Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

La familia de proteínas Lrig: nuevas funciones biológicas y mecanismos de señalización en neuronas

Hita, Francisco Javier

2016-07-27

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:
Hita, Francisco Javier. (2016-07-27). La familia de proteínas Lrig: nuevas funciones biológicas y mecanismos de señalización en neuronas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Hita, Francisco Javier. "La familia de proteínas Lrig: nuevas funciones biológicas y mecanismos de señalización en neuronas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-07-27.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

La familia de proteínas Lrig: nuevas funciones biológicas y mecanismos de señalización en neuronas.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS

Francisco Javier Hita

Director de tesis: Dr. Gustavo Paratcha

Consejero de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis" (IBCN UBA/CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Fecha de defensa: ____/____/____ Buenos Aires - 2016 _____

Firma

A Eugenia, Gerardo y José.

"La memoria guardará lo que valga la pena.

La memoria sabe de mí más que yo;

y ella no pierde lo que merece ser salvado"

Eduardo Galeano

Agradecimientos

A Gustavo y Fernanda, por mi formación, su esfuerzo y por haberme dado la oportunidad de transitar mi camino en su laboratorio.

A los chicos de la División de Neurociencia Molecular y Celular, por su aporte científico, humano y en más de una ocasión… culinario!: A Fer Alsina, por toda su ayuda y ser mi coequipo; a Pau Fontanet por su sinceridad y las diferencias, que también me enseñaron; a Lola Irala, por su paciencia y consejos; a Anto Bonafina, por su alegría y esfuerzo; y Facu Ferrero por su temperamento y gran humor.

A Hakan Heddman sin cuya ayuda esta historia nunca hubiese comenzado.

A Lidia Szczupak, mí ya dos veces consejera de estudios, por su puerta siempre abierta y su aporte generoso de tiempo y conocimientos para este gran despistado.

A Pedro Bekinschtein por su enorme generosidad y paciencia; guía que me enseñó todo cuanto se de comportamiento.

A los miembros del laboratorio de Transporte Axonal y Enfermedades Neurodegenerativas, por su tiempo, amistad y discusiones.

Al laboratorio de Memoria, en especial a Maria Eugenia Villar, por sus consejos, atenciones y los encuentros.

Al Centro de Neurociencias Clínica y Experimental, en especial a Belen Gori, por su gentileza en prestarme sus espacios y compartir sus ideas.

Al IBCN, la FCEN, la SAN, la ANPCyT, el CONICET, y el Instituto Balseiro por toda su contribución a mi formación.

A mi familia, por sus consejos, estar ahí y apoyarme siempre incondicionalmente.

A la familia elegida, mis amigos, quienes siempre mantienen mi ánimo y me recuerdan que al final del día, nada es tan grave.

A quienes no llegaron y sé que les hubiera encantado compartir este momento.

Glosario

ADAM17 o TACE (ADAM Metaloprotease 17 or tumor necrosis factor-α-converting enzyme; Metaloproteasa ADAM 17 o Enzima convertidora de Factor de Necrosis Tumoral)

ADHD (Atention Deficit Hiperactivity Disorder; Trastorno de hiperactividad con déficit de atención)

BDNF (Brain Derived Growth Factor; Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro)

BMP (Bone Morphogenic Protein; Proteina Morfogenica del Hueso)

CNV (Copy Number Variation; Variacion de Numero de Copias)

DRG (Dorsal root ganglia; ganglios de la raíz dorsal)

EGF (Epidermal Growth Factor; Factor de Crecimiento Epidérmico)

EGFR / ErbB (Epidermal Growth Factor Receptor; Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico)

Erk (Extracellular Signal Regulated Kinase; Quinasa Reguladora de la Señal Extracelular)

FGF (Fibroblast Growth Factor; Factor de Crecimiento Fibroblástico)

GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor; Factor neurotrófico derivado de células gliales)

GFRα1 (GDNF family receptors alpha1; Receptor de la familia de GDNF alfa1)

GFP (green fluorescent protein; proteína verde fluorescente)

GWAS (Genome Wide Asociation Study; Estudio de Asociacion de Genoma Completo)

HGF (Hepatosite Growth Factor: Factor de crecimiento hepático)

HPSE2 (Heparinasa-2)

MAPK (Mitogen activated protein kinase; Proteína kinasa activada por Mitógenos)

MEK (MAPK/Erk-kinase; kinasa MAPK/Erk)

MET o HGFR (Hepatosite Growth Factor Receptor; Receptor de Factor de crecimiento hepático)

NGF (Nerve Growth Factor; Factor de Crecimiento Nervioso)

NMDA (N-Metil D Aspartato)

NOR (Novel Object Recognition; Reconocimiento de Objeto Novedoso)

NT-3 (Neurotrophin 3; Neurotrofina 3)

NT-4 (Neurotrophin 4; Neurotrofina 4)

Lrig1 (Leucine-rich repeats y immunoglobulin-like domains protein 1; Proteína con domingios LRR y tipo inmunoglobulina 1)

Lrig2 (Leucine-rich repeats y immunoglobulin-like domains protein 1; Proteína con domingios LRR y tipo inmunoglobulina 2)

Lrig3 (Leucine-rich repeats y immunoglobulin-like domains protein 1; Proteína con domingios LRR y tipo inmunoglobulina 3)

LRR (Leucine-rich repeats; Dominio de proteína de repeticiones ricas en leucinas)

LRRTM (Leucine-rich repeats, transmembrane proteins; Proteína transmembrana con domingios LRR)

LTD (Long Term Depression; Deprecion de Largo Termino)

LTP (Long Term Potentiation; Potenciacion de Largo Termino)

OLT (Objec Location Task; Tare de reconocimiento de objetos)

PDGFR (receptor de factor de crecimiento plaquetario-B)

PI3K (Phosphoinositide 3-kinase; Fosfoinositol 3-kinasa)

PLCγ (Phospholipases C-gamma; Fosfolipasa C-gamma)

RET (RET "rearranged in transformation" proto-oncogene)

RTK (Receptor tyrosine kinase; Receptor tirosina kinasa)

SLR (Spotaneous Location Recognition Task; Reconocimiento Espontaneo de Localización de Objetos en condiciones de Similaridad)

SNP (Single Nucleotide Polimorphism; Polimorfismo de Nucleotido Unico)

TrkB (Tropomyosin receptor kinase B; Receptor kinasa B de tropomiosina)

UFOS (UroFacial Syndrome; Sindrome Uro-Facial)

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Biblioteca Digital FCEN-UBA

El acceso al resumen fue restringido a pedido del Autor.

At author's request access to the abstract has been restricted

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Biblioteca Digital FCEN-UBA

La sección “Publicaciones” ha sido retirada a pedido del autor.

At author’s request the section “Publicaciones” has been withdrawn.

Capítulo I

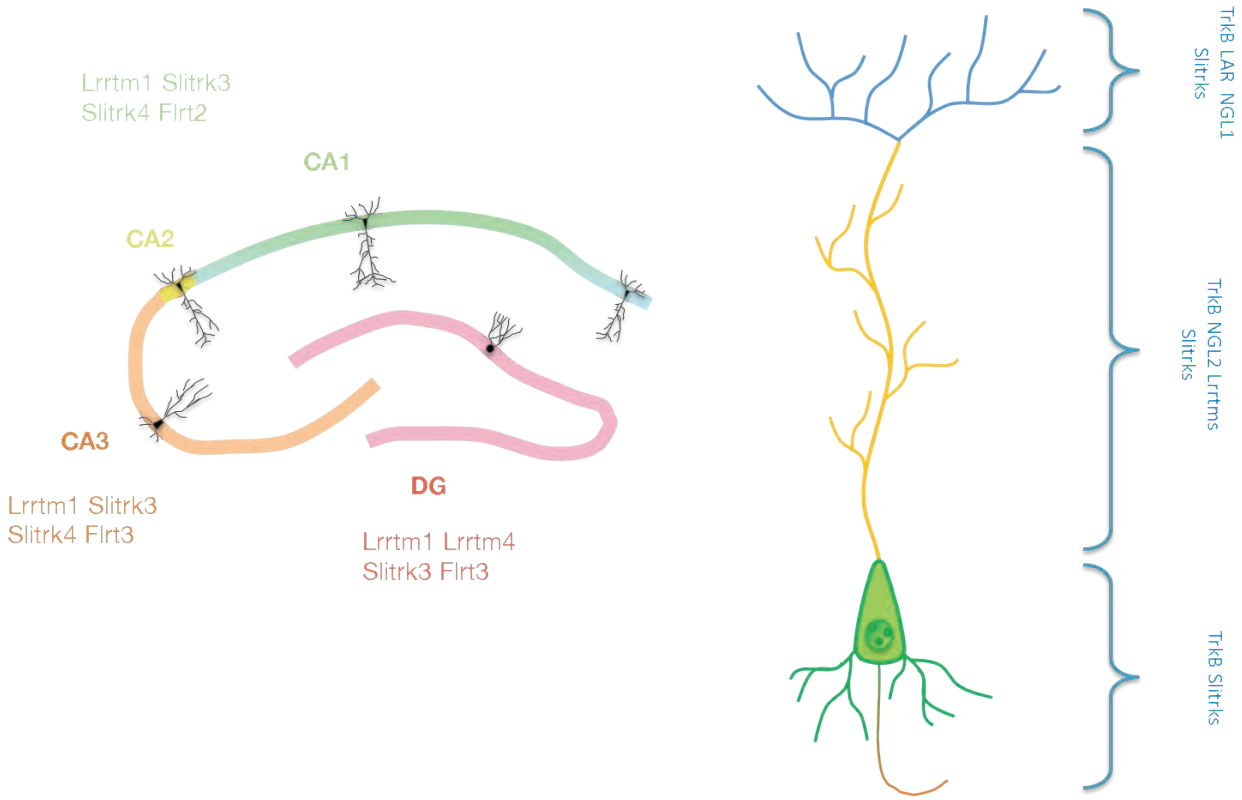
La familia de proteínas Lrig como moduladores de la morfología neuronal.

Introducción

La superfamilia de proteínas transmembrana conteniendo regiones ricas en leucina y dominios Inmunoglubulina (LRRIGs)

La superfamilia de proteínas LRRIG, proteínas compuestas por dominios ricos en leucinas e inmunoglobulinas; pertenece a un variable grupo de moléculas que presentan un excepcionalmente amplio repertorio de funciones estrechamente relacionadas con el desarrollo y mantenimiento de distintos sistemas en los organismos complejos [1, 2].

Ha habido un gran progreso en los últimos años en la identificación de nuevas moléculas de adhesión que contienen dominios LRR. Particularmente esto se debe al interés que han despertado al mostrarse como piezas claves para la formación de sinapsis y para el establecimiento de patrones de conectividad apropiados durante el desarrollo del sistema nervioso (Figura).



Localizacion diferencial de proteínas LRR en estructuras cerebrales y en subregiones neuronales. Grafica Izquierda. Proteínas LRR localizan en distintas areas del Hipocampo, controlando la conectividad entre estas y otras áreas cerebrales. Grafica Derecha. Diversas proteínas LRR se expresan en distintas subregiones neuronales, dirigindo la conectividad región-especifica de las neuronas (modificado de Control of neural circuit formation by Lucine-rich repeat proteins, Wit & Ghosh 2014).

Uno de los constituyentes de esta superfamilia son los receptores para neurotrofinas Trks (Tropomysisn-related kinase), los cuales median funciones de sobrevida neuronal, especificación celular, guiado axonal, crecimiento neurítico, formación sináptica y plasticidad neuronal [3-6]. Las LRRTMs, son otra familia de proteínas LRR

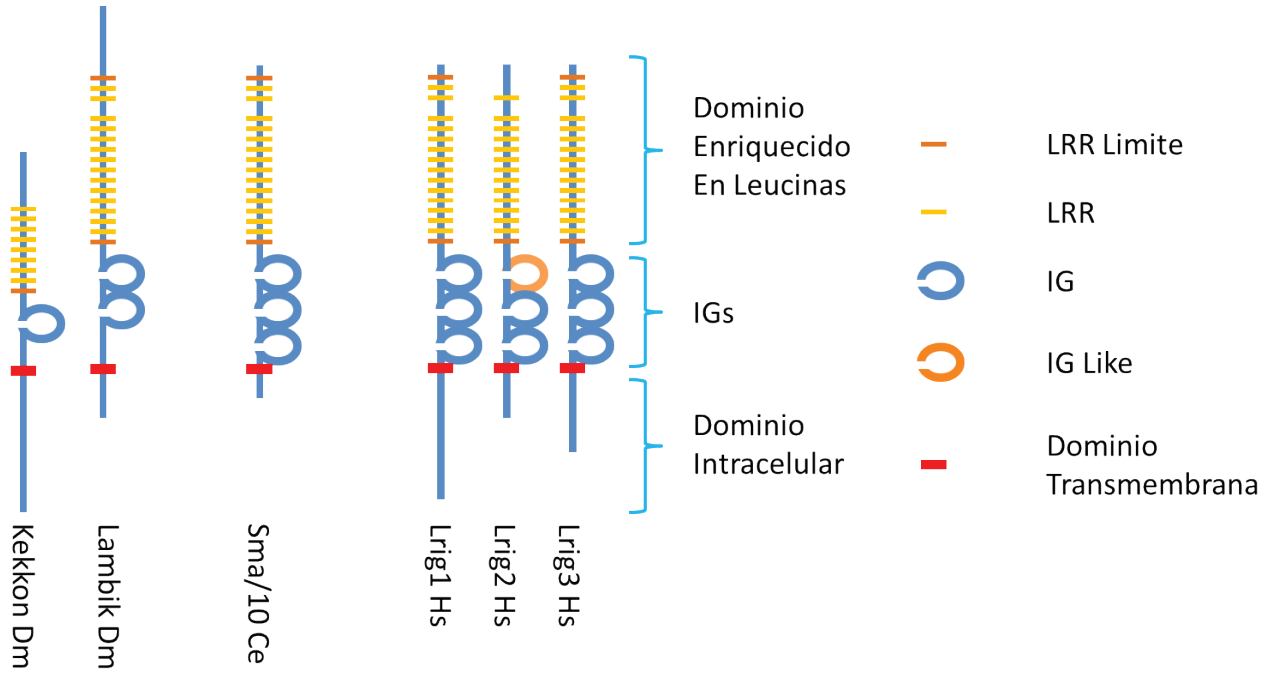
que poseen una gran variedad de interactores que hacen a su amplia gama de funciones. Son proteínas importantes en la formación, estabilización y mantenimiento de las conexiones sinápticas glutamatérgicas [7-18]. Las proteínas Amigo, están involucradas en el crecimiento y fasciculación de axones [19-22]. Las Slitrks, modulan tanto la formación de sinapsis glutamatérgicas (Slitrk1, 2, 4 y 5) como gabaérgicas (Slitrk3) y están fuertemente ligadas a desordenes de conectividad [10, 23-25]. Las proteínas NGL 1-3, que se expresan en distintas subregiones neuronales; y especifican las zonas de contacto de diferentes aferencias a neuronas piramidales de CA1 [26-32]. Existen muchas otras proteínas LRRs que también han sido vinculadas a diversos trastornos mentales humanos y que poseen localizaciones estructurales o neuronales muy específicas; dando a entender que hacen también al reconocimiento o identidad de dicha estructura o región neuronal. Estudiar este tipo de proteínas no solo debería mejorar nuestra comprensión acerca de cómo la subestructura sináptica contribuye a la función de los circuitos y estos a su vez al comportamiento, sino también al entendimiento de estas patologías. Es por ello que la elucidación de sus interacciones, la comprensión de su rol en el desarrollo de los circuitos y su papel en la plasticidad sináptica, cobra especial relevancia.
Sin embargo y sorprendentemente, poco es lo que se conoce sobre el grupo de proteínas que dan efectivamente el nombre a esta gran superfamilia, las proteínas transmembrana llamadas Lrigs.

