contactos entre células transfectadas que vemos en el campo analizado (descartamos los contactos entre células no transfectadas).

b) Para células transfectadas en forma estable

Calculamos la proporción de contactos entre células con acumulación de proteína fluorescente dividiendo el número de contactos que presentan acumulación de GFP por el total de contactos entre células que vemos en el campo analizado (asumimos que, tratándose de una línea de expresión estable, todas las células expresan la proteína fluorescente).

20. Acumulación de Pcdh alfa a distintos tiempos post-plaqueo en presencia/ausencia de Ca²⁺

Seguimos el siguiente protocolo con células transfectadas en forma transitoria (24hs post-transfección) con proteínas marcadas con GFP en su extremo C-terminal o que las expresan en forma estable.

Lavamos las monocapas 2 veces con PBS 1X y las levantamos con 1ml de tripsina TrypLE Express (Life Technologies) incubando por 1 minuto a 37°C. Frenamos la tripsina con 4ml de medio completo (DMEM alta glucosa con piruvato + 10% SFB + antibióticos) y disgregamos las células pasándolas por una pipeta con un tip azul en su extremo. Hacemos un recuento de células con cámara de Neubauer. Preparamos 2 placas de 3.5 cm por cada tiempo a analizar. Para observar a las 3 hs, sembramos 10^6 células por placa; para 24 hs, $7 \cdot 10^5$ células y para 48 hs, $5 \cdot 10^5$ células. Esto dará aproximadamente la misma densidad celular en todas las placas en el momento de la observación. Una vez sembradas, colocamos las placas en estufa a 37°C con gaseo hasta que se cumpla el tiempo correspondiente.

En cada tiempo (3, 24 y 48 hs), tomamos un juego de placas y cambiamos el medio en ambas: en una colocamos 2 ml de medio completo y en la otra, 2 ml de medio completo + 5 mM EGTA. Incubamos por 30 minutos en estufa con gaseo. Lavamos y fijamos las células para ver con microscopio confocal (como describimos en el punto 18) o preparamos el extracto celular para realizar western blot (ver punto 16).

21. Efecto de Brefeldin A (BFA) en la localización de las Pcdh alfa

Stock BFA: 5 mg/ml (1000X), en metanol.

- Esterilizar por filtrado
- Guardar a -20°C

Preparamos placas con cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina (cubrimos los vidrios con solución estéril de poli-L-lisina 0.1%, incubamos 30 minutos a 37°C y lavamos 3 veces con agua miliQ estéril por 1 hora).

Sembramos células N2a que expresan en forma estable alguna construcción de Pcdh con GFP o células transfectadas en forma transitoria con EcadGFP. Transfectamos las mismas células en forma transitoria con un plásmido que permite la expresión de la

proteína de Golgi Galactosiltransferasa1 (GalT1), fusionada a la proteína fluorescente Cyan (CFP) en su extremo C-terminal (este plásmido fue gentilmente cedido por el Dr. Matías Blaustein del IFIBYNE). Sembramos $5 \cdot 10^5$ células por placa de 3.5cm y las incubamos en estufa a 37°C y con gaseo por 24hs. Realizamos placas por duplicado.

Lavamos las monocapas 2 veces con PBS 1X y agregamos 2 ml de medio completo + 5µg/ml BFA ó 2 ml de medio completo solo. Incubamos por 30 minutos en estufa a 37°C con gaseo. Lavamos, fijamos y montamos los cubreobjetos como detallamos en el punto 18, para observar mediante un microscopio de fluorescencia Olympus (OLYMPUS IX-81) con un objetivo 60X de inmersión en aceite. Tomamos fotos de entre 5 y 10 campos al azar por preparado mediante el programa Metamorph, registrando cada canal de fluorescencia por separado.

Procesamos las imágenes con el programa ImageJ para pseudocolorearlas y superponer los distintos canales (verde, cyan y transmisión). Cuantificamos la proporción de contactos con acumulación de proteína fluorescente (ver punto 19) con y sin el tratamiento con BFA para cada cultivo.

22. Efecto de la depleción de Ca^{2+} con EGTA en el procesamiento de las Pcdh alfa

Preparamos placas tal y como describimos en el punto 21. Lavamos las monocapas 2 veces con PBS 1X y agregamos 2ml de medio completo + 5mM EGTA ó 2ml de medio completo solo. Incubamos por 30 minutos en estufa a 37°C y con gaseo. Procedemos igual que en el punto 21 para obtener imágenes mediante el microscopio de fluorescencia. Cuantificamos la proporción de contactos con acumulación de proteína fluorescente (ver punto 19) sin y con el tratamiento con EGTA para cada cultivo.

23. Ensayo de adhesión en suspensión

Transfectamos en forma transitoria células N2a con los plásmidos que codifican para Ecad, alfa4 o c2 (ambas con el dominio citoplasmático de Ecad). Todas ellas poseen la etiqueta o *tag* HA en su extremo C-terminal. Los cultivos se co-transfectan con un

plásmido que codifica para una proteína fluorescente: GFP (color verde) o mCherry (color rojo).

24hs post-transfección, lavamos las monocapas 3 veces con PBS 1X y levantamos las células con 600µl de EDTA 5mM por cada placa de 35mm. Diluimos con 1ml de medio sin suero y disgregamos las células con ayuda de una pipeta con un tip azul (evitar la formación de burbujas). Chequeamos en el microscopio que las células estén bien disgregadas.

Lavamos las suspensiones celulares con PBS 1 X (llevar a 13 ml en un tubo falcon de 15ml y centrifugar 10min a 1000rpm). Aspiramos con cuidado el PBS y resuspendemos las células suavemente en 1.5ml de **medio de adhesión** (1:1 de PBS:DMEM alta glucosa con piruvato + 4% FCS). Realizamos un recuento con cámara de Neubauer para determinar la concentración de células.

Combinamos 10^6 células de cada uno de los cultivos (uno de células “verdes” y otro con células “rojas”) en un volumen final de 1.5ml, y colocamos las suspensiones combinadas en placas de 3.5 cm. Realizamos cultivos equivalentes con medio de adhesión + 2 mM EGTA. Preparamos un set de placas por cada tiempo a analizar. Incubamos 2 hs a 37°C en un shaker a 90 rpm. Fijamos las células con 1 volumen de PFA 4% (concentración final PFA 2%), por 30 minutos en heladera. Lavamos cada suspensión como describimos más arriba. Aspiramos el sobrenadante y resuspendemos las células suavemente en 1.5ml de PBS 1X frío. Colocamos en una placa de 6 pocillos limpia y observamos con un microscopio invertido de fluorescencia Olympus (OLYMPUS IX-81) mediante un objetivo 20X de inmersión en agua. Procesamos las imágenes como describimos en el punto 21 y observamos la formación o no de agregados celulares.

24. Ensayo de co-cultivos

Cultivamos células N2a que sobreexpresan en forma estable las variantes alfa4 o c2 de Pcdh, con el dominio citoplasmático de Ecad y una fusión a GFP en el C-terminal. Las transfectamos en forma transitoria con un plásmido que permita la expresión de CFP o con uno que codifica para mCherry, de manera de poder distinguir las poblaciones de células por su color (cyan o rojo, respectivamente).

A las 24hs post-transfección, levantamos las células, hacemos un recuento con cámara de Neubauer y cambiamos el medio para eliminar la tripsina. Teniendo en cuenta el recuento, las resuspendemos en un volumen de medio completo tal que la concentración de células sea de 175.000 células/ml.