Lrigs1-3. Identificación, genética, estructura, mecanismos y funciones conocidas

Formalmente, los invertebrados cuentan solo con una única variante génica de las proteínas Lrigs; Lambik en Drosophila Melanogaster y Sma10 en Caenoabditis Elegans [33]. En contraparte, existen tres genes parálogos de Lrig en mamíferos; particularmente en humanos el gen Lrig1 ubicado en el cromosoma 3p14.3 [34], el de Lrig2 ubicado en 1p13 [35], y Lrig3 en 12q13.2 [36]. Estos mismos loci se presentan en regiones sinténicas en el genoma de ratón, cromosomas 6D2, 3F2 + 2, y 10D2, respectivamente. Curiosamente, todos los genes Lrigs de ratón, y al menos dos de humanos, poseen una misma secuencia de consenso Kozak gxxATGg que rodea el codón de iniciación de la traducción. Además todos ellos están compuestos de entre 18 y 20 exones, de los cuales los primeros 17 muestran la misma estructura exón/intrón. Cada uno de ellos con sus propias variantes de corte y empalme alternativo (splicing) que difiere según la especie en que se encuentren. Esta homología tan estrecha entre distintas especies sugiere que su expansión en el genoma se debió a duplicaciones e inserciones cromosómicas, que ocurrieron en algún punto posterior al desarrollo de los insectos y previo al surgimiento de los vertebrados.

A nivel estructural, las proteínas transmembrana Lrigs en mamíferos están compuestas exclusivamente por tres dominios inmunoglobulina en su región yuxtamembranal externa, y entre trece y quince repeticiones ricas

en leucina flanqueadas por regiones ricas en cisteína en su región extra-celular distal; en tanto que su región intracelular presenta longitudes variables y posee escasos dominios reconocibles [36-38].



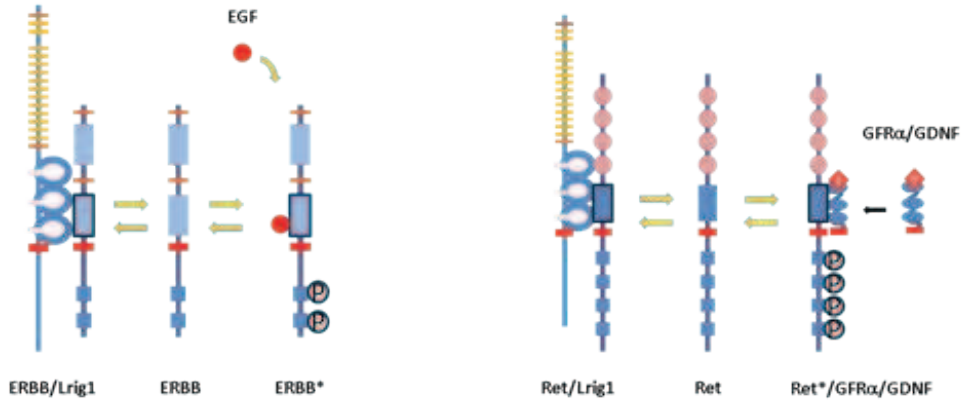
Estructura de las proteínas Lrigs de Mamiferos y sus hortologos en Drosophila Melanogaster (Dm) y Caenorabditis Elegans (Ce).

No es solo su estructura lo que parece mantener la identidad de estas proteínas a través de las distintas especies; sino también su fuerte capacidad modulatoria sobre receptores de factores tróficos o de crecimiento. Aun así, tanto su patrón de localización y expresión, como el creciente número de evidencia reportada en estos últimos años; sugieren que su participación en la regulación de funciones endógenas y moleculares puede ser muy distinta, e incluso antagónica. En efecto, las proteínas Lrigs están expresadas en una gran variedad de órganos y tejidos en los mamíferos y sus niveles de expresión relativa son muy variables [34, 36]. A modo de ejemplo, los embriones de ratón al décimo día de gestación, presentan una expresión de Lrig1 y Lrig2 con amplia localización en sistema nervioso; mientras que Lrig3 posee una localización en este tipo de tejido muy restringida y más ubicua en tejidos no nerviosos [1].

Lrig1, Lrig2 y Lrig3: Mecanismos de acción

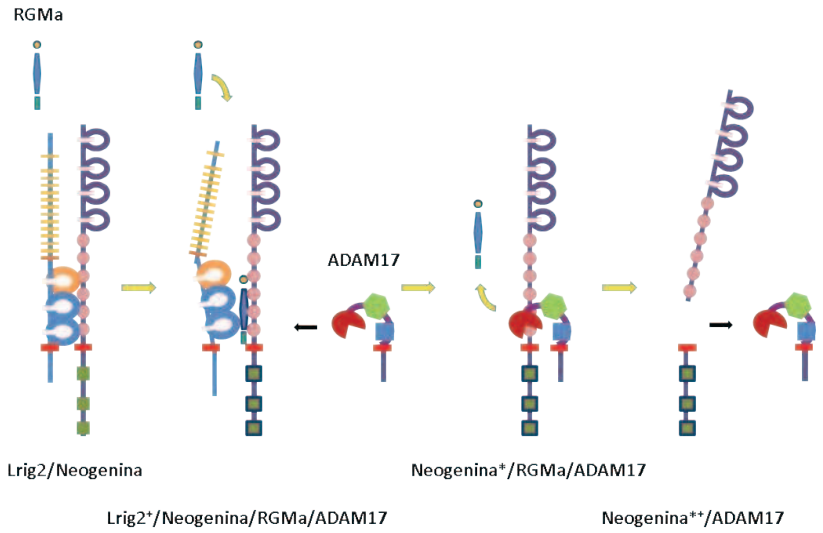
En líneas generales, aún se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que gobiernan o que son gobernados por los distintos miembros de esta familia Lrig1, Lrig2 y Lrig3. No obstante existe un importante consenso acerca del funcionamiento molecular de Lrig1, el cual pareciera ser un regulador negativo de receptores tirosina kinasa a nivel genérico. Aunque no es claro si es una forma canónica de actuar, su mecanismo de inhibición pareciera inducir el aumento del etiquetado por ubiquitina de aquellos receptores a los que se asocia; lo cual acelera su degradación y reduce toda señalización mediada por estos últimos [39].

Por otra parte este mecanismo no pareciera ser su único modo de regular respuestas de receptores kinasa. El mecanismo de inhibición de Ret por parte de Lrig1 consiste en el secuestro del primero fuera de las balsas lipídicas; impidiendo por antagonismo y restricción, que este se una al complejo co-receptor GDNF-GfrAlfa para activarse [40]. Notablemente, el mecanismo mediante el cual Lrig1 inhibe a PDGFRA aún es desconocido.



Mecanismos de acción de Lrig1. Grafica Izquierda. EGF se acopla a su receptor ERBB, causando la autofosforilacion de este e iniciando su cascada de senializacion. En presencia de Lrig1, se establece un complejo entre ERBB y Lrig1. Esta interacción por un lado inhibe la unión de EGF por antagonismo y la consecuente autofosforilacion del receptor. Por el otro, induce el reclutamiento de cbl-c y la maquinaria de ubiquitinacion, iniciando un sistema de control de la respuesta, mediante degradación del receptor. Grafica Derecha.GDNF se une a GFRa1, correceptores anclado a GPI, en las balsas lípidicas, resultando en el reclutamiento y la activación del correceptor Ret en este compartimiento. Una vez activado, Ret se redistribuye dentro y fuera de las balsas lipidicas. En presencia de LRIG1, se establece una union entre Ret y LRIG1. Esta interacción inhibe el reclutamiento de Ret hacia las balsas lipídicas, la unión del ligando, la autofosforilación del receptor, y la señalización de Ret.

Por otra parte, Lrig2 y Lrig3, no parecen tener la misma capacidad para modular la actividad de los receptores modulados por Lrig1. En efecto Lrig2 parece no alterar los niveles de los receptores arriba mencionados e incluso Lrig3 parece aumentar la expresión de ErbBs 1-4 mediante un antagonismo con Lrig1 [41, 42]. Solo recientemente se supo que Lrig2 es capaz de proteger al receptor de Neurogenina hasta su activación por el ligando RGMa. Una vez activado, se separa de este y reduce su propia expresión en membrana; esto permite que Neurogenina sea sensible a clivaje por parte de ADAM17 y la actividad de Neurogenina mediada por RGMa sea abolida [43].



Mecanismo de acción de Lrig2. La asociación de Lrig2 a neogenina cumple un rol esencial en el control temporal de la sensibilidad de las fibras optias a RGMa, durante el guiado axon

Lrig1

El grupo del Dr. Satoshi Itami de la Universidad de Osaka observó que en una cepa mixta (129S7/SvEv y C57BL/6) de ratones Lrig1-KO (neo/neo) desarrollaban lesiones con hiperplasia epidérmica en cola, cara y orejas similares a las observables en pacientes humanos que padecen de psoriasis [44]. Notoriamente los queratinocitos carentes de Lrig1 se caracterizaban por ser hiperproliferativos y malformados. Junto con su grupo, supusieron que la desregulación endógena de EGFR por Lrig1 era responsable de estas lesiones. En efecto, Lrig1 ha sido identificado como un regulador negativo de varios receptores tirosina Kinasas (RTKs) tales como ErbBs 1-4 [39, 45] EGFRv3 [46], Met [47], Ret [40], y PDGFRA [42].

Recientemente se identificó a Lrig1 como regulador y marcador endógeno de distintas poblaciones de células progenitoras [48-51]. En estos estudios, la sobreexpresión de Lrig1 redujo la proliferación de células epiteliales humanas y la activación de las vías inducidas por el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Esta reducción en la respuesta se encuentra mediada principalmente por un antagonismo de Lrig1 sobre el receptor de EGF (ERBB 1-4). En acuerdo con esto, el silenciamiento de Lrig1 sobre células progenitoras de la piel es capaz de promover su proliferación.

En el trabajo de Powel y colaboradores [52], ratones de 5-6 meses de edad, Lrig1 KO (CreERT2 / CreERT2), desarrollaron adenomas duodenales con aumento de expresión de ERBB1, ERBB2, y ERBB3; proporcionando evidencia in vivo del papel de Lrig1 como un regulador negativo de los receptores ERBB. También se examinó la expresión de Lrig1 en las células progenitoras intestinales a través del uso de la tecnología de animales reporteros. La marca de Lrig1 se localizó en la base de las criptas del intestino delgado y el colon, en células progenitoras proliferativas de la base. Si bien existen algunas diferencias entre los estudios originales realizados por Jensen [50], y por Levy [52], ambas pudieron ser zanjadas [53] y resaltaron la importancia de Lrig1 como regulador de la homeostasis del sistema entérico al ser capaz de inhibir las respuestas mediadas por los receptores ERBB. En coincidencia con estos hallazgos, otra variante de los ratones Lrig1 KO, retro-cruzados con la cepa FvB, presentan abdómenes anómalos. En ellos, la población de células progenitoras presentan un gran índice de expansión, además el nivel de proteína y activación de los receptores EGFR, ERBB2, ERBB3 y MET se encuentran aumentados, no así su mensajero; lo cual argumentaría en favor de una relación antagónica a nivel de membrana entre Lrig1 y estos receptores.

Los estudios de Suzuki y colaboradores localizaron la expresión de Lrig1 en el epitelio de la tráquea y los primeros arcos bronquiales. Ratones carentes de Lrig1 [44], neo / neo), observaban una importante expansión

de la tráquea y del epitelio bronquial, acompañado por aumento de la fosforilación de EGFR, proporcionando otra relación entre Lrig1 y EGFR. Dado que EGFR cumple un rol central en la regulación de cáncer de pulmón [54]; Lu y colaboradores [51] examinaron el impacto de la eliminación Lrig1 sobre la homeostasis de las vía aérea. Cultivo de células epiteliales de tráquea de ratón carentes de Lrig1, mostraron un incremento en la tasa de proliferación celular aun cuando hubieran llegado a confluencia, correlacionando positivamente con los niveles de activación de EGFR en dichos cultivos. Si bien los mecanismos por los cuales Lrig1 regula la inhibición del crecimiento por contacto no son del todo comprendidos, Lu sugirió que podría estar relacionado a un complejo ternario EGFR / Lrig1 / E-cadherina que oficiaría de presentador o estabilizador de la unión EGFR-E-caderina hallada por Qian y colaboradores [55]; aunque esto último aún falta ser confirmado.

Por otra parte, las células progenitoras epiteliales de la córnea humana poseen un alto nivel de expresión de Lrig1 [56]. El análisis de ratones carentes de la proteína Lrig1 (Suzuki et al. 2002, neo / neo) reveló un importante deterioro del epitelio de la córnea, caracterizado por un importante engrosamiento y queratinización del estrato epitelial y una importante inflamación del estroma. Esta manifestación se inicia a los 6 meses de edad y presenta una expresión del orden del 70% en ratones de 24 meses de edad. A nivel tisular, las células epiteliales de ratones carentes de Lrig1 son más proliferativas y muestran evidencia de un cambio en el destino de la celular, virando de epitelio de la córnea, a epitelio queratinizado. A su vez, ensayos de regeneración epitelial revelaron un déficit en la capacidad de recuperación de este tejido en animales Lrig1-KO. En circunstancias de injuria, los tejidos provenientes de estos animales presentan un mayor nivel de activación de STAT3 en núcleos de células epiteliales. Sugiriendo que parte de las vías de señalización implicadas en esta respuesta estarían mediadas por este factor de transcripción. En efecto, ensayos de ganancia de función (de STAT3) en células de la capa basal del epitelio corneal presentan características fenotípicas muy similares a las presentes en el animal Lrig1 KO. En contraparte, ensayos de inhibición de STAT3 por STA21 previnieron la opacidad corneal inducida por lesión en los ratones Lrig1 KO, fortaleciendo la hipótesis de una regulación de la vía de STAT3 por parte de Lrig1. No obstante, los mecanismos por los cuales Lrig1 regularía la vía STAT3 aún son desconocido.