Realizamos las combinaciones de cultivos en una relación 1:1 de acuerdo con la siguiente tabla:

Variante 1 (color)	Variante 2 (color)
c2 (cyan)	c2 (rojo)
alfa4 (cyan)	alfa4 (rojo)
c2 (cyan)	alfa4 (rojo)
alfa4 (cyan)	c2 (rojo)

Preparamos 2 pocillos de 3.5cm por cada combinación, en placas de 6 pocillos que tienen cubreobjetos tratados con poli-L-lisina. Incubamos las células por 48hs en estufa a 37°C con gaseo. Cumplido este tiempo, lavamos y fijamos las células y montamos los cubreobjetos como figura en el punto 18. Observamos con microscopio de fluorescencia Olympus (OLYMPUS IX-81) con objetivo de inmersión en aceite 60X, adquirimos imágenes (10 por preparado) y las procesamos mediante ImageJ como ya describimos antes. A partir de estas fotos, cuantificamos la acumulación de GFP en los contactos entre células (ver secciones anteriores), distinguiendo la acumulación que se da en contactos entre células del mismo color (rojo-rojo o cyan-cyan) o de colores distintos.

25. Producción de proteínas en células de insecto usando un sistema de baculovirus

Los procedimientos que se detallan abajo son los recomendados por la Dra. Andrea Peralta y el Dr. Oscar Taboga, INTA-Castelar (avperalta@cni.inta.gov.ar, otaboga@cni.inta.gov.ar), en cuyo laboratorio se llevaron a cabo como fruto de una estrecha y generosa colaboración de su parte.

25.1.a Cultivo de células de insecto sf9

Cultivamos las células de insecto en medio específico (Sf-900 II SFM, Invitrogen) con suero fetal bovino, antibióticos y antimicóticos, en una incubadora a 27°C. Las repicamos por remoción mecánica (golpeando suavemente los flasks) y subcultivamos diluciones. En general, las mantenemos en T75, haciendo diluciones de más o menos 1/3 o 1/4 cada 3-4. A los 20 minutos de repicadas se pegan al plástico.

Las transfectamos en placas de 6 wells.

Para mantenerlas congeladas usamos N₂ líquido, suspendidas en 90% SFB + 10% DMSO.

25.1.b Clonado de la secuencia de interés en vector de transferencia para baculovirus

Amplificamos las secuencias necesarias de Pcdh alfa 4, Pcdh c2 y Ecad como describimos en el punto 4, cuidando que estas comprendan la región río abajo de la señal de exportación propia de estas proteínas y río arriba de la que codifica para el dominio transmembrana (sólo los dominios extracelulares). Para chequear la posición de dicha secuencia usamos un predictor *web* de péptidos señal: SignalIP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>).

Las clonamos en el vector pMel V5 His, provisto gentilmente por el Dr. Oscar Taboga de INTA-Castelar (ver figura M2). Los primers que usamos figuran en la siguiente tabla:

Secuencia clonada	Primer Forward	Primer Reverso	Enzimas de restricción para el clonado	Secuencia amplificada
alfa4 báculo	CAGGATCCGGGAACAGCCAGATCCAC	GTCTCGAGAGTGACGCCTCAGAGTGTG	BamHI/XhoI	Entre +79 y +2078 de la secuencia de Pcdh alfa4
c2 báculo	ATCTCGAGGGCGCCTCCCAGCTA	ATCTCGAGTATGTCCGAGGACTC	XhoI/XhoI	Entre +115 y +2099 de la secuencia de Pcdh c2
alfa 4 EC1-EC3	CAGGATCCGGGAACAGCCAGATCCAC	CAGAGAGTGGTACCTGTCCC	BamHI/KpnI	Entre +79 y +982 de la secuencia de Pcdh alfa4
Ecad báculo	TGTCTAGAGACTGGGTCATCCCTC	GCTCTAGAACTTGCAATCCTGCTG	XbaI/XbaI	Entre +675 y +2127 de la secuencia de Ecad de ratón

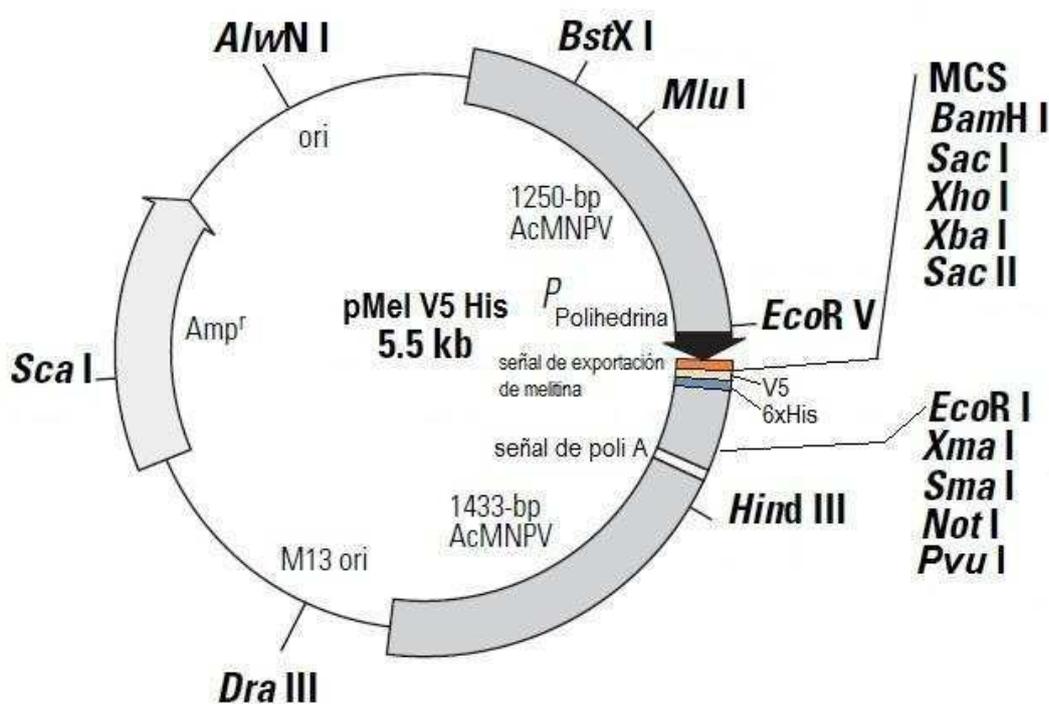


Figura M2: Representación esquemática del plásmido pMel V5 His. MCS: sitio múltiple de clonado; 6xHis y V5: *tags*.

25.2. Transfección de células de insecto

Nota: 2 hs antes de empezar, preparamos una placa de 6 wells con las células a transfectar.

1. Por cada transfección mezclamos en un tubo eppendorf 100 μ l de medio Grace's con 6 μ l de cellfectine (Invitrogen) > **TUBO A**
 2. En otro tubo eppendorf mezclamos 1,5 μ g de DNA de transferencia con 2,5 μ g de Baculogold, haciendo que *se choquen las gotas* de ambos DNAs. > **TUBO B.** (agregamos medio si el volumen de DNA a pipetear es muy pequeño).
- IMPORTANTE:** el Baculogold es muy frágil por su gran tamaño (100 kpb), de ahora en más lo manipulamos con pipetas de 1 ml y no con micropipetas automáticas.
3. Incubamos por 5 minutos a temperatura ambiente.
 4. Incorporamos el contenido del TUBO A con micropipeta al TUBO B **suavemente** y mezclamos golpeando el tubo.
 5. Incubamos por 30-45 minutos a temperatura ambiente.
 6. Tomamos una placa de 6 pocillos con 8×10^4 células sf9 por pocillo creciendo en Sf-900 II SFM (Invitrogen) con 10% SFB y antibiótico (GIBCO #15240-062). Aspiramos el medio y reservamos para después. Agregamos a las células 500 μ l de medio Grace's para que no se sequen.
 7. Agregamos 500 μ l de Grace's a **TUBO A+B**, mezclando con pipeta de 1 ml, **suavemente.**
 8. Incorporamos los casi 600 μ l de la mezcla de Grace's/cellfectine/DNA por pocillo, **gota a gota** sobre las células.
 9. Incubamos durante 4-5 hs a 27°C. Para evitar contaminaciones, colocamos las placas de 6 pocillos dentro de alguna cajita o tupper.
 10. Aspiramos el medio de transfección y agregamos 3 ml de medio Sf-900 II SFM con 10% SFB y antibiótico.
 11. Incubamos a 27°C durante 5 días.