Nada se había estudiado acerca de las funciones de Lrig1 en el sistema nervioso hasta los estudios realizados por Ledda y colaboradores [40]; quienes demostraron que Lrig1 es un inhibidor endógeno del receptor tirosina kinasa RET (Rearranged in Transformation). Este receptor es uno de los principales mediadores de la respuesta biológica inducida por el Factor Neurotrófico Derivado de la Glia (GDNF). En ese trabajo ellos localizan la expresión de Lrig1 y RET en ganglios anexos de la raíz dorsal y describen la dinámica de asociación por la cual Lrig1 secuestra a RET, impidiéndole su ingreso a la región de balsas lipídicas y su asociación con su co-receptor

GFRa1 para formar al complejo cooreceptor GDNF-GFRa1-RET. La asociación de Lrig1 con RET da como consecuencia una inhibición por antagonismo en las vías de señalización mediada por RET y GFRa1 e inducida por GDNF; que en principio es capaz de reducir la diferenciación morfológica de neuronas del ganglio superior cervical en cultivo. Así mismo, ellos postulan que estos mismos mecanismos podrían estar operando en neuronas del ganglio de la raíz dorsal y del ganglio superior cervical en animales vivos.

Es llamativo que sólo el trabajo de Ledda y colaboradores ahondó en los posibles roles de Lrig1 en el sistema nervioso, siendo que en la actualidad ningún estudio ha explicado aún la relevancia de esta proteína en el cerebro, donde curiosamente encuentra su mayor expresión a lo largo de todos los sistemas de órganos [34, 57].

Lrig2

Los primeros esfuerzos por dilucidar las funciones biológicas de Lrig2 se relacionaron a las características conocidas de Lrig1 y su capacidad anti tumoral. En efecto, Lrig2 resulto ser un marcador asociado a una pobre tasa de sobrevida de pacientes con oligodendrogliomas [58]. En este contexto, Rondahl y colaboradores abordaron el estudio de las funciones biológicas de Lrig2 con vistas en la génesis de oligodendrogliomas in vivo [42] utilizando un modelo de glioma inducido. En su modelo, la inducción del tumor se provoca por la infección vírica con factor de crecimiento plaquetario-B (PDGF-B) en ratones salvajes o deficientes para Lrig2. En este ensayo, la agresividad del tumor inducido presento una dependencia del genotipo de Lrig2 de modo que aquellos ratones deficientes en dicha proteína exhibían tumores de menor grado e incidencia respecto de aquellos inducidos en ratones salvajes. Curiosamente, Lrig2 no tuvo ningún efecto aparente sobre la expresión o fosforilación de los receptores de PDGF B (ni tampoco de A), ni efecto en la fosforilación de las vías de AKT o ERK1/2; efectores de la cascadas de señalización río abajo de la activación de PDGFR. Consecuentemente, el mecanismo por el cual Lrig2 influencia la señalización mediada PDGF, aún es elusivo.

Por otra parte, al igual que Lrig1; Lrig2 es capaz de afectar la señalización mediada por EGFR en células de glioma humano [59]. Sin embargo, el silenciamiento de la expresión de Lrig2 en la línea celular GL15 derivada de glioblastoma induce un aumento del reciclado del receptor de EGF y una disminución de la fosforilación de EGFR dependiente de EGF, además de una disminución del crecimiento celular y un aumento en la apoptosis. Inesperadamente, esta inhibición también indujo un incremento en las propiedades invasivas de esta línea tumoral in vitro. Lo que sugeriría que Lrig2 juega un rol promotor en esta vía de señalización y podría desempeñar un rol en procesos neoplásicos.

El trabajo de Stuart y colaboradores [60] mostro nuevas posibles funciones endógenas de Lrig2. Una muta-

ción alélica de Lrig2 resulta ser responsable de una variante del síndrome de Ochoa [61] o síndrome urofacial (UFOS). El síndrome urofacial es un trastorno hereditario de tipo autosómico recesivo, caracterizado por presentar expresiones faciales invertidas [62]. Poco antes de la identificación de Lrig2 como causante de este síndrome, se identificó a una mutación bialélica de la heparinasa-2 (HPSE2) como otro posible causante de UFOS [63, 64]. Dado que ambas mutaciones parecieran ser causantes de UFOS, se ha propuesto que HPSE2 y Lrig2 participan de una misma vía, que en caso de verse afectada puede conducir a fallas de señalización de receptores de FGF2 [65]. Tanto Lrig2 y HPSE2 se coexpresan en la vejiga del feto humano y han sido localizada en fascículos nerviosos que inervan la pared de la vejiga [60, 63] esta información junto a la detección de la expresión de Lrig2 en los pares craneales V y VII, nervios faciales motores y sensitivos respectivamente [1], sugiere una participación del sistema nervioso periférico en el síndrome. En coincidencia con esta información, se ha visto que la inhibición de la expresión de HPSE2 lleva a un incremento de señalización mediada por FGF2, lo que lleva a un desarrollo anómalo de motoneuronas [65]. Por otra parte, van Erp y van den Heuel han demostrado recientemente que Lrig2 es un actor principal en la regulación de la quimotaxis axonal dependiente del Neurogenina y RGMa [43]. Este trabajo expone la relevancia de Lrig2 en procesos claves para el desarrollo del sistema nervioso central. En él se describe a Lrig2 como una molécula capáz de asociarse a Neurogenina para desempeñar una acción protectora preventiva de la acción de la α-metaloproteasa ADAM17. Más importante aun, muestra el rol funcional que tiene esta protección, en el fino control temporal de eventos que permite que RGMa pueda ejercer su acción repulsiva mediada por Neurogenina en el guiado del nervio óptico. Explica el mecanismo molecular por el cual solo luego de la unión de RGMa a Neurogenina, ADAM17 produce la escicion de esta ultima; desensibilizando entonces al nervio de la acción del quimorepulsor. Interesantemente, estos resultados se presentan, según los autores, prometedores tanto para explicar las fallas de inervación observadas en el síndrome urofacial como en el campo de terapias de regeneración del nervio óptico.

Lrig3

En búsqueda de los reguladores de la morfogénesis del oído se identificó a Lrig3 como participe esencial del desarrollo del canal lateral del oído interno [66]. Los animales Lrig3 KO (Lrig3flox, C57Bl6), presentan un desarrollo anómalo del oído interno, que muestra una fusión del canal lateral. En estos animales el desarrollo de este canal comienza tempranamente e incluso se extiende por fuera de los límites de su localización normal. Este mismo fenotipo también se observó en ratones en los que Lrig3 fue específicamente eliminado del epitelio ótico [38]. La ausencia de Lrig3 en esta estructura expande la localización del ARNm de Netrina1 (proteína de secreción relacionada con la guía de axones comisurales en médula espinal y otras funciones de guiado [67, 68]. A pesar de que se pudieron observar interacciones directas entre Lrig3 y los receptores ERBB in vitro, estas no parecieran participar de la regulación cruzada entre Lrig3 y Netrina1 en este sistema [38]. Los autores sugie-

ren que el mejor candidato para controlar este sistema sería el receptor de FGF, no sólo porque Lrig3 es capaz de unirse e inhibir a sus receptores FGF [69], sino también por la importante contribución de la señalización de FGF durante la morfogénesis del canal, que promueve la formación de la placa fusiforme y la proliferación del mesénquima periótico [70]. En concordancia con su hipótesis, Lrig3 es requerido para la formación de la cresta neural en Xenopus Leavis, proceso dependiente de FGF, BMP, y WNT [69]. Experimentos de silenciamiento para reducir la expresión de Lrig3 endógeno, demostraron que este es necesario para la inducción de marcadores de la cresta neural como SLUG TWIST, Foxd3 y SOX9. A su vez, se encontró que Lrig3 potencia la señalización WNT e inhibe la señalización mediada por FGF, tanto en Xenopus como en líneas celulares. Además, Lrig3 es capaz de interactuar con el receptor de FGF tipo 1 e inhibir su actividad, proporcionando un mecanismo plausible por el cual Lrig3 atenuaría la señalización mediada por FGF. El mecanismo por el cual la vía de WNT es potenciada aún es desconocido. Sin embargo algunos autores sugieren que podría ser regulada del mismo modo que Sma-10, el único Lrig de Caenorhabditis elegans, que potencia la señalización mediada por la proteína morfogenica oseas (BMP). Esta regulación controlaría el tamaño corporal del gusano [33]. Según este estudio la mutante alélica de Sma-10 genera un fenotipo de menor tamaño que el del animal salvaje, y que sorprendentemente, Lambik (única proteína Lrig de Drosophila) es capaz de rescatar, sugiriendo un rol conservado de la función en la evolución.

Lrigs en Cáncer

Esta tesis versa sobre nuevas funciones biológicas mediadas por las proteínas Lrigs en el sistema nervioso. Sin embargo, a efectos de presentar una visión completa acerca de las mismas, resulta importante destacar el rol por el cual fueron estudiadas inicialmente, sus propiedades antitumorales. Dado el gran número de patologías tumorales que presentan disminuciones o eliminaciones de Lrigs, y la capacidad de estas proteínas para modular la actividad de RTKs; el estudio de estas cobro un fuerte impacto en grupos de investigación que estudian cancer. Notablemente, con frecuencia se observa ausencia de Lrig1 en neoplasias de pulmón, piel, intestino, colon y otros. Incluso, la sobrexpresion de Lrig2 se presenta en formas tumorales superagresivas y con baja prognosis de sobrevida. Por estas características, en un principio se las pensó como buenos marcadores de la prognosis tumoral [58, 71-78]. Luego, con el descubrimiento de que Lrig1 presenta una forma soluble capaz de mantener efectos inhibitorios sobre RTKs [79, 80], surgieron nuevas expectativas sobre esta proteína como posible agente terapéutico para tratar patologías asociadas a la desregulación de la homeostasis celular. No obstante dado el gran desconocimiento que aún se tiene sobre las funciones endógenas, y las notorias diferencias en las funciones putativas que presentan cada uno de los miembros de las Lrigs, se considera que aún se requiere de más investigaciones antes de promoverlas para su uso en la terapéutica [81].

Como fuera ya mencionado anteriormente, si bien existe un creciente número de publicaciones que localizan la expresión de las proteínas Lrigs en estructuras pertenecientes al sistema nervioso, como lo son la corteza cerebral y el hipocampo, entre otras, pocos son los estudios que ahondan en comprender los roles que estas proteínas juegan en estas estructuras [1, 40, 43, 69] tan relevantes para el desempeño cognitivo de los animales. En este contexto, resulta atractivo comprender la anatomía y conectividad de estas estructuras; y la relación espacio temporal de la expresión de estas proteínas LRR, en ellas durante el desarrollo.

El hipocampo, estructura y conexiones

A nivel anatómico esta estructura pertenece al sistema límbico del telencéfalo de los mamíferos. En su segmento dorsal anterior se ubica justo por debajo de las cortezas y por encima de los ventrículos laterales; mientras que en su segmento ventral cada hipocampo va acercándose hasta unirse cerca de la base del lóbulo temporal. Cada uno de estos segmentos es capaz de generar conexiones con distintos núcleos a lo largo del cerebro de forma independiente y por tanto con circuitos neuronales distintos, integrando de este modo la información de un amplio repertorio de estructuras.

El hipocampo está compuesto por varias subregiones, cada una con funciones diferentes entre sí. Principalmente existen dos grandes regiones fácilmente reconocibles; el Cuerno de Ammon (CA1-CA3) y el Giro Dentado (CA4 para algunos) que dan la forma de tubo curvado tan característico de esta estructura. Por otra parte se encuentra íntimamente relacionada con subestructuras de delimitación más difusa, como el Subiculo (divisible en presubiculo, subiculo y parasubiculo) y la Corteza Entorrinal que de algún modo también hacen a una organización estructural mayor llamada estructuras parahipocampales. Estas últimas, junto con el hipocampo contralateral, son las principales aferencias y eferencias del hipocampo.

Desarrollo Hipocampal

El hipocampo ha sido una de las primeras estructuras en ser estudiadas por las neurociencias. La misma tiene origen en el Palium, y carece de estructura laminar por lo que pertenece a las arqueocortezas [82-91] El proceso de neurogenesis en el desarrollo hipocampal comienza a partir del estadio embrionario 10 de ratón y 16 de rata, y acaba aproximadamente en el último día gestacional, dia 19 de raton y 21 de rata. Inicialmente, las células progenitoras de las neuronas piramidales del hipocampo surgen desde las capas germinales neuroepiteliales que se encuentran justo por debajo de la pared ventricular a lo largo de la región CA1. Estas luego migran desde la zona ventricular directamente hacia su posición final [92, 93]; en tanto que aquellas que darán origen a la región CA3 continúan su migración por al menos 3 o 4 días más hasta llegar a destino.

Por otra parte las células progenitoras de las neuronas granulares conservan el mismo origen neuroepitelial que el de las piramidales; iniciando su migración hacia la región del Hilux un día después del comienzo de la migración de las piramidales. Estas células postmitóticas deben migrar desde la capa germinal ventricular a lo largo de la región CA1 del hipocampo ya formado, atravesando un estrecho corredor delimitado por el alveus y un incipiente estrato oriens hacia el extremo de la región CA3. Una vez allí, comienzan una nueva etapa neurogenica que dará forma y función al giro dentado. Destacablemente, si bien las células granulares presentan un pico neurogénico perinatal más tardío que el de las piramidales; a diferencia de la gran mayoría de las neuronas (o de todas, en el ser humano) continuara con este proceso por el resto de la vida del individuo y solo mermara durante el envejecimiento [94].

Además de estos dos tipos neuronales principales, es importante incluir a las neuronas responsables de regular el circuito local del hipocampo; las interneuronas gabaergicas. El sitio de origen de estas neuronas es la zona subventricular del ventrículo y la eminencia ganglionar lateral medial. Estas migran y se localizan en el Hilux o sus estratos correspondientes (molecular, oriens y radiatum) mucho antes de que las neuronas de la CA1, CA2 y CA3 o las granulares inicien sus etapas neurogenicas, lo cual sugiere que podrían estar modulyo la morfogénesis de estas neuronas de un modo u otro [89, 90].

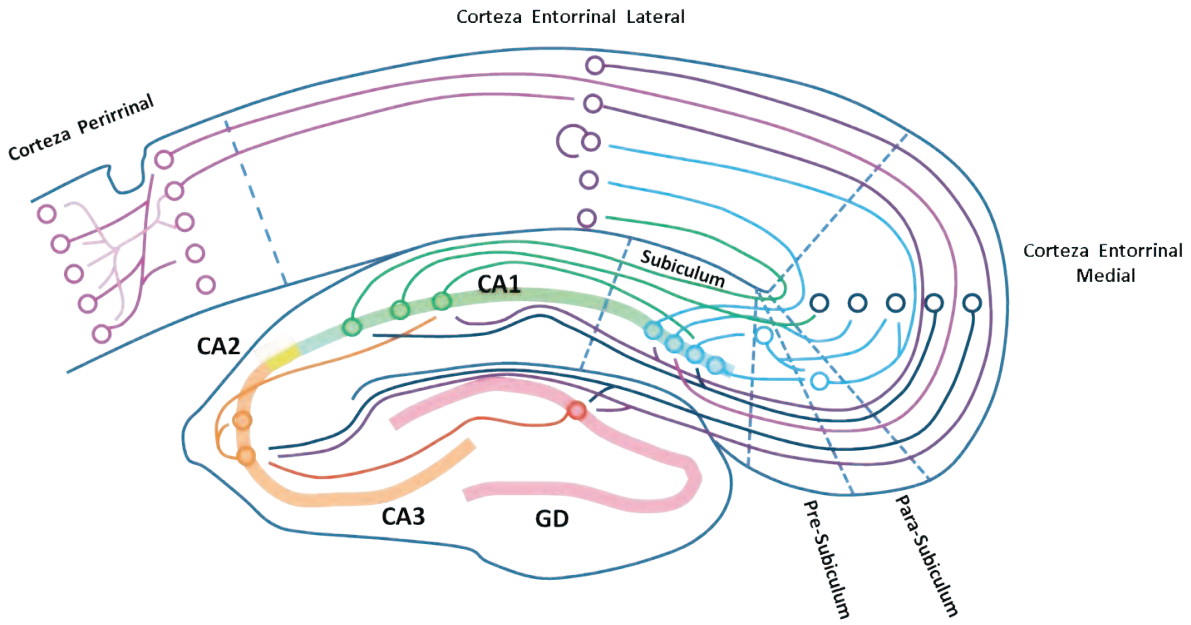
Conexiones aferentes y eferentes del hipocampo

El hipocampo recibe inervación de tres vías principales distintas, la via entorrinal, la comisural y la septal. La primera se desarrolla concurrentemente con el fin de las etapas neurogenicas y el comienzo de la dendritogenesis, estableciéndose plenamente en el fin de la dendritogenesis de las células granulares que es más tardía. Mientras que las otras dos intervienen en los circuitos hipocampales, perinatalmente, cuando los arboles dendríticos ya han comenzado a desarrollarse.