25.3. Producción de virus

Nota: en la primera ronda de producción de virus no se observa efecto citopático, en la segunda sí. Este consiste en que algunas células empiezan a desprenderse, y las demás lucen deformadas, con la membrana celular irregular y menos redondeada que antes. Estos efectos se deben al

brotado del virus de las membranas y a las alteraciones que provoca el ensamblado de viriones en el núcleo.

Primera ronda de producción de virus

- 1.1. Cosechamos el sobrenadante (de placa de 6 wells) centrifugando a 1000 rpm por 10 minutos (vemos un pequeño pellet). Este se llama *sobrenadante de transfección*.
- 1.2. Preparamos una nueva monocapa con 3×10^6 células sf9 en flask T25 (aproximadamente 70% de densidad) para infectar con parte de este sobrenadante (usamos pipetas de cultivo, no automáticas).
- 1.3. Retiramos el medio de las células y lo reservamos a temperatura ambiente.
- 1.4. Agregamos 500 μ l de medio *sin suero* con antibiótico a cada monocapa.
- 1.5. Incorporamos 100 μ l del sobrenadante de transfección (con virus).
- 1.6. Incubamos a temperatura ambiente o a 27°C por 1 hora, moviendo el flask con cuidado cada 15 minutos.
- 1.7. Agregamos 4,5 ml del medio que se reservó en el punto 1.3, para completar a 5 ml finales por flask. En este punto no hace falta retirar el inóculo.
- 1.8. Incubamos a 27°C durante 5 días.

Segunda ronda de producción de virus

2. Al sobrenadante que cosechamos esta vez lo llamamos *1er sobrenadante de infección*. Repetimos los pasos 1 a 1.8. Cumplido el tiempo de incubación, controlamos la expresión de proteína recombinante en células y sobrenadante (ver “Chequeo de la expresión de proteínas” más adelante).

Tercera ronda de producción de virus

- 3.1. Preparamos una T75 con 2×10^7 células (70% confluyente) por cada virus.
- 3.2. Cosechamos el sobrenadante como ya explicamos. Este es el *2do sobrenadante de infección*. Podemos guardar este sobrenadante hasta 6 meses en heladera, protegido de la luz.
- 3.3. Removemos el medio completo de las células y reservamos para después. Agregamos 6 ml de medio solo.
- 3.4. Incorporamos 300 μ l del 2do sobrenadante de infección (antes, mezclar con vortex por 10 segundos).

- 3.5. Incubamos 1 hora a temperatura ambiente, tapado con aluminio, moviendo el flask con cuidado cada 15 minutos.
- 3.6. Retiramos el inóculo pero dejamos 1 ml del mismo (en caso de que el título viral sea muy bajo)
- 3.7. Agregamos 27 ml del medio completo que reservamos al principio.
- 3.8. Incubamos 5 días a 27°C.

Chequeo de la expresión de proteínas

- 4.1. Cosechamos las células junto con el sobrenadante de la segunda ronda de infección (sólo golpeamos el flask y lavamos la pared de la T25 con el medio con células para despegar las restantes).
- 4.2. Clarificamos el sobrenadante por centrifugación, 10 min a 1000 rpm. Lo llamamos *2do sobrenadante de infección*.
- 4.3. Lavamos el pellet con PBS frío, pH 6,2 (pH fisiológico de células de insecto). Resuspendemos con micropipeta y repetimos la centrifugación.
- 4.4. descartamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en el PBS remanente (aproximadamente 150 µl; si el volumen es menor, agregamos H₂O destilada). Añadimos 45 µl de cracking buffer 5X y hervimos 5 minutos.
- 4.5. Precipitamos una muestra del sobrenadante (1ml) con TCA (10% del volumen), dejando la mezcla 30 minutos en hielo y vortexeando cada 10 minutos.
- 4.6. Centrifugamos por 20 minutos a 10000 rpm y 4°C
- 4.7. Descartamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en 150 µl de PBS frío (usamos vortex y micropipeta).
- 4.8. Agregamos 45 µl de cracking buffer 5X (toma color amarillo por el TCA). Neutralizamos con unas gotitas de Trizma base o de NaOH 5-10 N hasta que toma color azul (no agregar más de 5-20 µl).
- 4.9. Hervimos las muestras por 5 minutos.
- 4.10. Realizamos un Western blot utilizando anticuerpo anti-V5 monoclonal de ratón 1:5000 (Invitrogen 46-0705). Sembramos el máximo volumen posible de cada muestra. **Importante:** el anticuerpo de Invitrogen da señal inespecífica, por eso bloqueamos la membrana toda la noche a 4°C e incubamos con la dilución de anticuerpo primario sólo por 1 hora a temperatura ambiente.

Chequeo de título viral y cinética de producción de virus

En paralelo chequeamos el título viral (por placas de lisis) y el tiempo óptimo de cosecha (2, 3,4, 5 días).

Titulación viral

Preparamos placas de P60 con células en un 30% de confluencia (sembrando 6×10^5 células el día anterior o 8×10^5 si es el mismo día) en 3 ml de medio completo.

5.1. Preparamos diluciones seriadas del virus con factor 1/10 (hasta 10^{-6}) y volumen final 1 ml a partir del 3er sobrenadante de infección. Usamos como diluyente medio Sf-900. Usamos pipetas de plástico -no automáticas- para minimizar contaminaciones.

5.2. Descartamos el medio de las células. Agregamos 500 μ l de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} a sendas placas. Dejamos una placa sin infectar como control de viabilidad.

5.3. Incubamos 1 hora a temperatura ambiente.

5.4. Transcurridos 30 minutos, preparamos el overlay:

Por cada P60 se usan 4 ml de overlay. Entonces, para 5 placas, preparamos 22 ml:

- 2,2 ml de agarosa Seakem 5%

- 17,6 ml de medio Sf-900

- 2,2 ml SFB

. Precalentamos a 60°C una botella con medio Sf-900 y la solución de agarosa. Preparamos un vaso con agua a 60°C para mantener la mezcla de agarosa ahí hasta utilizarla.

. El suero permanece en la heladera, lo agregamos frío una vez que retiramos del agua a 60°C la mezcla de medio con agarosa

5.5. Cuando se cumple la hora de infección, retiramos el inóculo y volcamos 4 ml de overlay por P60, chequeando primero que la temperatura esté "a punto mamadera" (para no quemar las células).

5.6. Dejamos solidificar unos minutos en el flujo laminar, con las placas semicubiertas por la tapa.

5.7. Incubamos a 27°C durante 5 días y chequeamos que las células estén en un 90% de confluencia o que se haya completado la monocapa.