La via entorrinal de características exitatorias posee dos pares de vias de ingreso principales al hipocampo, ambas provenientes de la capa II/III de Corteza Entorrinal. Estos pares provenientes de la Corteza Entorrinal Lateral y de la Corteza Entorrinal Medial se asocian de forma mixta de modo de que cada inervación posea fibra de ambas regiones de esta corteza. El primer paquete de fibras ingresa por giro dentado atravezando el estrato molecular de las granulares donde realiza contactos sinápticos con estas y continua hacia la CA3 para inervar la región apical de estas neuronas en el estrato radiatum. El segundo paquete de fibras ingresa a traves del Subiculo, donde inerva sus piramidales y continúa hacia el estrato lacunosum moleculare inervando a las piramidales de CA1. A partir de aquí comienzan una serie de conexiones intrínsecas del hipocampo que cierra

un circuito reverberante fundamental para su función. Las células Granulares del Giro Dentado inervan a las células piramidales de la CA3 a través de las fibras musgosas dentro del estrato radiatum. Las neuronas piramidales de la CA3 además de emitir conexiones recurrentes en el estratum oriens, proyectan hacia las piramidales de CA1 por medio de las fibras de Schaffer dentro del estrato radiatum. Finalmente, las células piramidales de la CA1 proyectan hacia las piramidales del Subiculo y la capa IV/V de la Corteza Entorrinal Lateral y Media; y las piramidales del Subiculo a su vez proyectan hacia la capa IV/V Corteza Entorrinal.

La vía comisural, proviene de las neuronas piramidales de la CA3 y células musgosas del Hilux que proyectan a través de la comisura del hipocampo hacia el hipocampo contralateral y el Giro Dentado. Mientras que las fibras provenientes de la CA3 inervan al estrato radiatum de las CAs y al Molecular de las Granulares; las fibras musgosas comisurales inervan las dendritas basales de las neuronas piramidales de la CA3 en el estrato Oriens. La via septal posee dos partes: una colinérgica y otra gabaérgica. Los progenitores de ambas se encuentran en el área subcallosa, el giro paraterminal y la sustancia perforada anterior de la banda diagonal del área septal medial; y conectan al área septal medial y área olfatoria lateral con el hipocampo. Particularmente las fibras colinérgica no arriban a ninguna capa específica del hipocampo si bien se hallan inervando con mayor frecuencia a la capa de cuerpos neuronales. En contraste, las células gabaérgicas muestran una gran especificidad al inervar casi exclusivamente a las interneuronas gabaérgicas del hipocampo.



Estructura y conectividad del circuito local hipocampal. Mapa esquemático de las aferencias y eferencias del circuito hipocampal y parahipocampal y de corteza perirrinal.

La corteza perirrinal, estructura y conexiones

La corteza perirrinal es una región cortical en el lóbulo temporal medial que se compone de dos áreas, 35 y 36. Recibe información sensorial altamente procesada de todas las regiones sensoriales. Limita caudalmente con la corteza postrhinal, el hipocampo y ventro-medialmente, por la corteza entorrinal. El área 35 carece de la capa IV por completo mientras que el área 36 tiene la capa IV pero parece estar menos definida, particularmente en las porciones mediales de la corteza, en comparación con otras áreas neocorticales [95].

Desarrollo Perirhinal

Al igual que en las otras cortezas, el desarrollo de la corteza Perirrinal es parte un proceso complejo y finamente sincronizado del desarrollo cerebral. La corteza se desarrolla desde la región anterior de la placa neural, una parte especializada del ectodermo embrionario [96]. La placa neural se pliega y se cierra para formar el tubo neural. Desde la cavidad interior del tubo neural se desarrolla el sistema ventricular, y a partir de las células epiteliales de las paredes ventriculares, se forman las neuronas y células gliales del sistema nervioso. Es la región anterior (frontal o craneal) de la placa neural, el prosencéfalo, es quien da lugar luego a los hemisferios cerebrales y las respectivas cortezas.

Las neuronas corticales se generan dentro de la zona ventricular, junto a los ventrículos. Al principio, esta zona contiene progenitores que se dividen para producir células gliales y luego neuronas [97]. Las fibras gliales producidas en las primeras divisiones de las células progenitoras están orientadas radialmente. Estas atraviesan el espesor de la corteza desde la zona ventricular hacia el exterior, proporcionando el andamiaje para la migración de las neuronas hacia el exterior de la zona ventricular [98, 99]. Las primeras divisiones de las células progenitoras son simétricas, lo que duplica el número total de células progenitoras en cada ciclo mitótico. Luego, algunas células progenitoras comienzan a dividirse asimétricamente, produciendo por un lado un precursor postmitótica que migra a lo largo de las fibras gliales radiales, dejando la zona ventricular. Por el otro, un progenitor, que sigue dividiéndose hasta el final del desarrollo, cuando se diferencia en glía o epéndimo. A medida que se retarda selectivamente la fase G1 de la mitosis, los precursores recién nacidos migran a las capas más superficiales de la corteza [100].

La estructura en capas de la corteza se debe al modo en que migran y luego se desarrollan, los precursores neurales. Las primeras neuronas piramidales generadas migran desde de la zona ventricular y subventricular, junto con las células de Cajal-Retzius productoras de relina hasta lo que será la membrana basal. Luego, un grupo de neuronas migrantes divide esta capa transitoria en la zona marginal, donde se alojan las células de Cajal-Ret-

zius y surgirá la capa uno de la corteza, y la placa de conexión, donde se forma una capa intermedia llamada la placa cortical. Estas primeras neuronas formarán las capas más profundas de la corteza madura, capas V y VI. Las neuronas nacidas posteriormente, migran radialmente a lo largo de la placa cortical atravesando las neuronas de las capas más profundas, y se convierten en las capas superiores (II a IV, o a III en la perrrinal). Por lo tanto, las capas de la corteza surgen en un orden inverso al esperado, donde las más jóvenes se ubican externamente y las antiguas, más cerca de la zona progenitora [101, 102].

Conexiones aferentes y eferentes de la Corteza Perirrinal

La corteza perirrinal presenta aferencias y eferencias con un gran número de estructuras. Su conectividad con otras áreas corticales tiene un carácter principalmente aferente, debido a la importante entrada de información sensorial requerida por esta estructura. La corteza visual, la auditiva y la cingulada representan las principales aferencias corticales a la perirrinal. En este apartado solo pondré en foco la relación de esta estructura y la formación hipocampal/parahipocampal. Una visión más completa del esquema de conexiones y funciones complejas de esta estructura puede revisarse en el articulo de Kealy, J. y S. Commins, 2011 [103].
Las proyecciones intrínsecas de la corteza perirrinal siguen un gradiente dorso-ventral dentro de la zona 36 y entre las zonas 35 y 36 [104]. Las capas II, V y VI ventrales del area 36 proyectan lateralmente en las capas I y V de la zona 35. En contraparte, el área 35 proyecta desde sus capas II y III hacia todas las capas del área 36 [105, 106].

La corteza perirrinal está bien conectada con el resto de las regiones parahipocampales; con quienes forma proyecciones recíprocas, la región CA1, el subículo, la corteza entorrinal y la corteza postrhinal. Las conexiones aferentes provenientes del hipocampo hacia la corteza perirrinal se originan principalmente en la región septal de la CA1 y en la región dorsal de la subículo. Ambas proyecciones terminan en las capas profundas de la corteza perirrinal [107]. Las proyecciones del subículo proximal terminan, en principio, ipsilateralmente en las capas V y VI de la corteza perirrinal. Pero también existen algunas proyecciones que terminan más superficialmente en las capas I, II y III e incluso eferentes subiculares que proyectan de forma contralateral. Ademas se ha descripto una proyección con origen en la región septal de la CA1 que termina en la capa VI de la corteza perirrinal caudal [108].

Además de este grupo de proyecciones directas desde el hipocampo a la corteza perirrinal, también existe una proyección directa de la corteza perirrinal hacia el hipocampo y estructuras parahipocampales. Las proyecciones eferentes de la corteza perirhinal se originan en el area 35 e impactan dentro del hipocampo en el área CA1,

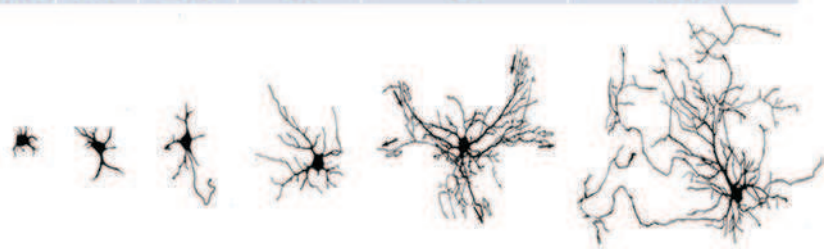
en el subículo y el prosubiculo pero no en el giro dentado y las CAs [109]

Entonces existiría una red hipocampal-parahipocampal, donde las cortezas que componen la región del hipocampo forman conexiones recíprocas entre sí. Entonces, la corteza perirrinal forma conexiones recíprocas con la corteza entorrinal y postrhinal. Ambas cortezas, entorrinal y postrhinal también proyectan hacia y desde cada una para completar el circuito cortical del hippocampal [106]. Si bien estas tres áreas neocorticales han demostrado ser capaces de transferir información electrofisiológica entre sí, requisito necesario de cualquier red neuronal, aun no es completamente claro el papel que esta interconexión juega en los roles comportamentales dependientes de estas estructuras.

Dendritogénesis y Espinogénesis: su importancia en el desarrollo neuronal

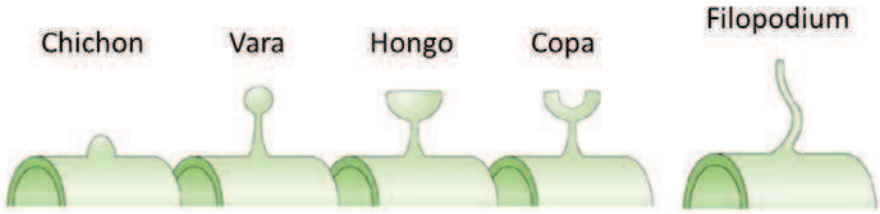
Durante la ontogenia, el proceso de dendritogénesis, coincide con la llegada de las fibras aferentes hacia sus respectivas localizaciones finales. En particular, en roedores este proceso comienza durante el período perinatal embrionario y acaba, según la especie, entre la segunda y tercera semana (ratas y ratones) postnatal. A nivel celular, el árbol dendrítico crece mediante un delicado balance entre los costos metabólicos de elongación de proyecciones dendríticas provenientes desde el soma, un proceso de poda del árbol dendrítico, en el cual la retracción y eliminación de proyecciones no eficientes cumple un rol central para su morfología final [110-112]. Lo cual deja de manifiesto la existencia de una "necesidad" de cubrir un campo receptivo determinado, para cumplir su función dentro del gran entramado de circuitos cerebrales. Conceptualmente, las dendritas primarias emergen desde el cuerpo neuronal y bifurcan para formar a las dendritas secundarias que a su vez bifurcaran en dendritas terciarias y así sucesivamente hasta abarcar su arborización completa. Un complejo conjunto de señales extra-celulares e intracelulares modula el desarrollo dendrítico de las neuronas, estas señales incluyen factores de transcripción, factores neurotroficos, varias vías de señalización, maquinaria de traducción local en espinas dendriticas, elementos del citoesqueleto, desprendimientos dendríticos del Golgi, endosomas y retículo [111, 113-116].

Rata	0.25	0.5	1.5-3	4-6	7-11	12-15
Raton	0.25	0.5	1-3	4-6	7-9	10-15



Esquema estadios del desarrollo dendritico de neuronas en cultivo (modificado de Developmental and maintenance defects in Rett syndrome neurons identified by a new mouse staging system in vitro, Baj et al 2014).

Con un ligero desfasaje respecto del proceso dendritogenico, y quizás en ciertos tipos neuronales como consecuencia de este; surge el proceso de espinogenesis. Este proceso se basa en la formación de estructuras especializadas de las dendritas para el contacto sináptico y la transmisión de información entre neuronas. Durante la primera semana post natal y a lo largo de la vida de los individuos la formación de espinas se produce a través de pequeñas protrusiones filopoidiales que crecen o se retraen en base a su capacidad de hallar botones axónicos con los cuales establecer una sinapsis. A nivel morfológico existen 3 o 4 tipos distintos de espinas según distintos autores; las de tipo Hongo, con una cabeza bulbosa y un cuello extenso que la une a la dendrita; las de tipo Vara, que carecen de cabeza bulbosa pero mantienen un cuello extenso; las de tipo Chichón, que protruyen levemente desde la dendrita sin llegar a formar un cuello; y las de tipo Copa que forman un cáliz alrededor del botón presináptico y presentan un cuello similar al de las hongo, que las separa de la dendrita (en efecto, varios autores no hacen distinción entre ambas). Las espinas dendríticas son estructuras muy dinámicas, susceptibles de ser remodeladas, tanto durante el desarrollo dendrítico como a lo largo de la vida adulta. Si bien aún no se sabe con certeza cuales de estas morfologías se asocian a formas maduras o inmaduras de espinas, se cree que las espinas tipo Hongo y Copa pertenecen a morfologías maduras de espinas, mientras que las espinas tipo Vara y Chichón estarían asociadas a formas inmaduras o en proceso de eliminación [116-124].