5.8. Preparamos el overlay con colorante:

Por cada P60 se usan 2 ml de overlay. Para 5 placas preparamos 12 ml:

- 1,2 ml de agarosa Seakem 5% en H₂O

- 0,75 ml de sc Rojo Neutro 2,5mg/ml (50X), en medio Sf900 esterilizada por filtrado

(NOTA: el 2do overlay es 3X, cuando lo colocamos sobre los 4ml del otro overlay, llega a 1X)

- 10 ml de medio Sf-900

. Pre calentamos a 60°C una botella con medio Sf-900 y la solución de agarosa. Preparamos un vaso con agua a 60°C para mantener la mezcla de agarosa ahí hasta utilizarla.

. NO AGREGAMOS SUERO. Añadimos fría la solución de rojo neutro, una vez que sacamos del baño 60°C la mezcla de medio con agarosa.

5.9. Volcamos 2 ml de overlay por P60, chequeando nuevamente que la temperatura esté "a punto mamadera".

5.10. Incubamos a 27°C O.N.

5.11. Contamos las placas de lisis y calculamos el título viral.

Cinética de expresión de proteínas

6. Sembramos placas de 6 pocillos con 8×10^4 células sf9 por pocillo (aproximadamente 70% de confluencia) en 2ml de medio completo, el mismo día que se va a infectar (2hs antes como mínimo). Preparamos un número de pocillos equivalente a la cantidad de días que queremos analizar para ver los niveles de expresión de proteína (en general, 5 días).

6.1. Reservamos el medio.

6.2. Agregamos 250ul de medio Sf900 por pocillo con pipeta

6.3. Infectamos cada pocillo con 250 μ l del sobrenadante de la tercera ronda de infección.

6.4. Incubamos 1 hora a temperatura, moviendo suavemente cada 15 minutos.

6.5. Retiramos el inóculo y agregamos 2ml de medio completo por pocillo.

6.6. Incubamos a 27°C y cosechamos células y sobrenadante 1, 2, 3, 4 y 5 días post-infección (seguir el procedimiento descrito anteriormente).

6.7. Hacemos un Western blot utilizando anticuerpo anti-V5. Sembramos igual volumen de todas las muestras para poder comparar los niveles de proteína en cada una. Analizamos sobrenadante y alguna muestra de células. Si no detectamos proteína en el sobrenadante, hay que repetir las rondas de infección.

Multiplicidad de infección

Una vez que hallamos el tiempo óptimo para la expresión de las proteínas de interés, evaluamos que multiplicidad de infección (MOI) es la óptima para la expresión de

nuestras proteínas. Ensayamos MOI de 1, 3 ó 5 siguiendo procedimientos de infección como los que ya describimos para placas de 6 pocillos. Cosechamos los sobrenadantes al tiempo óptimo y realizamos un western blot (ver más arriba) revelando con anti-V5, para evaluar qué MOI es la que da el mejor nivel de expresión de proteína.

Producción de proteína recombinante

Con la MOI y el tiempo de expresión óptimos, procedemos al *scale-up* para la producción de proteína recombinante.

El mismo día, preparamos un flash T175 por cada proteína que se quiera expresar, con $2,9 \times 10^7$ células sf9 (90% de confluencia).

Procedemos como ya describimos antes. El volumen final para la infección es de aproximadamente 12 ml. Usamos el volumen necesario de la suspensión viral para la MOI óptima y completamos con medio Sf-900 sin suero. La infección prosigue como ya mencionamos. Cumplido el tiempo de incubación, retiramos el inóculo y agregamos 22,5 ml por flash del medio reservado al principio. Incubamos a 27°C la cantidad de días que sean necesarios (según el tiempo óptimo de expresión que determinamos previamente).

26. Purificación de proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad por ión metálico inmovilizado.

La puesta a punto de la purificación de estas proteínas se realizó de acuerdo a lo aconsejado por el Dr. Gustavo Levin y la Dra. Victoria Miranda, de la Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología, FFB –UBA.

Buffer fosfato (stock 100mM)

Na₂HPO₄ 1M 89,6ml

NaH₂PO₄ 1M 10,4ml

pH 7,8

-Buffer de equilibración y lavado (A): PO₄²⁻ 25mM, NaCl 300mM, pH 8

-Buffer de lavado (B): PO₄²⁻ 25mM, NaCl 300mM, pH 8 + 20mM IMIDAZOL

-Buffer de elución (C): PO₄²⁻ 25mM, NaCl 300mM, pH 8 + 500mM IMIDAZOL

- 1) Colectamos el sobrenadante de una T175 luego de infectar células S9 con el baculovirus de interés. Clarificamos por centrifugación 10 minutos a 1000rpm y

4°C.

- 2) Realizamos cambio de buffer de las muestras mediante columnas PD10 (GE), siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente: lavamos la columna con 25 ml de agua destilada, equilibramos con 30 ml de buffer A, sembramos 2,5 ml de muestra y eluimos con 3,5ml de buffer A. Re-equilibramos con 30 ml de buffer A entre siembras sucesivas. Guardar muestra del líquido desplazado al sembrar (*flow-through PD10*) para control por western blot.
- 3) Lavamos una columna HisTrap HP de 1 ml (GE) con H₂O destilada y equilibramos con 15-20 ml de buffer A. Conectamos la columna a una bomba peristáltica, con un flujo 1 ml/min.
- 4) Sembramos la muestra con un flujo 0,4 ml/min. Colectamos el flow trough en un falcon y reservamos para control por western blot.

En los pasos 5) y 6), colectamos fracciones de 1ml y seguir perfil de elución por absorbancia a 280nm (tener en cuenta cambio de buffer para el blanco de absorbancia).

- 5) Lavamos con buffer A, flujo 1 ml/min, aproximadamente 6-7ml.
- 6) Lavamos con buffer B, flujo 1 ml/min, aproximadamente 6-7ml.
- 7) Eluimos con buffer C, flujo 1 ml/min, 6-7ml (no medimos absorbancia a 280nm, la concentración de imidazol en este buffer da mucho background)
- 8) Realizamos SDS-PAGE por duplicado: usamos un gel para tinción con Coomassie (para ver proteínas totales) y transferimos el otro a una membrana para un western-blot y revelamos con anti-V5 (chequeamos todo el proceso de purificación y detectamos en qué fracciones está presente la proteína de interés)

27. Desalado de la solución de proteína recombinante

- 1) Precipitamos la muestra de proteína purificada con 75-80% (NH₄)₂SO₄. Agregamos la cantidad necesaria de sal pulverizada e incubamos en hielo por 20 minutos. Centrifugamos por 20 minutos a 4°C y 12.000 rpm. Descartamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en 100 µl de PBS 1X pH 7.4.
- 2) Empacamos una columna con 1 ml de Sephadex G-25. Es importante que no queden burbujas y que **NUNCA** se deje secar la resina.

- 3) Equilibramos la columna con, por lo menos, 5 volúmenes de PBS pH 7.4.
- 4) Dejamos salir todo el buffer hasta que llegue a la superficie de la resina y sembramos los 100 μ l de la muestra.
- 5) Dejamos que la muestra ingrese completamente a la columna.
- 6) Agregamos 1ml de PBS pH 7.4.
- 7) Recuperamos alícuotas de 3 gotas.
- 8) Evaluamos la presencia de proteínas en las distintas fracciones mediante Bradford (ver punto 16. b). Juntamos aquellas fracciones que resulten positivas (son 2 ó 3 por lo general).

28. Acople de proteína recombinante a microesferas fluorescentes

- 1- Tomamos 50ul de microesferas 2% solids (Fluorospheres Fluorescent Microspheres, Red #F8851, Invitrogen)
- 2- Lavamos con PBS (centrifugar 15 minutos a 9500 g) y las dejamos en un volumen final de 200 μ l de PBS (quedan 0,5% solids).
- 3- Sonicamos 2 x 30 segundos, intensidad baja, en Bioruptor (Diagenode).
- 4- Incubamos con 22,75 μ g de anticuerpo anti-V5 (INVITROGEN, concentración= 1,3mg/ml) ON en un rotador de tubos a 4°C y en oscuridad.
- 5- Centrifugamos las esferas, descartamos el sobrenadante y lavamos con PBS + 5% SFB.
- 6- Sonicamos 30 segundos, intensidad baja, en Biorruptor.
- 7- Incubamos 2 hs a temperatura ambiente con PBS + 5% SFB, con agitación y en oscuridad, para bloquear (Volumen de incubación= 1000 μ l).
- 8- Lavamos con PBS + 0,1% BSA.
- 9- Guardamos a 4°C en PBS + 0,1% BSA en un volumen final de 120 μ l para que la concentración final de esferas sea de 1% solids. Sonicamos 30 segundos a intensidad baja cada vez antes de usarlas.
- 10- Tomamos 20 μ l de la suspensión de microesferas más anticuerpo ($4 \cdot 10^8$ beads en total) e incubamos con el volumen necesario de la solución de proteína recombinante (deberían ser 15 μ g de proteína recombinante), completando con PBS+0,1% BSA para un volumen final de 250 μ l. Incubamos ON en rotador de tubos a 4°C y en oscuridad.

11- Centrifugamos 15 minutos a 9500 g y guardamos el sobrenadante para controlar la eficiencia del acople de la proteína recombinante por western blot. Lavamos las esferas con PBS + 0,1% BSA.

12- Guardamos las esferas a 4°C en 500 µl de PBS + 0,1% BSA, la suspensión queda aproximadamente $8 \cdot 10^5$ beads/ µl.

13- Chequeamos por western blot revelando con anti-V5 la presencia de la proteína recombinante tomando 0,5 µl de la solución de proteína del paso 10, X µl* del sobrenadante recuperado en el paso 11 y X µl* de la suspensión de microesferas del paso 12.

*el volumen a sembrar de estas muestras depende de cuánto hayamos diluído la solución de proteína recombinante en cada caso.

El protocolo que desarrollamos y su puesta a punto para lograr la expresión de proteína recombinante mediante baculovirus, seguida de su purificación y acople a microesferas fluorescentes, fue exitoso.

Lamentablemente, la cantidad de proteína producida no fue suficiente para recubrir la totalidad de las microesferas, por lo que los ensayos que intentamos realizar con las mismas no arrojaron resultados. El costo y tiempo que hubiera requerido aumentar el nivel de producción de proteína no nos permitió repetir el proceso durante el transcurso de esta tesis. Sin embargo, creemos que es factible de intentar en un futuro y estamos confiadas acerca de su éxito.

Bibliografía

- Alattia, J.-R., Ames, J.B., Porumb, T., Tong, K.I., Heng, Y.M., Ottensmeyer, P., Kay, C.M. and Ikura, M., 1997. Lateral self-assembly of E-cadherin directed by cooperative calcium binding. *FEBS Letters*, 417(3), pp.405–408.
- Alattia, J.R., Kurokawa, H. and Ikura, M., 1999. Structural view of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 55(3), pp.359–67.
- Balzac, F., Avolio, M., Degani, S., Kaverina, I., Torti, M., Silengo, L., Small, J.V. and Retta, S.F., 2005. E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *Journal of cell science*, 118(20), pp.4765–83.
- Benjamin, J.M., Kwiatkowski, A. V, Yang, C., Korobova, F., Pokutta, S., Svitkina, T., Weis, W.I. and Nelson, W.J., 2010. AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *The Journal of cell biology*, 189(2), pp.339–52.
- Biswas, S., Emond, M.R. and Jontes, J.D., 2010. Protocadherin-19 and N-cadherin interact to control cell movements during anterior neurulation. *The Journal of cell biology*, 191(5), pp.1029–41.
- Bonn, S., Seeburg, P.H. and Schwarz, M.K., 2007. Combinatorial expression of alpha- and gamma-protocadherins alters their presenilin-dependent processing. *Molecular and cellular biology*, 27(11), pp.4121–32.
- Buchanan, S.M., Schalm, S.S. and Maniatis, T., 2010. Proteolytic processing of protocadherin proteins requires endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(41), pp.17774–9.
- Chen, B.E., Kondo, M., Garnier, A., Watson, F.L., Püettmann-Holgado, R., Lamar, D.R. and Schmucker, D., 2006. The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell*, 125(3), pp.607–20.
- Chen, J., Lu, Y., Meng, S., Han, M.-H., Lin, C. and Wang, X., 2009. alpha- and gamma-Protocadherins negatively regulate PYK2. *The Journal of biological chemistry*, 284(5), pp.2880–90.
- Chen, W. V, Alvarez, F.J., Lefebvre, J.L., Friedman, B., Nwakeze, C., Geiman, E., Smith, C., Thu, C.A., Tapia, J.C., Tasic, B., Sanes, J.R. and Maniatis, T., 2012. Functional significance of isoform diversification in the protocadherin gamma gene cluster. *Neuron*, 75(3), pp.402–9.
- Chen, W. V and Maniatis, T., 2013. Clustered protocadherins. *Development*, 140(16), pp.3297–302.
- Donaldson, J.G., Kahn, R.A., Lippincott-Schwartz, J. and Klausner, R.D., 1991. Binding of ARF and beta-COP to Golgi membranes: possible regulation by a trimeric G protein. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5035), pp.1197–1199.

- Esumi, S., Kakazu, N., Taguchi, Y., Hirayama, T., Sasaki, A., Hirabayashi, T., Koide, T., Kitsukawa, T., Hamada, S. and Yagi, T., 2005. Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the protocadherin-alpha gene cluster in single neurons. *Nature genetics*, 37(2), pp.171–6.
- Ferber, E.C., Kajita, M., Wadlow, A., Tobiansky, L., Niessen, C., Ariga, H., Daniel, J. and Fujita, Y., 2008. A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *The Journal of biological chemistry*, 283(19), pp.12691–700.
- Fernández-Monreal, M., Kang, S. and Phillips, G.R., 2009. Gamma-protocadherin homophilic interaction and intracellular trafficking is controlled by the cytoplasmic domain in neurons. *Molecular and cellular neurosciences*, 40(3), pp.344–53.
- Frank, M., Ebert, M., Shan, W., Phillips, G.R., Arndt, K., Colman, D.R. and Kemler, R., 2005. Differential expression of individual gamma-protocadherins during mouse brain development. *Molecular and cellular neurosciences*, 29(4), pp.603–16.
- Frank, M. and Kemler, R., 2002. Protocadherins. *Current Opinion in Cell Biology*, (14), pp.557–562.
- Fukuda, E., Hamada, S., Hasegawa, S., Katori, S., Sanbo, M., Miyakawa, T., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Hirabayashi, T. and Yagi, T., 2008. Down-regulation of protocadherin- a A isoforms in mice changes contextual fear conditioning and spatial working memory. *European Journal of Neuroscience*, 28(August), pp.1362–1376.
- Golan-Mashiach, M., Grunspan, M., Emmanuel, R., Gibbs-Bar, L., Dikstein, R. and Shapiro, E., 2012. Identification of CTCF as a master regulator of the clustered protocadherin genes. *Nucleic acids research*, 40(8), pp.3378–91.
- Gumbiner, B.M., 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(8), pp.622–34.
- Guo, Y., Monahan, K., Wu, H., Gertz, J., Varley, K.E., Li, W., Myers, R.M., Maniatis, T. and Wu, Q., 2012. CTCF/cohesin-mediated DNA looping is required for protocadherin α promoter choice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(51), pp.21081–6.
- Haas, I.G., Frank, M., Véron, N. and Kemler, R., 2005. Presenilin-dependent processing and nuclear function of gamma-protocadherins. *The Journal of biological chemistry*, 280(10), pp.9313–9.
- Hamsch, B., Grinevich, V., Seeburg, P.H. and Schwarz, M.K., 2005. {gamma}-Protocadherins, presenilin-mediated release of C-terminal fragment promotes locus expression. *The Journal of biological chemistry*, 280(16), pp.15888–97.
- Han, M.-H., Lin, C., Meng, S. and Wang, X., 2010. Proteomics analysis reveals overlapping functions of clustered protocadherins. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 9(1), pp.71–83.