Esquema de protrusiones dendríticas, desarrollo de espinas y filopodios

Actualmente se cree que la función primaria de las espinas es segregar las respuestas postsinápticas en las sinapsis químicas, aislando procesos bioquímicos y moleculares en un volumen reducido. De este modo, las espinas pueden actuar como compartimentos de integración semi-autónomos, ya que están separados del eje de las dendritas por el cuello. Por ejemplo, la geometría del cuello de las espinas podría controlar la cinética y la magnitud de las respuestas de calcio postsináptico, evento importante para la formación de potenciales postsinapticos excitatorios y otras regulaciones intrínsecas. O bien, podrían funcionar como filtro de señales que precisen superar un umbral para escapar de la espina y reclutar por ejemplo ARNm de proteínas importantes para remodelar la morfología de la espina misma. Incluso, cada espina posee su propio grupo de organelas, entre ellas frecuentemente se hallan mitocondrias, retículo endoplasmático y sistemas endosomales desde los cuales obtienen su propia energía, sintetizan sus propias proteínas o redistribuyen la localización de proteínas

de membrana; reforzando el concepto de compartimento de integración semiautónomo. Aun así, queda por determinar si los cambios dinámicos en la morfología de las espinas en realidad son importantes para la regulación de información en las sinapsis y dendritas en el organismo vivo [111].

En la actualidad se han descripto varias señales moleculares que modulan el crecimiento y la arborización dendrítica neuronal tales como las semaforinas (Sema3A), Slit1, Notch entre otros. Pero existen factores que modulan además del proceso dendritogénico al procesos espinogénico. Entre estos últimos, hallamos a los factores de crecimiento neurotrófico como el Factor de Crecimiento Nervioso, las Neurotrofinas NT3 y NT4; y en particular, el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF) que no solo regulan la arborización proximal de dendritas en neuronas hipocampales; sino también la formación, maduración y funcionamiento de las espinas dendríticas [21, 112, 116, 117, 125-132]. Además de estos mediadores solubles, existen varias proteínas transmembranas pertenecientes a la gran familia de proteínas con dominios ricos en leucina e inmunoglobulina (LRRIGs), que regulan el desarrollo de los patrones dendríticos y la formación/maduración de espinas dendríticas en poblaciones neuronales específicas [1].

Hipótesis y objetivos

El tamaño y la morfología de los árboles dendríticos son determinantes claves de las propiedades funcionales de las neuronas dentro de un dado circuito cerebral. En efecto, es sabido que varias fallas ocurridas durante el desarrollo neurológico temprano, se deben principalmente a anomalías estructurales de las dendritas y sus conexiones.

Las funciones de los diversos miembros de la superfamilia de proteínas transmembrana con dominios LRR se encuentran muy vinculadas al desarrollo de la conectividad neuronal. Dado que aún se desconocen las funciones de Lrig1 durante el desarrollo cerebral y que sus patrones de expresión sugieren un rol durante el desarrollo dendrítico/sináptico hipocampal; nos propusimos contrastar la siguiente hipótesis: las proteínas Lrig controlan procesos biológicos que subyacen al establecimiento de las conexiones neuronales, como son la espinogénesis, el crecimiento y la complejidad dendrítica.

El objetivo central del primer capítulo de mi trabajo de tesis consistió en caracterizar la expresión las proteinas Lrigs y determinar de qué modo estas, regulan procesos del desarrollo morfológico de neuronas hipocampales. Para alcanzar este objetivo general nos propusimos investigar los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar el patrón de expresión de la proteína Lrig1 en células hipocampales en desarrollo
- Evaluar el rol de Lrig1 en el control de la morfología neuronal y en la plasticidad estructural de neuronas hipocampales en desarrollo, tratando de entender su mecanismo de acción.
- Extender los estudios de morfología dendrítica a los otros miembros de la familia, Lrig2 y Lrig3, mediante ensayos celulares de pérdida de función.

Resultados

Lrig1

Localización de Lrig1 en Cerebro de Ratones Adultos

Los roles de una gran variedad de las proteínas LRR han sido descubiertos recientemente; estos roles abarcan desde funciones en conectividad y fasciculación de axones hasta dendritogénesis y formación de sinapsis. Las proteínas Lrig pertenecen a esta superfamilia de proteínas LRR. Dado que los niveles de expresión del ARN mensajero de Lrig1 son muy elevados en el cerebro de mamíferos, y que aún se desconoce el papel de Lrig1 en el sistema nervioso central; nos propusimos en primer lugar, investigar la localización de Lrig1 en subestructuras del cerebro, para poder identificar áreas donde esta proteína pudiera estar cumpliendo algún efecto. Para ello realizamos inmunomarcación de fluorescencia con anticuerpos que reconocen de forma específica la región intracelular de Lrig1 sobre cortes coronales secuenciales de telencéfalo de ratón adulto (figura 1). Pudimos detallar las estructuras donde se halla marca positiva para la proteína Lrig1 (Cuadro 1). Nótese que pareciera haber un reforzamiento de Lrig1 en los núcleos Hipotalámicos (áreas preópticas), núcleos del Tálamo, y todo a lo largo de la Corteza cerebral y del Hipocampo.

Bregma (1,70 ~ 1,30)	Localiza en Taenia Tecta, a lo largo de todas las Cortezas (Infralimbicas, Prelimbicas, Motoras, Sensorimotoras, Sensoriales y Piriforme), en el Tuberculo Olfatorio, en el Claustrum, en el Núcleo Accumbens y en menor medida en el Caudoputamen.
Bregma (0,40 ~ 0,00)	Localiza en Cingulo anterior, Cortezas (Motoras, Sensorimotoras, Sensoriales y Piriforme) y en Núcleos Hipotalamicos, con refuerzo en áreas Preopticas. También se presenta en el Caudoputamen y la Substantia Ignominata. Ausente en arcos Comisurales.
Bregma (-0,80 ~ -0,85)	Localiza en Cingulo anterior, Cortezas (Motoras, Sensorimotoras, Sensoriales y Piriforme), en Núcleos del Tálamo, el órgano Subfornico y en Núcleos Hipotalamicos, con refuerzo en áreas centrales. También se presenta en el Caudoputamen, Globus Pallidum, Núcleos de la Amigdala, Substantia Ignominata y el núcleo Magnocelular. Ausente en Fimbria, comisura hipocampal, habenula o núcleos paraventriculares del Talamo.
Bregma (-1,30 ~ -1,65)	Localiza en Cortezas (Retrosplenial, Motoras, Sensorimotoras, Sensoriales, de asociación, Ectorinal, Peririnal, Entorinal, Piriforme y corteza amigdalina), todo a lo largo del Hipocampo (CA1, CA2, CA3, y Giro Dentado y Subiculo), en Núcleos del Tálamo, en Núcleos Hipotalamicos, todo a lo largo del Mesencéfalo Motor, marca en Área Tegmental Ventral y Subtaintia Nigra (leve) y también presente en Núcleos de la Amigdala. Ausente en Fimbria, capsula interna, Estría Terminal y Cuerpo Calloso.

Bregma (-2,75 ~ -2,90)	Localiza en Cortezas (Retrosplenial, Sensoriales (visual y auditiva), de asociación, Ectorinal, Peririnal, Entorinal, Piriforme y corteza amygdalina), todo a lo largo del Hipocampo (CA1, CA2, CA3, y Giro Dentado y Subiculo), en Núcleos del Tálamo, todo a lo largo del Mesencéfalo Motor, marca en Área Tegmental Ventral y Subtaintia Nigra (leve), también presente en Núcleos de la Amygdala. Ausente en Fimbria, Capsula Externa, Tracto Óptico, Pedúnculo Cerebral y Cuerpo Calloso.

Cuadro 1

A nivel celular, pudimos localizar a Lrig1 en área somatodendrítica de neuronas del hipocampo. Tanto en área de somas de neuronas piramidales de las CAs (CA1, CA2, CA3) como área de somas de granulares de Giro Dentado, con alguna marca en el Hilux.

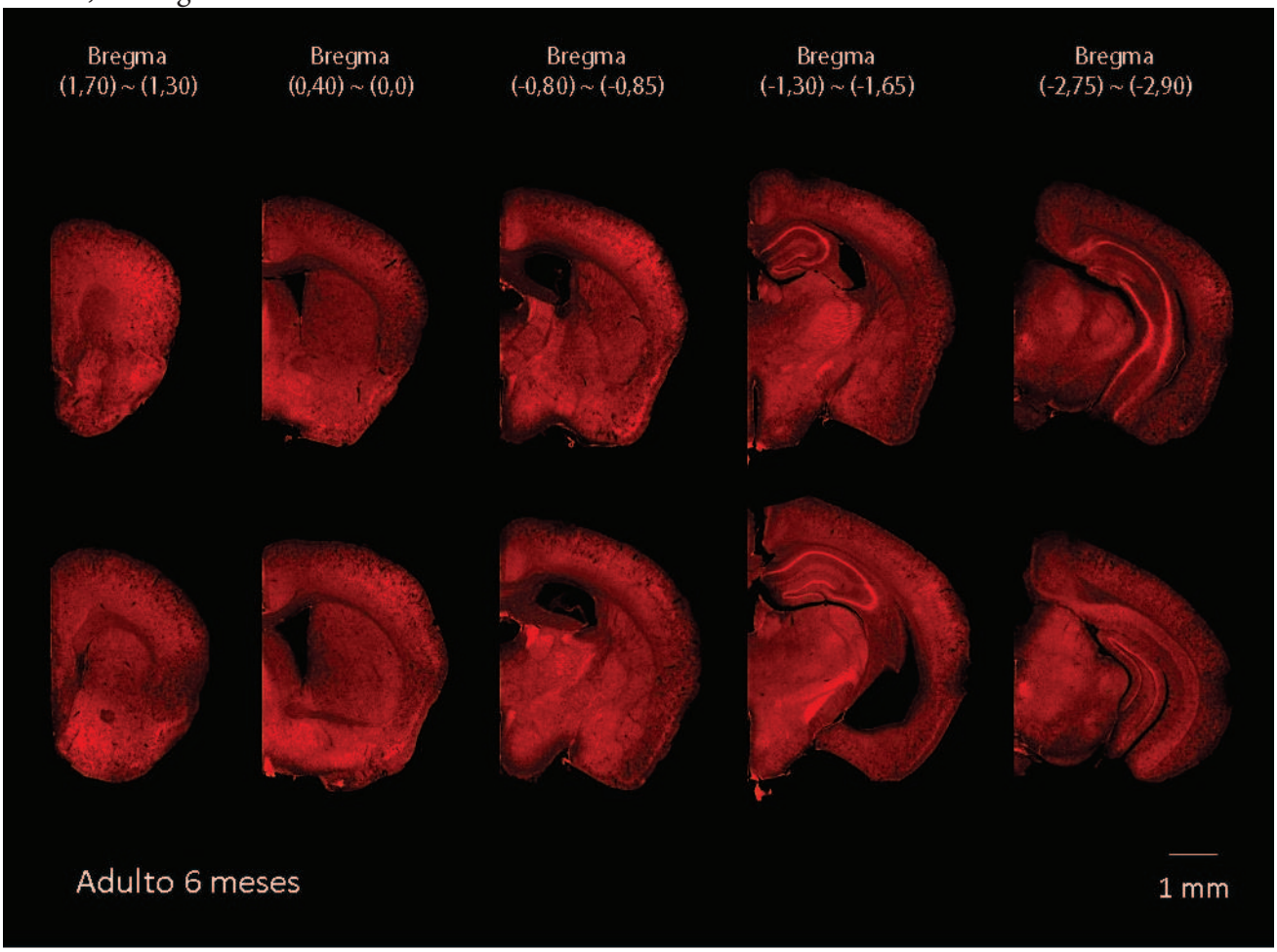


Figura.1: Localización de Lrig1 en cerebro de ratón adulto.
Inmunofluorescencia de Lrig1 (rojo) en cortes coronales secuenciales del telencéfalo de ratón adulto. Se destacan marcas positivas en Hipocampo, Cortezas y Núcleos Preópticos del Tálamo (Cuadro 1).

Expresión de Lrig1 Durante el Desarrollo Hipocampal

En función de los resultados obtenidos sobre la localización de Lrig1, nos interesamos particularmente en el hipocampo, una de las estructuras que ha sido más estudiada, puesto que cumple roles críticos en los procesos de aprendizaje y memoria espacial. Consecuentemente nos preguntamos en que momento del desarrollo Lrig1 comienza su expresión, si es durante el desarrollo de esta estructura o si su expresión pudiera estar ligada

a etapas ya no de formación del hipocampo per se; sino de su maduración, conexión e integración a las redes neuronales. El análisis de la expresión del ARNm de Lrig1 por RT-PCR de tiempo real en tejido hipocampal proveniente de ratas de diferentes etapas de desarrollo (figura 2), muestra un aumento en la expresión de su mensajero a lo largo del desarrollo, con un pico de expresión durante la primera y segunda semana postnatal, período principal del desarrollo dendrítico y sinaptogénico en roedores. Este aumento se detectó entre los días postnatal P5 (día post natal 5) y P15, con un pico de expresión en P10.

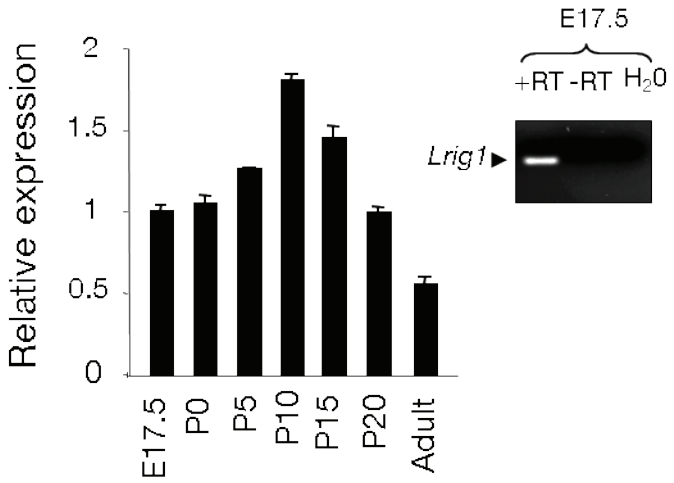


Figura.2: Expresión de Lrig1 durante el desarrollo hipocampal.
A) Análisis cuantitativo de la expresión del mensajero de Lrig1 en hipocampo de rata durante el desarrollo, cuantificado por qPCR (los resultados son representados como la media ± SEM, n=3). El recuadro muestra la expresión de Lrig1 en hipocampo de rata embrionaria de estadio E17.5 evaluada por RT-PCR.

Identificación de los tipos celulares hipocampales que expresan Lrig1

Para determinar qué tipos celulares expresan Lrig1, examinamos la localización de Lrig1 en secciones coronales del Hipocampo (figura 3. A). La inmunomarcación fluorescente de secciones obtenidas a partir de ratas de dos semanas de edad, coincidentes con el tiempo del pico de expresión de Lrig1; revelaron que Lrig1 se encuentra altamente expresada en neuronas granulares de Giro Dentado y piramidales de las áreas del hipocampo CA1-CA3 (figura 3. B-D), y en neuronas corticales piramidales. La marca de Lrig1 se concentra principalmente en el soma y se extiende hacia las dendritas apicales de CA1-CA3 del hipocampo (ver flechas en la figura 3. B-D). Además, cultivos primarios de células de hipocampo disociados (Figura 3. E-F) mostraron que la gran mayoría de las neuronas (βIII tubulina^{+}) expresan Lrig1, pero no así los astrocitos (S100β^{+}). Neuronas hipocampales en cultivo presentaron una localización subcelular de Lrig1 similar a la observada en los cortes coronales de hipocampo (figura 3. G).