- Hasegawa, S., Hamada, S., Kumode, Y., Esumi, S., Katori, S., Fukuda, E., Uchiyama, Y., Hirabayashi, T., Mombaerts, P. and Yagi, T., 2008. The protocadherin-alpha family is involved in axonal coalescence of olfactory sensory neurons into glomeruli of the olfactory bulb in mouse. *Molecular and cellular neurosciences*, 38(1), pp.66–79.
- Hattori, D., Chen, Y., Matthews, B. and Salwinski, L., 2009. Robust discrimination between self and non-self neurites requires thousands of Dscam1 isoforms. *Nature*, 461(7264), pp.644–648.
- Hattori, D., Millard, S.S., Wojtowicz, W.M. and Zipursky, S.L., 2008. Dscam-mediated cell recognition regulates neural circuit formation. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, pp.597–620.
- Hirano, K., Kaneko, R., Izawa, T., Kawaguchi, M., Kitsukawa, T. and Yagi, T., 2012. Single-neuron diversity generated by Protocadherin- β cluster in mouse central and peripheral nervous systems. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5(August), pp.1–13.
- Hirano, S., Nose, A., Hatta, K., Kawakami, A. and Takeichi, M., 1987. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *The Journal of cell biology*, 105(6), pp.2501–10.
- Hughes, M.E., Bortnick, R., Tsubouchi, A., Bäumer, P., Kondo, M., Uemura, T. and Schmucker, D., 2007. Homophilic Dscam interactions control complex dendrite morphogenesis. *Neuron*, 54(3), pp.417–27.
- Hunziker, W., Whitney, J. a and Mellman, I., 1991. Selective inhibition of transcytosis by brefeldin A in MDCK cells. *Cell*, 67(3), pp.617–27.
- Junghans, D., Haas, I.G. and Kemler, R., 2005. Mammalian cadherins and protocadherins: about cell death, synapses and processing. *Current opinion in cell biology*, 17(5), pp.446–52.
- Kaneko, R., Abe, M., Hirabayashi, T., Uchimura, A. and Sakimura, K., 2014. Expansion of stochastic expression repertoire by tandem duplication in mouse protocadherin alpha cluster. *Scientific reports*, 4, pp.1–11.
- Kaneko, R., Kato, H., Kawamura, Y., Esumi, S., Hirayama, T., Hirabayashi, T. and Yagi, T., 2006. Allelic gene regulation of Pcdh-alpha and Pcdh-gamma clusters involving both monoallelic and biallelic expression in single Purkinje cells. *The Journal of biological chemistry*, 281(41), pp.30551–60.
- Katori, S., Hamada, S., Noguchi, Y., Fukuda, E., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Hasegawa, S. and Yagi, T., 2009. Protocadherin-alpha family is required for serotonergic projections to appropriately innervate target brain areas. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(29), pp.9137–47.

- Kawaguchi, M., Toyama, T., Kaneko, R., Hirayama, T., Kawamura, Y. and Yagi, T., 2008. Relationship between DNA methylation states and transcription of individual isoforms encoded by the protocadherin-alpha gene cluster. *The Journal of biological chemistry*, 283(18), pp.12064–75.
- Keeler, A.B., Molumby, M.J. and Weiner, J.A., 2015. Protocadherins branch out : Multiple roles in dendrite development. *Cell Adhesion & Migration*, 9(3), pp.37–41.
- Kehayova, P., Monahan, K., Chen, W. and Maniatis, T., 2011. Regulatory elements required for the activation and repression of the protocadherin-alpha gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(41), pp.17195–200.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G. and Lippincott-Schwartz, J., 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of cell biology*, 116(5), pp.1071–80.
- Kohmura, N., Senzaki, K., Hamada, S., Kai, N., Yasuda, R., Watanabe, M., Ishii, H., Yasuda, M., Mishina, M. and Yagi, T., 1998. Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron*, 20(6), pp.1137–51.
- Le, T.L., Yap, a S. and Stow, J.L., 1999. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *The Journal of cell biology*, 146(1), pp.219–32.
- Lefebvre, J.L., Kostadinov, D., Chen, W. V, Maniatis, T. and Sanes, J.R., 2012. Protocadherins mediate dendritic self-avoidance in the mammalian nervous system. *Nature*, 488(7412), pp.517–21.
- Lefebvre, J.L., Zhang, Y., Meister, M., Wang, X. and Sanes, J.R., 2008. gamma-Protocadherins regulate neuronal survival but are dispensable for circuit formation in retina. *Development (Cambridge, England)*, 135(24), pp.4141–51.
- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J.G., Schweizer, a, Berger, E.G., Hauri, H.P., Yuan, L.C. and Klausner, R.D., 1990. Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell*, 60(5), pp.821–36.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L.C., Bonifacino, J.S. and Klausner, R.D., 1989. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*, 56(5), pp.801–13.
- Lorch, J.H., Klessner, J., Park, J.K., Getsios, S., Wu, Y.L., Stack, M.S. and Green, K.J., 2004. Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 279(35), pp.37191–200.

- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T. and Robakis, N.K., 2002. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *The EMBO journal*, 21(8), pp.1948–56.
- Marambaud, P., Wen, P.H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R. and Robakis, N.K., 2003. A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell*, 114(5), pp.635–45.
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D. and Saftig, P., 2005. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), pp.9182–7.
- Matthews, B.J., Kim, M.E., Flanagan, J.J., Hattori, D., Clemens, J.C., Zipursky, S.L. and Grueber, W.B., 2007. Dendrite self-avoidance is controlled by Dscam. *Cell*, 129(3), pp.593–604.
- McGowan, P.O., Suderman, M., Sasaki, A., Huang, T.C.T., Hallett, M., Meaney, M.J. and Szyf, M., 2011. Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. *PloS one*, 6(2), pp.1–11.
- Meguro, R., Hishida, R., Tsukano, H., Yoshitake, K. and Imamura, R., 2015. Impaired clustered protocadherin -alpha leads to aggregated retinogeniculate terminals and impaired visual acuity in mice. *Journal of Neurochemistry*, 133(1), pp.66–72.
- Millard, S.S. and Zipursky, S.L., 2008. Dscam-mediated repulsion controls tiling and self-avoidance. *Current opinion in neurobiology*, 18(1), pp.84–9.
- Monahan, K., Rudnick, N.D., Kehayova, P.D., Pauli, F., Newberry, K.M., Myers, R.M. and Maniatis, T., 2012. Role of CCCTC binding factor (CTCF) and cohesin in the generation of single-cell diversity of protocadherin- α gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), pp.9125–30.
- Murata, Y., Hamada, S., Morishita, H., Mutoh, T. and Yagi, T., 2004. Interaction with protocadherin-gamma regulates the cell surface expression of protocadherin-alpha. *The Journal of biological chemistry*, 279(47), pp.49508–16.
- Neves, G., Zucker, J., Daly, M. and Chess, A., 2004. Stochastic yet biased expression of multiple Dscam splice variants by individual cells. *Nature genetics*, 36(3), pp.240–6.
- Niessen, C.M. and Gumbiner, B.M., 2002. Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *The Journal of cell biology*, 156(2), pp.389–399.