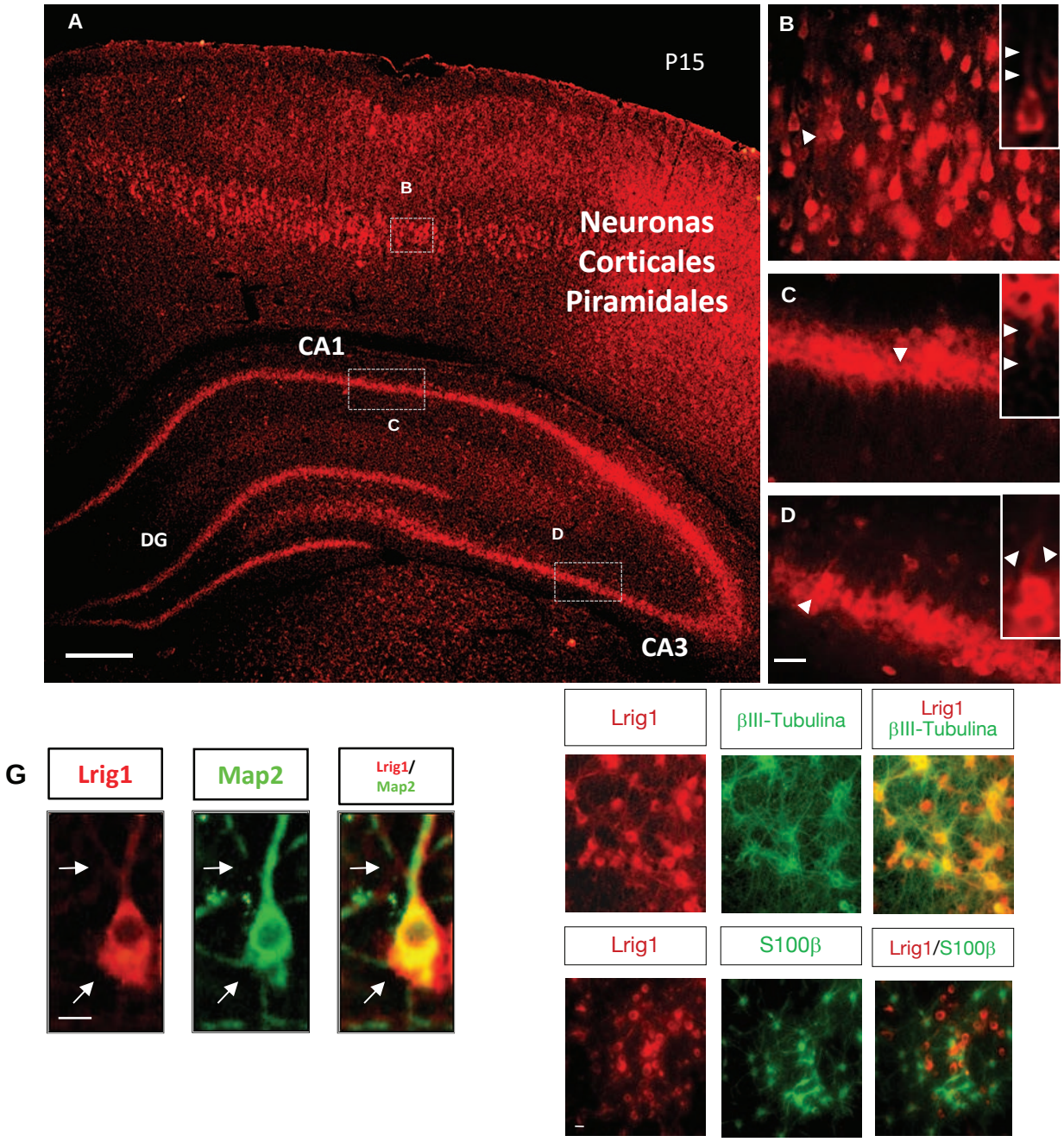


Figura.3: Expresión y localización de Lrig1 durante el desarrollo hipocampal.
A) Localización de Lrig1 (rojo) en secciones coronales de cerebro de rata P15 por inmunofluorescencia. Los anticuerpos específicos anti-Lrig1 marcan células granulares de giro dentado, neuronas piramidales de CA1-CA3 del hipocampo y neuronas piramidales corticales (corteza retrosplenial, pirirrinal, etc). Barra de escala, 400 µm.
B-D) Imagenes en alta magnificación de las zonas recuadradas en B; C y D. Las flechas indican a las neuronas indicadas en las ampliaciones. Las ampliaciones muestran tinción Lrig1 en la región somatodendrítica de neuronas hipocampales de las CAs y de neuronas corticales piramidales (capa V). Las barras de escala, 40 µm.
E-F) Tinción de inmunofluorescencia de Lrig1 (rojo) y el marcador neuronal ßIII-tubulina (verde) en células de hipocampo disociadas cultivadas durante 7 días in vitro. El amarillo indica colocalización de Lrig1 y el marcador neuronal. La tinción de inmunofluorescencia de Lrig1 (rojo) y el marcador astrocítico S100β (verde) en las células hipocampales disociadas cultivadas durante 7 días in vitro. El amarillo indica colocalización de Lrig1 y el marcador astrocítico. Se observa escasa marca. Barra de escala, 15 µm.
G) Tinción de inmunofluorescencia de Lrig1 (rojo) y MAP2, marcador de filamentos de dendritas (verde) en células de hipocampo disociadas cultivadas durante 7 días in vitro. El amarillo indica colocalización de Lrig1 y el marcador dendrítico. Se observa colocalización de las marcas en región somatodendrítica de modo similar al observado en los cortes. Barra de escala, 10 µm.

El Dominio Extra-celular de Lrig1 es Liberado en el Medio Extra-celular Hipocampal

Se sabe que Lrig1 es susceptible de ser clivado y liberado por la metaloproteasa ADAM17 en varios tejidos, y que además el fragmento extra-celular de Lrig1 mantiene capacidad inhibitoria sobre receptores tirosina Kinasa [79, 80]. Estos datos sugieren que el fragmento extra-celular de Lrig1 podría cumplir funciones biológicas relevantes en los tejidos donde se encuentre. Para evaluar la posibilidad de que Lrig1 pudiera estar siendo liberado en tejido hipocampal; se prepararon cultivos primarios de células hipocampales a los que se desarrollaron durante 7 días in vitro (figura 4.A). A partir del medio extra-celular recolectado de estos cultivos, se realizaron inmunoprecipitaciones con un anticuerpo específico para detectar a Lrig1^{Ecto} (Dominio Extra-celular) y utilizando a su vez, otro inespecífico a modo de control (Anti-Flag) se pudo detectar una señal positiva para Lrig1 en los medios inmunoprecipitados con Anti-Lrig1, de un peso molecular similar al publicado por Yi y colaboradores (figura 4.B). Esto sugeriría que Lrig1 podría ser liberado in vivo en el hipocampo de ratones jóvenes; donde podría estar cumpliendo roles relevantes para el desarrollo de esta estructura.

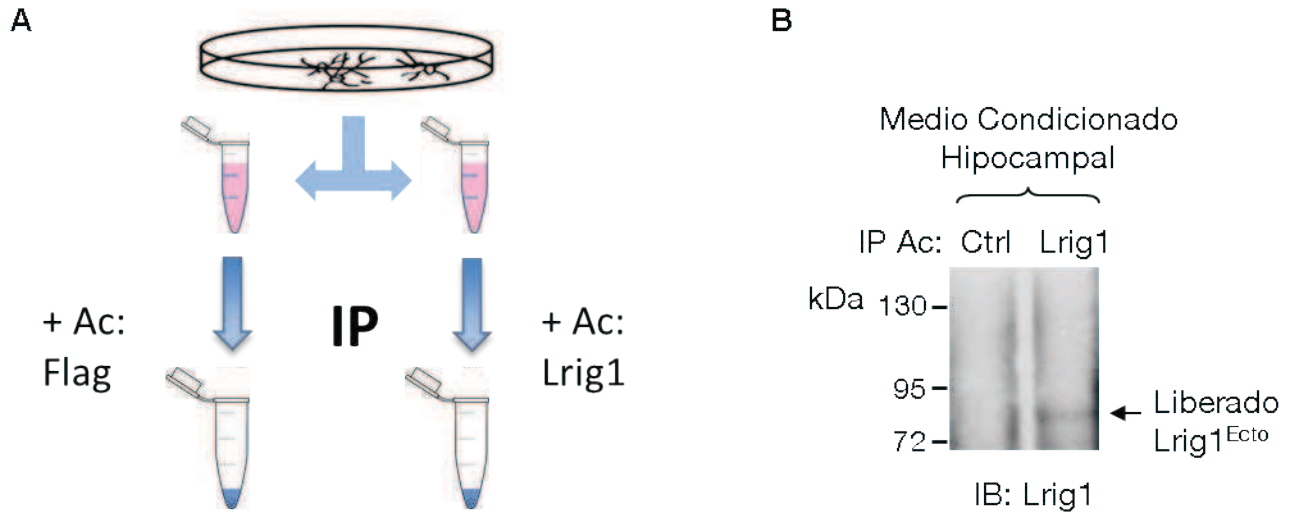


Figura.4: Liberación Lrig1 al medio extracelular.
A) Esquema de recuperación de fragmento extracelular de Lrig1 del medio condicionado hipocampal por medio de inmunoprecipitación. Para la inmunoprecipitación del fragmento extracelular de Lrig1 se utilizó un anticuerpo específico contra el dominio extracelular de dicha proteína. Como control de inmunoprecipitación se utilizó un anticuerpo anti-Flag.
B) Western Blot de los inmunoprecipitados provenientes de los medios hipocampales procesados. Detección de banda positiva correspondiente al fragmento extracelular de Lrig1 (90 kDa aprox).

El Dominio Extra-celular de Lrig1 Induce la Vía de Señalización de MAPK

Entonces, nos preguntamos si la región extra-celular de Lrig1 (Lrig1^{Ecto}) podía tener algún efecto en el tejido hipocampal. Para ello realizamos ensayos en cultivos primarios hipocampales. Dado que Lrig1 comparte varias características de dominio con la familia de las moléculas de adhesión celular (CAM); se hipotetizó que un posible efector río debajo de una señalización inducida por Lrig1^{Ecto} serían las proteínas ERK1/2. Para simular en nuestros estudios condiciones fisiológicas similares a aquellas en las cuales actúan las moléculas

de adhesión de la familia de las Ig y las Ephrinas; Lrig1 fue presentado como monómero y preacomplejado para formar oligomeros. Estos oligómeros se conformanron por agregamiento de Lrig1^{Ecto}-HIS con anticuerpo anti-Histidina (Figura 5.A). En efecto, al evaluar la cinética de activación de ERK1/2 luego del agregado de Lrig1^{Ecto}, se observó un pico de fosforilación entorno a los 10 - 15 minutos post estímulo (Figura 5.B). A modo de control, la adicion del anticuerpo anti-histidina en el medio no produjo alteraciones en el grado de fosforilación de ERK1/2 a 10 minutos post estímulo (Figura 5.C).-

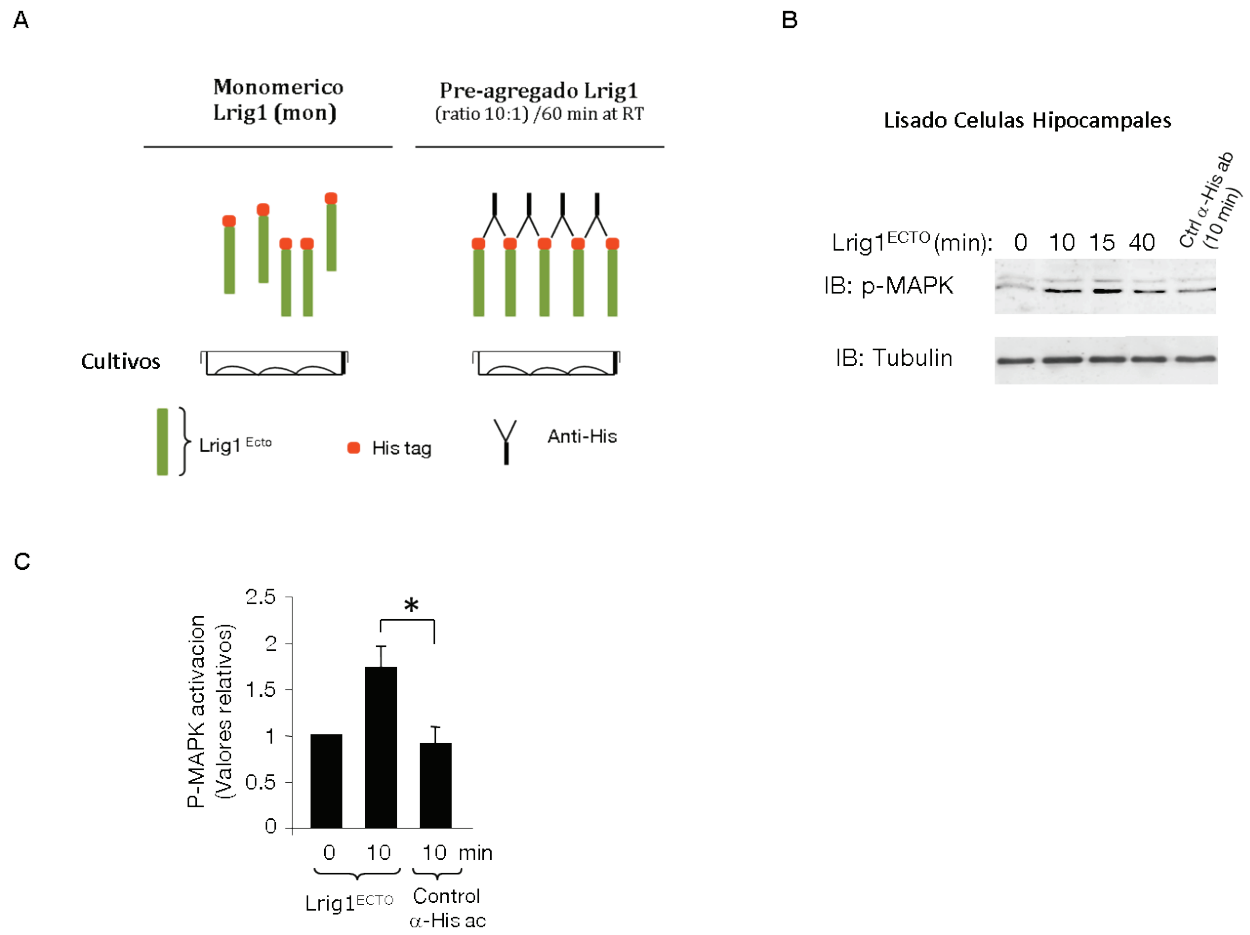


Figura.5: Lrig1 Soluble Induce la Vía de Señalización de MAPK en Cultivos Hipocampales.
A) Esquema de presentaciones de Lrig1 Soluble a los cultivos correspondientes. Lrig1 Soluble puede agregarse con anticuerpo anti-His (a-His ac) a travez de sus epitopes de poli-histidina en la región proximal a los dominios inmunoglobulina, de este modo cualquier posible interacción queda orientada de un modo similar al cual se encontraría en condiciones fisiológicas.
B) Inmunoblot (IB) que muestra los niveles de activación de MAPK (P-MAPK) en lisado total de cultivos de neuronas hipocampales (DIV 10) de ratón, tratados con Lrig1^{Ecto}-HIS (10 ng/ml) pre-agregado durante los tiempos indicados. La utilización de Lrig1^{Ecto}-HIS monomerico no fue capaz de inducir esta vía de señalización, no obstante es posible que la pre-agregación de esta proteína oriente a la región extracelular y simule mejor una presentación natural de esta molécula. En el panel inferior se muestra inmunoblot (IB) con anticuerpo anti-βIII tubulina como control de carga.
C) Gráfico que muestra la activación relativa de MAPK (P-MAPK) con respecto al grupo control no estimulado y al control con el anticuerpo agregante, en lisado total de cultivos de neuronas hipocampales (DIV 10) de raton, tratado con Lrig1 (10 ng/ml) por 10 minutos. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de 3 experimentos independientes. *$p<0,05$ (test de Student) relativizados a los niveles del control no estimulado.