- Noonan, J.P., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M. and Myers, R.M., 2004. Gene conversion and the evolution of protocadherin gene cluster diversity. *Genome research*, 14(3), pp.354–66.
- Nose, a, Nagafuchi, a and Takeichi, M., 1988. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell*, 54(7), pp.993–1001.
- Obata, S., Sago, H., Mori, N., Rochelle, J.M., Seldin, M.F., Davidson, M., St John, T., Taketani, S. and Suzuki, S.T., 1995. Protocadherin Pcdh2 shows properties similar to, but distinct from, those of classical cadherins. *Journal of cell science*, 108, pp.3765–73.
- Paterson, A.D., Parton, R.G., Ferguson, C., Stow, J.L. and Yap, A.S., 2003. Characterization of E-cadherin endocytosis in isolated MCF-7 and chinese hamster ovary cells: the initial fate of unbound E-cadherin. *The Journal of biological chemistry*, 278(23), pp.21050–7.
- Prasad, T., Wang, X., Gray, P. a and Weiner, J. a, 2008. A differential developmental pattern of spinal interneuron apoptosis during synaptogenesis: insights from genetic analyses of the protocadherin-gamma gene cluster. *Development*, 135(24), pp.4153–64.
- Prasad, T. and Weiner, J. a, 2011. Direct and Indirect Regulation of Spinal Cord Ia Afferent Terminal Formation by the γ -Protocadherins. *Frontiers in molecular neuroscience*, 4(December), pp.1–12.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D. and Saftig, P., 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *The EMBO journal*, 24(4), pp.742–52.
- Ribich, S., Tasic, B. and Maniatis, T., 2006. Identification of long-range regulatory elements in the protocadherin-alpha gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), pp.19719–24.
- Van Roy, F. and Berx, G., 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(23), pp.3756–88.
- Sago, H., Kitagawa, M., Obata, S., Mori, N., Taketani, S., Rochelle, J.M., Seldin, M.F., Davidson, M., St John, T. and Suzuki, S.T., 1995. Cloning, expression, and chromosomal localization of a novel cadherin-related protein, protocadherin-3. *Genomics*, 29(3), pp.631–40.
- Schalm, S.S., Ballif, B. a, Buchanan, S.M., Phillips, G.R. and Maniatis, T., 2010. Phosphorylation of protocadherin proteins by the receptor tyrosine kinase Ret. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), pp.13894–9.
- Schmucker, D., 2007. Molecular diversity of Dscam: recognition of molecular identity in neuronal wiring. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(12), pp.915–20.

- Schreiner, D. and Weiner, J. a, 2010. Combinatorial homophilic interaction between gamma-protocadherin multimers greatly expands the molecular diversity of cell adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), pp.14893–8.
- Soba, P., Zhu, S., Emoto, K., Younger, S., Yang, S.-J., Yu, H.-H., Lee, T., Jan, L.Y. and Jan, Y.-N., 2007. Drosophila sensory neurons require Dscam for dendritic self-avoidance and proper dendritic field organization. *Neuron*, 54(3), pp.403–16.
- Steinhausen, U., Weiske, J., Badock, V., Tauber, R., Bommert, K. and Huber, O., 2001. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 276(7), pp.4972–80.
- Takei, Y., Hamada, S., Senzaki, K., Mutoh, T., Sugino, H. and Yagi, T., 2001. Two novel CNRs from the CNR gene cluster have molecular features distinct from those of CNR1 to 8. *Genomics*, 72(3), pp.321–30.
- Takeichi, M., 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology*, 7(5), pp.619–27.
- Takeichi, M., 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102(4), pp.639–55.
- Takeichi, M. and Abe, K., 2005. Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends in cell biology*, 15(4), pp.216–21.
- Tan, Y.-P., Li, S., Jiang, X.-J., Loh, W., Foo, Y.K., Loh, C.-B., Xu, Q., Yuen, W.-H., Jones, M., Fu, J., Venkatesh, B. and Yu, W.-P., 2010. Regulation of protocadherin gene expression by multiple neuron-restrictive silencer elements scattered in the gene cluster. *Nucleic acids research*, 38(15), pp.4985–97.
- Tasic, B., Nabholz, C.E., Baldwin, K.K., Kim, Y., Rueckert, E.H., Ribich, S.A., Cramer, P., Wu, Q., Axel, R. and Maniatis, T., 2002. Promoter choice determines splice site selection in Protocadherin alpha and gamma Pre-mRNA Splicing. *Molecular cell*, 10, pp.21–33.
- Thu, C.A., Chen, W. V, Rubinstein, R., Chevee, M., Wolcott, H.N., Felsovalyi, K.O., Tapia, J.C., Shapiro, L., Honig, B. and Maniatis, T., 2014. Single-Cell Identity Generated by Combinatorial Homophilic Interactions between alpha , beta , and gamma Protocadherins. *Cell*, 158, pp.1045–1059.
- Toyoda, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, T., Tarusawa, E., Toyama, T., Okano, M., Oda, M., Nakauchi, H., Yoshimura, Y., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Hirayama, T., Hirabayashi, T. and Yagi, T., 2014. Developmental Epigenetic Modification Regulates Stochastic Expression of Clustered Protocadherin Genes, Generating Single Neuron Diversity. *Neuron*, 82(1), pp.94–108.
- Uemura, K., Kihara, T., Kuzuya, A., Okawa, K., Nishimoto, T., Ninomiya, H., Sugimoto, H., Kinoshita, A. and Shimohama, S., 2006. Characterization of

- sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1. *Neuroscience letters*, 402(3), pp.278–83.
- Uliana, A.S., Crespo, P.M., Martina, J. a, Daniotti, J.L. and Maccioni, H.J.F., 2006. Modulation of GalT1 and SialT1 sub-Golgi localization by SialT2 expression reveals an organellar level of glycolipid synthesis control. *The Journal of biological chemistry*, 281(43), pp.32852–60.
- Wang, J., Zugates, C.T., Liang, I.H., Lee, C.-H.J. and Lee, T., 2002. Drosophila Dscam is required for divergent segregation of sister branches and suppresses ectopic bifurcation of axons. *Neuron*, 33(4), pp.559–71.
- Wang, X., Su, H. and Bradley, A., 2002. Molecular mechanisms governing Pcdh - gamma gene expression : Evidence for a multiple promoter and cis -alternative splicing model. *Genes & development*, 16, pp.1890–1905.
- Wang, X., Weiner, J. a, Levi, S., Craig, A.M., Bradley, A. and Sanes, J.R., 2002. Gamma protocadherins are required for survival of spinal interneurons. *Neuron*, 36(5), pp.843–54.
- Weaver, I.C.G., Cervoni, N., Champagne, F. a, D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M. and Meaney, M.J., 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*, 7(8), pp.847–54.
- Weiner, J. a and Jontes, J.D., 2013. Protocadherins, not prototypical: a complex tale of their interactions, expression, and functions. *Frontiers in molecular neuroscience*, 6(March), p.4.
- Weiner, J. a, Wang, X., Tapia, J.C. and Sanes, J.R., 2005. Gamma protocadherins are required for synaptic development in the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1), pp.8–14.
- Wojtowicz, W.M., Flanagan, J.J., Millard, S.S., Zipursky, S.L. and Clemens, J.C., 2004. Alternative splicing of Drosophila Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell*, 118(5), pp.619–33.
- Wu, Q., 2005. Comparative genomics and diversifying selection of the clustered vertebrate protocadherin genes. *Genetics*, 169(4), pp.2179–88.
- Wu, Q. and Maniatis, T., 1999. A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell*, 97(6), pp.779–90.
- Wu, Q. and Maniatis, T., 2000. Large exons encoding multiple ectodomains are a characteristic feature of protocadherin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), pp.3124–9.
- Wu, Q., Zhang, T., Cheng, J.F., Kim, Y., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Noonan, J.P., Zhang, M.Q., Myers, R.M. and Maniatis, T., 2001. Comparative DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters. *Genome research*, 11(3), pp.389–404.