El Dominio Extra-celular Libre de Lrig1 Modula el Crecimiento Axonal y la Formación de Proyecciones Filopodiales.

Se procuro evaluar posibles efectos biológicos inducidos por Lrig1^{Ecto} en la morfología neuronal. Con

este fin, se diseñó un ensayo de crecimiento neuronal sobre distintas matrices extra-celulares. Se preparan matrices de Seroalbumina Bobina (BSA), Poli-D-Lisina (PDL), Lrig1^{Ecto} o Lrig1^{Ecto} desnaturalizado por calentamiento (Lrig1 denat); en las cuales desarrollamos cultivos primarios hipocampales durante tres días. A continuación se realizan inmunotinciones de βIII-Tubulina y se analiza la extension de la proyección neurítica mayor. La matriz de Lrig1^{Ecto} induce un crecimiento neurítico de esta proyección dos veces superior al presentado por cualquiera de las otras matrices, las cuales no muestran diferencias significativas entre sí (Figura 6.A y B). Si bien a día 3 in vitro aún no hay una clara especificación de marcadores moleculares de identidad axonal o dendrítica en neuronas hipocampales en cultivo, se ha visto que la proyección más extensa en este estadio se corresponde con la neurita que terminara especificando en axón [133]. Por otra parte se realizan tinciones de Faloidina para exponer las estructuras de citoesqueleto de actina polimerizada; y se analiza la densidad de proyecciones filopodales en cultivos desarrollados sobre matrices de Poli-D-Lisina y Lrig1^{Ecto}-etiquetado con Histidina (Lrig1^{Ecto}-HIS). Destacablemente, los cultivos realizados sobre Lrig1^{Ecto}-HIS duplicaron la densidad de proyecciones filopoidales sobre sus neuritas (Figura 5.C y D).

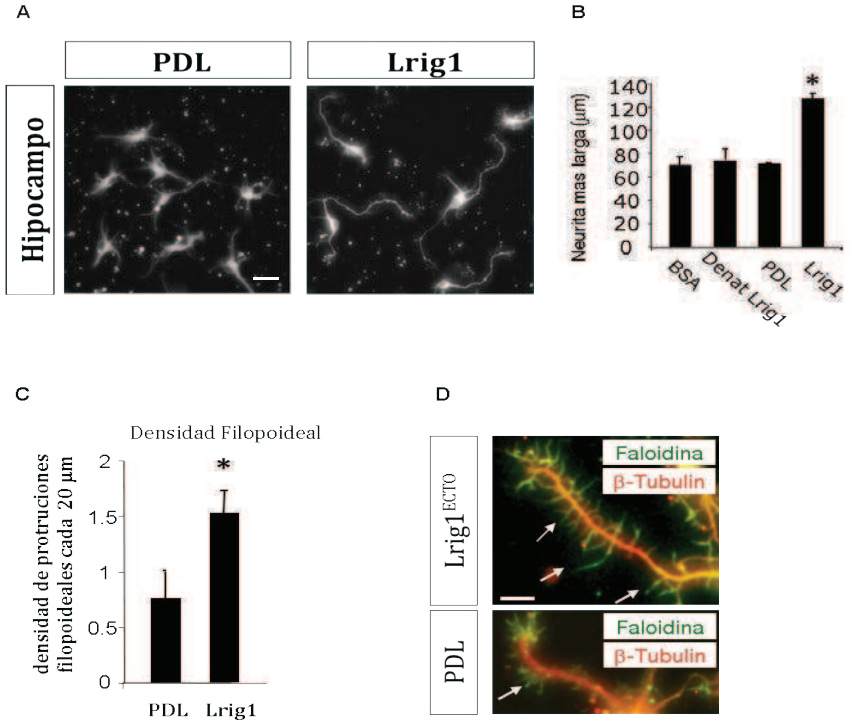


Figura.6: Matriz de Lrig1^{Ecto} promueve el Crecimiento Axon y la Formación de Proyecciones Filopodiales.
A) Imágenes representativas de neuronas hipocampales de ratón DIV 3 cultivadas sobre matrices de poli-D-Lisina o Lrig1^{Ecto} e inmunotenidas con b-III-Tubulina, marcador de neuronas inmaduras. Se observa un incremento del largo de la neurita principal, asociada morfológicamente con el axon. Barra de escala: 20 µm.
B) Gráfico que muestra el promedio de elongación de la neurita principal de neuronas hipocampales de ratón DIV 3 cultivadas sobre matrices de Seroalbumina Bobina(BSA), poli-D-Lisina, Lrig1^{Ecto} desnaturalizado por calor o Lrig1^{Ecto}; e inmunotenidas con b-III-Tubulina. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0,05 (test de Student).
C) Gráfico que muestra el promedio de densidad filopoideal de neuronas hipocampales de ratón DIV 3 cultivadas sobre matrices de poli-D-Lisina o Lrig1^{Ecto}; e inmunotenidas con b-III-Tubulina y Faloidina. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de 3 experimentos independientes. *p<0,05 (test de Student).
D) Imágenes representativas de neuronas hipocampales de ratón DIV 3 cultivadas sobre matrices de poli-D-Lisina o Lrig1^{Ecto}; e inmunotenidas con b-III-Tubulina y Faloidina. Se observa un incremento de la densidad filopoideal. Barra de escala: 20 µm.

En base a estos resultados quisimos investigar la posibilidad de que Lrig1 pudiera alterar el modo en que los axones realizan contacto con las terminales postsinápticas. Con este fin, generamos sinapsis sintéticas en cultivos primarios hipocampales (DIV 10) mediante el uso de perlas de poliestireno por 48hs (figura 7. A). En concepto, recubrimos las perlas con BSA (control negativo), Lrig1-ECTO o GFRa1-Fc/GDNF (control positivo) y las expusimos en estos cultivos hipocampales jóvenes. Luego realizamos inmunomarcaciones contra el Transportador vesicular de glutamato o de GABA, identificando contactos axonales positivos de los tres planos focales superiores de cada perla mediante miscroscopia confocal (figura 7. B). Los resultados de este ensayo indicaron que existe un mayor reclutamiento de maquinaria vesicular presinaptica en aquellas perlas recubiertas por GFRa1-Fc/GDNF pero no en aquellas recubiertas por BSA o Lrig1 (figura 7. C). Sorprendentemente, si bien Lrig1 es capaz de inducir el crecimiento axonal y la protrución de filopodios sobre estos; pareciera ser incapaz de inducir el reclutamiento de maquinaria presinaptica.

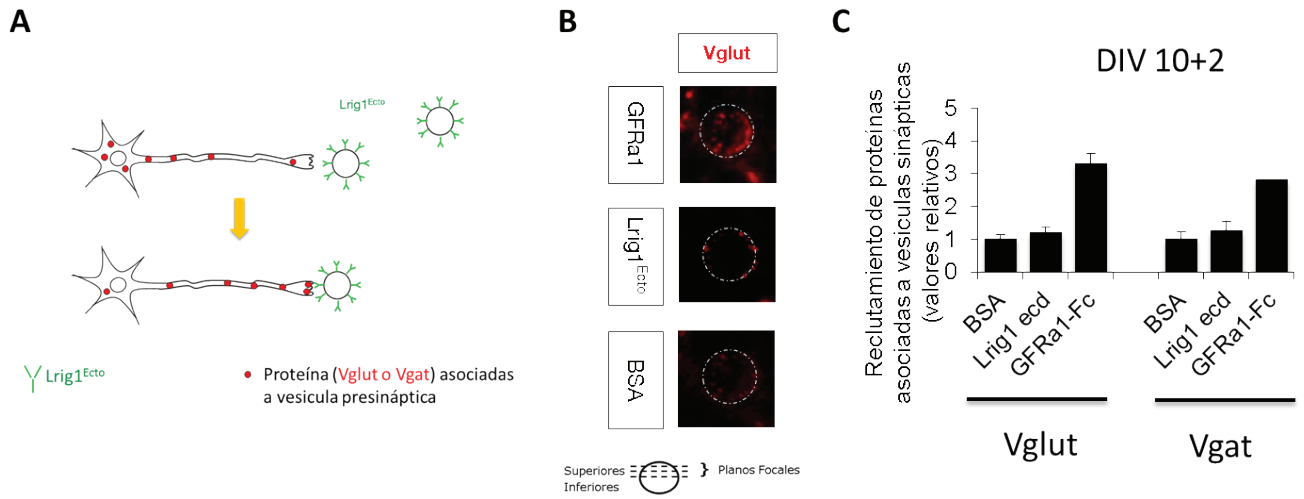


Figura.7:Ensayo de sinapsis sintetica: Lrig1 falla en reclutar de maquinaria presináptica.
A) Esquema del procedimiento del ensayo de génesis de sinapsis sintetica en perlas de poliestireno.
B) Imagen confocal de planos superiores de perla de poliestireno recubiertas por GFRa1-Fc/GDNF (control positivo), BSA (control negativo) y Lrig1^{Ecto}, sobre cultivos hipocampales (DIV 10 + 2), tenidos con anticuerpos anti-Vglut (rojo). Esquema de los planos focales elegidos sobre las perlas de poliestireno para la cuantificación de intensidad de fluorescencia (perla de poliestireno de 5 µm de radio, voxel de 1 µm^3, interpaso en Z de 2 µm).
B) Gráfico representativo que muestra el promedio de reclutamiento de V-Gat o V-Glut, medido como intensidad de fluorescencia sobre las perlas de poliestireno recubiertas por BSA, Lrig1^{Ecto} o GFRa1-Fc. El resultado está presentado como el promedio ± error estándar de 20 perlas seleccionadas al azar en el experimento, *p<0,05 (test de Student). Se realizaron dos experimentos independientes con resultados similares.

Lrig1 Modula la Morfología Dendritica de Neuronas Hipocampales en Cultivo

Con el fin de investigar posibles efectos biológicos mediados por Lrig1 en neuronas hipocampales, realizamos ensayos de ganancia y pérdida de función. Para ello, realizamos una sobreexpresión de Lrig1 en cultivos maduros (DIV17) de neuronas hipocampales provenientes de ratas de estadio gestacional E17 (figura 8. A); transfectados con una construcción plasmídica que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) u otra

que expresa a Lrig1 con una etiqueta (Flag). Posteriormente, en el tercer día post transfección (DIV 20) las neuronas se fijaron y se analizaron. Los análisis morfométricos constaron principalmente del método de análisis de Sholl [134] y una serie de parámetros independientes que generalmente se asocian a este tipo de análisis y se detallan en la sección de métodos. La sobreexpresión de Lrig1 redujo la arborización de los procesos neuríticos proximales al soma neuronal (figura 8.A y B).

Para inhibir la expresión del ARNm de Lrig1 en cultivos maduros de neuronas hipocampales obtenidas a partir de ratón P0 (figura 9. A), utilizamos una construcción plasmídica basada en un sistema de silenciamiento por interferencia con fragmentos cortos (shARN). En un trabajo anterior, nuestro grupo había identificado una secuencia de shARN (int 1494-1512) que reducía la expresión de Lrig1 en cultivo de células de ratón [40]. Se permitió desarrollar los cultivos durante 10 días in vitro y luego fueron transfectados con un vector que expresa GFP o la construcción de interferencia asociada a una secuencia de expresión para GFP. Tres días después de la transfección (13 DIV), las neuronas se fijaron y se analizaron como ya se mencionó anteriormente (figura 9. A). La inhibición de la expresión de Lrig1 indujo un aumento significativo de la arborización neurítica proximal que se mantuvo hasta los 90-100 micrómetros desde el soma (figura. 9. B). Además, otros parámetros como el número de neuritas primarias, el crecimiento neurítico total, el número de bifurcaciones, y el número promedio de procesos también presentaron un aumento significativo (figura 9. C-G). La eficiencia de la construcción de silenciamiento de Lrig1 fue controlada por RT-PCR de tiempo real en células MN1 y por reducción de la expresión proteica de Lrig1 analizada por inmunoblot (figura 10. A-C). Este silenciamiento también se verifico mediante inmunofluorescencia en cultivos de neuronas hipocampales de ratón, transfectadas con ShARN-Lrig1 (figura 10. D).

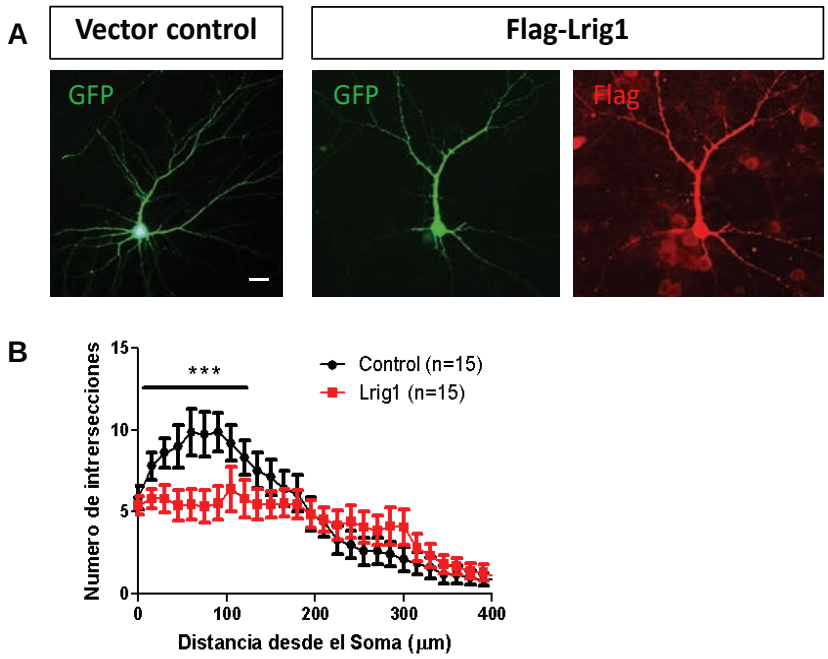


Figura.8:Reducción de la arborización dendrítica mediada por Lrig1 en neuronas hipocampales cultivadas.
A) Imagen representativa de neuronas hipocampales cultivadas durante 9 días, luego transfectadas y mantenidas durante los siguientes tres sucecivos. Grupo Control transfectado con GFP, Grupo Tratado transfectado con GFP y cotransfectado con Lrig1-Flag. Panel izquierdo imagen de neurona Control (fluorescencia en verde). Panel derecho neurona sobreexpresando Lrig1-Flag (fluorescencia en verde e inmunotinción Anti-Flag en rojo). Barra de escala, 20 µm.
B) Análisis de Sholl de la arborización dendrítica de las neuronas del hipocampales representadas en el panel A. La evaluación de la complejidad dendrítica se realiza sobre la fluorescencia en verde, en rojo se evalúa la sobreexpresión de Lrig1 en el grupo tratado (* $p < 0{,}001$, ANOVA de dos factores, Bonferroni de múltiples vías, N replica = 3). El experimento se repitió tres veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron un total de entre 13 y 17 neuronas por condición experimental. No se descartan efectos sobre la sobrevida neuronal por la sobreexpresión de Lrig1.