- Yagi, T., 2013. Genetic Basis of Neuronal Individuality in the Mammalian Brain. *Journal of Neurogenetics*, 27(April), pp.97–105.
- Yagi, T., 2012. Molecular codes for neuronal individuality and cell assembly in the brain. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5(April), pp.1–11.
- Yagi, T. and Takeichi, M., 2000. Cadherin superfamily genes : functions , genomic organization , and neurologic diversity. *Genes & development*, 14, pp.1169–1180.
- Zhan, X.-L., Clemens, J.C., Neves, G., Hattori, D., Flanagan, J.J., Hummel, T., Vasconcelos, M.L., Chess, A. and Zipursky, S.L., 2004. Analysis of Dscam diversity in regulating axon guidance in Drosophila mushroom bodies. *Neuron*, 43(5), pp.673–86.
- Zou, C., Huang, W., Ying, G. and Wu, Q., 2007. Sequence analysis and expression mapping of the rat clustered protocadherin gene repertoires. *Neuroscience*, 144(2), pp.579–603.

Anexo

El trabajo desarrollado durante esta tesis fue presentado en las siguientes reuniones científicas:

Noviembre 2008

- XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular

Autores: Ferrero FV, Cramer P

Título: "Role of clustered protocadherins in cell adhesion and cell signaling"

Noviembre 2009

- XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular

Autores: Ferrero FV, Cramer P

Título: "Interactions between clustered protocadherins and their role in cell adhesion"

Diciembre 2010

- XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular

Autores: Ferrero FV, Cramer P

Título: "Homophilic interactions between protocadherins and their role in cell adhesion and cell signaling"

Octubre 2011

- XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular

Autores: Ferrero FV, Cramer P

Título: "Homophilic interactions of alpha protocadherins"

Índice

Resumen en castellano.....	2
Resumen en inglés.....	4
Agradecimientos.....	6
Abreviaturas.....	10
Introducción.....	12
Protocadherinas en cluster.....	15
Estructura génica y regulación de su expresión.....	15
Regulación epigenética de la expresión de las Pcdh en cluster.....	20
Procesamiento proteolítico.....	22
Cadherinas clásicas: los miembros más conocidos de la superfamilia.....	23
Dscam1: un ejemplo en Drosophila a tener en cuenta para estudiar las Pcdh.....	25
Hipótesis de trabajo.....	29
Objetivo general.....	31
Objetivos particulares:.....	31
Resultados.....	32
Presentación del sistema para el estudio de las Pcdh en cluster.....	33
Chequeo de la expresión de distintas construcciones en una línea celular neuronal..	34
+ Las distintas variantes de Pcdh alfa tendrían un diferente nivel de acumulación en la membrana plasmática.....	34
+ Las Pcdh testadas establecen interacciones exclusivamente homofílicas.....	42
Factores que influyen la acumulación de las Pcdh en la membrana celular.....	45
+ Las isoformas analizadas presentan diferencias en el patrón temporal con que se acumulan en los contactos entre células.....	45
+ No existiría un reciclado de Pcdhs una vez que estas están involucradas en una interacción en trans entre células.....	48
Funciones de las Pcdh alfa en adhesión celular e interacciones en trans.....	53
+ Las Pcdh alfa evaluadas no inducirían una fuerte adhesión celular.....	53
+ Las Pcdh alfa no mediarían interacciones dependientes del Ca ²⁺ extracelular...	57
Las Pcdh alfa sufren procesamiento proteolítico.....	59
Discusión.....	64
+ <i>Las distintas variantes de Pcdh alfa tendrían un diferente nivel de acumulación en la membrana plasmática.....</i>	65
+ <i>Las Pcdh alfa testadas establecen interacciones exclusivamente homofílicas... </i>	67
+ <i>Las isoformas analizadas presentan diferencias en el patrón temporal con que se acumulan en los contactos entre células.....</i>	68
+ <i>No existiría un reciclado de Pcdhs una vez que estas están involucradas en una interacción en trans entre células.....</i>	70
+ <i>Las Pcdh alfa evaluadas no inducirían una fuerte adhesión celular.....</i>	72
+ <i>Las Pcdh alfa no mediarían interacciones dependientes del Ca²⁺ extracelular</i>	73
+ <i>Las Pcdh alfa sufren procesamiento proteolítico.....</i>	74
Epílogo.....	76
+ <i>La expresión estocástica de las Pcdh está regulada por modificaciones epigenéticas durante el desarrollo.....</i>	77
+ <i>El patrón de expresión de cada isoforma del cluster alfa está determinado por su ubicación en el cluster génico.....</i>	78
+ <i>En el establecimiento de las interacciones homofílicas colaboran isoformas de los tres clusters.....</i>	79
+ <i>Las Pcdh alfa participan de la correcta formación de terminales en neuronas del sistema visual.....</i>	81
Materiales y Métodos.....	83

1. Cultivo de líneas Celulares	84
2. Transfecciones	84
3. Plásmidos y construcciones	84
4. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.....	88
5. Clonado de productos de PCR.....	89
6. Digestión por enzimas de restricción.....	90
7. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	90
8. Cuantificación de ADN	91
9. Ligación	91
10. Transformación bacteriana	92
11. Preparación de bacterias competentes	93
12. Preparación de plásmidos en pequeña escala (miniprep)	93
13. Preparación de plásmidos en gran escala (maxiprep).....	94
14. Secuenciación	94
15. Preparación de ADN copia o ADNc	94
16. Western Blot	95
17. Tinción de gel con Coomassie.....	97
18. Visualización de proteínas fluorescentes.....	98
19. Cuantificación de acumulación de proteína fluorescente en membranas.....	98
20. Acumulación de Pcdh alfa a distintos tiempos post-plaqueo en presencia/ausencia de Ca ²⁺	98
21. Efecto de Brefeldin A (BFA) en la localización de las Pcdh alfa	99
22. Efecto de la depleción de Ca ²⁺ con EGTA en el procesamiento de las Pcdh alfa	100
23. Ensayo de adhesión en suspensión	100
24. Ensayo de co-cultivos	101
25. Producción de proteínas en células de insecto usando un sistema de baculovirus	102
26. Purificación de proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad por ión metálico inmovilizado.	109
27. Desalado de la solución de proteína recombinante	110
28. Acople de proteína recombinante a microesferas fluorescentes.....	111
Bibliografía.....	113
Anexo.....	113
Índice	1255