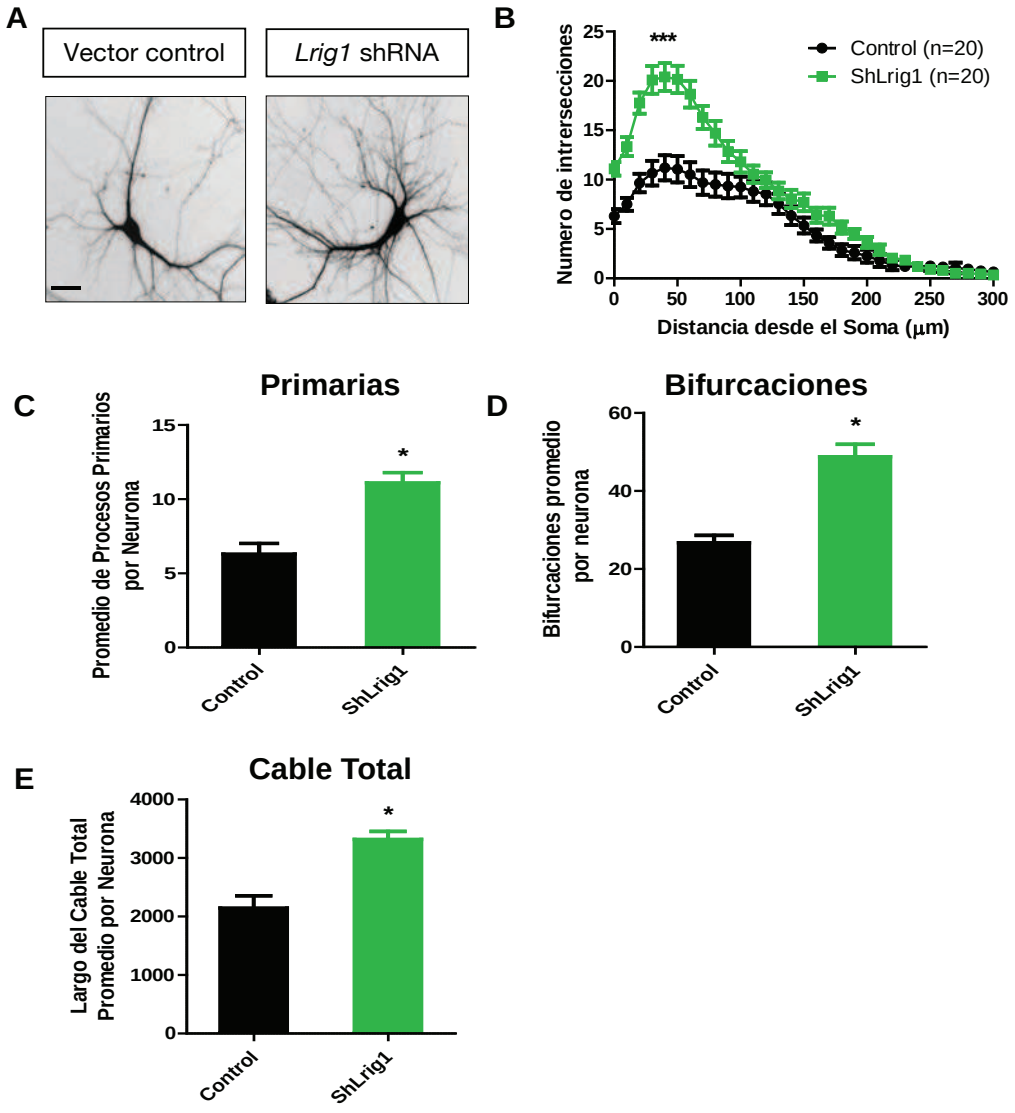


Figura.9: La inhibición de la expresión de Lrig1 promueve el crecimiento de la arborización dendrítica en neuronas hipocampales cultivadas.
A) Imagen representativa de neuronas hipocampales cultivadas durante 9 días, luego transfectadas y mantenidas durante los siguientes tres sucesivosaa. Grupo Control transfectado con GFP, Grupo Tratado transfectado con ShLrig1-GFP. Panel izquierdo imagen de neurona Control (fluorescencia en verde). Panel derecho neurona expresyo el small harpin de Lrig1 (fluorescencia en verde). Barra de escala, 20 µm.
B) Análisis de Sholl de la arborización dendrítica de las neuronas del hipocampales representadas en el panel A (* p <0,001, ANOVA de dos factores, Bonferroni de múltiples vías, N = 3).
C-E) Cuantificación del número de dendritas primarias (C), ramificaciones dendríticas totales (D) y la longitud dendrítica total (E), de las neuronas ilustradas en el panel A (los resultados son representados como la media ± SEM; * p <0,0001, t de Student, N = 3). El experimento se repitió tres veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron un total de 20 neuronas por condición experimental.

En coincidencia con estos datos, el análisis de cultivos celulares de neuronas hipocampales provenientes de ratones Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$, cultivados por 7 días in vitro e inmunomarcado con el identificador dendrítico map2; mostro resultados similares a los obtenidos con la construcción de silenciamiento de Lrig1 (figura 11. A). En efecto, el análisis de Sholl mostró que las neuronas hipocampales en cultivo provenientes de ratones (P0) Lrig1KO exhiben una mayor complejidad proximal de su árbol dendrítico respecto de neuronas provenientes de animales salvajes (figura 11. B). Puntualmente, esta mayor complejidad dendrítica es resultado de un aumento significativo en el número promedio de bifurcaciones por neurona, el número de dendritas primarias y el cable

total que se extiende directamente desde el soma neuronal (figura 11. C-E).

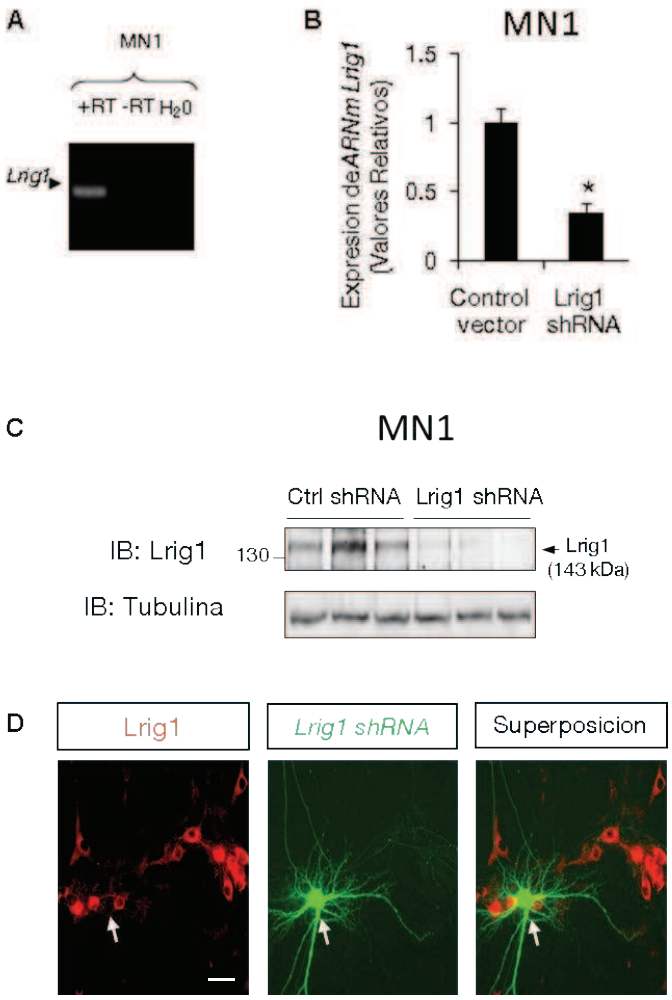


Figura.10: Control de inhibición de Lrig1 por Lrig1-shRNA. Ablacion de Lrig1 en Raton Lrig1$^{-/-}$. Validacion de Anticuerpos Anti-Lrigs.
A) Control de expresión de Lrig1 en células MN1, evidenciado por PCR.
B) Control de eficiencia de la inhibición de la expresión de Lrig1 por el vector de expresión small harpin Lrig1-GFP en células MN1 cultivadas. La expresión Lrig1 fue abrogada en gran medida en estos cultivos, el analisis cuantitativo de la expresión de mensajero de Lrig1 en celulas MN1 sobreexpresando un vector vacio o shRNA Lrig1-GFP, demostro una caída de al menos 50% del mensajero.
C) Inmuno Blot que muestra la desminucion en la expresión de la proteina Lrig1 en células MN1, al ser tratadas con la construcción de interferencia ShLrig1-GFP. Control de eficiencia de la inhibición de la expresión de Lrig1 por el vector de expresión small harpin en células MN1.
D) El vector shRNA Lrig1-GFP inhibió la expresión de Lrig1 específicamente en neuronas hipocampales transfectadas pero no en neuronas vecinas. La flecha muestra una neurona representativa, inhibida en el cultivo. Nótese la prominente proliferación de dendritas proximales en aquellas neuronas donde Lrig1 fue abolida. Barra de escala, 20 µm.

Lrig1 Modula la Maduración de Espinas Dendríticas de Neuronas Hipocampales en Cultivo

A continuación, nos propusimos evaluar la localización sináptica de Lrig1. Con este fin, se prepararon distintas fracciones subcelulares de hipocampo; homogenatos totales (Hom), fracciones sinaptosomales crudas (Syn), fracciones de membrana plasmática sináptica (SPM), enriquecida en estructuras pre y postsináptica de membrana, y fracciones enriquecidas en densidades postsinapticas (PSD) de hipocampo de rata o ratón P15. Los marcadores presinápticos, sinaptotagmina y sinaptofisina se enriquecieron en la fracción SPM, mientras que la subunidad R1 del receptor de NMDA estaba enriquecida exclusivamente en la fracción PSD, corrobo-

rando la eficiencia del fraccionamiento realizado. Se encontró un enriquecimiento de Lrig1 en fracciones de PSD, lo que indicaría que esta proteína transmembrana, estaría presente en compartimentos postsinápticos (figura 12).

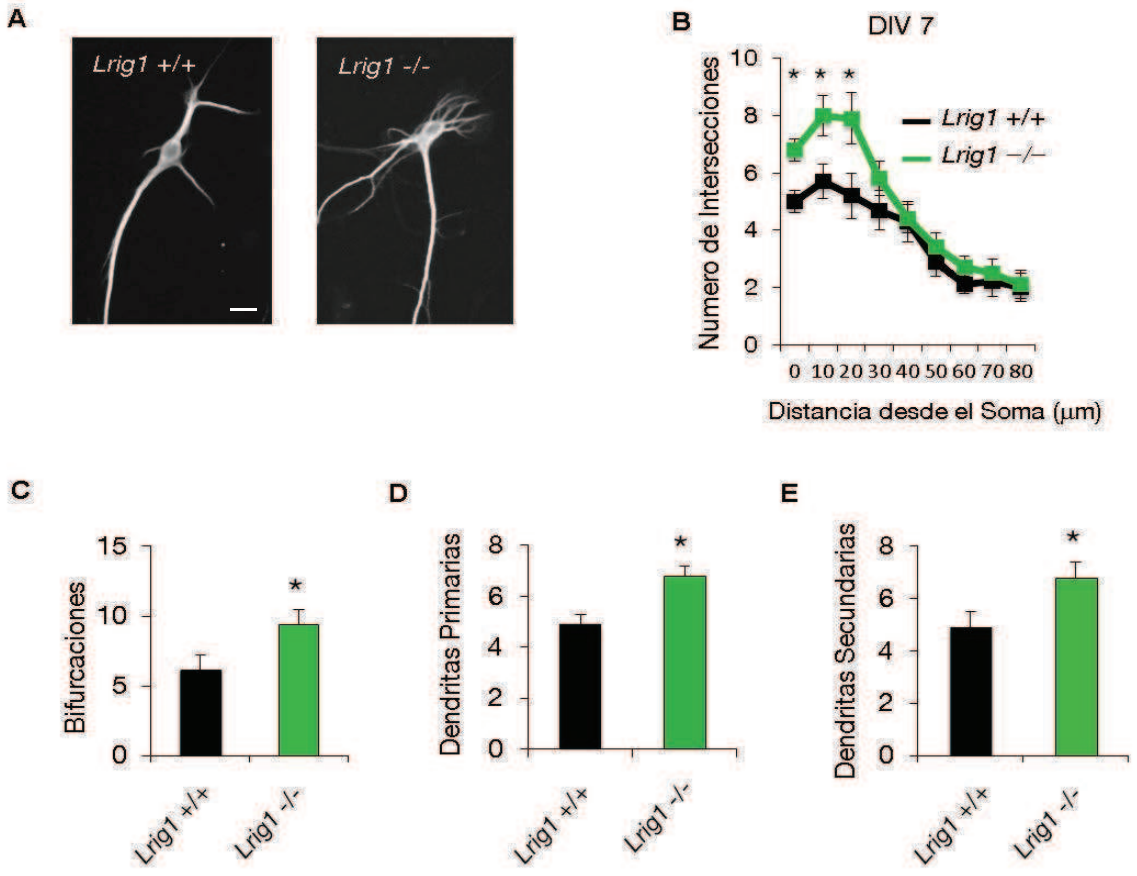


Figura.11: Ausencia de Lrig1 promueve el crecimiento de la arborización dendrítica en neuronas hipocampales de ratones Lrig1KO cultivadas.
A) Imagen representativa de neuronas hipocampales de animales salvajes y Lrig1KO cultivadas durante 7 dias. Panel izquierdo imagen representativa de neurona hipocampal de raton salvaje. Panel derecho imagen representativa de neurona hipocampal de ratón Lrig1KO. Inmunotincion Anti-map2. Barra de escala, 20 μm.
B) Análisis de Sholl de la arborización dendrítica de las neuronas del hipocampales representadas en el panel A (* p <0,05, ANOVA de dos factores, Bonferroni de múltiples vías, N = 3).
C-E) Cuantificación de ramificaciones dendríticas totales (C), número de dendritas primarias (D), número de dendritas secundarias de las neuronas (E) ilustradas en el panel A (los resultados son representados como la media ± SEM; * p <0,0001, t de Student, N = 3). El experimento se repitió tres veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron un total de 20 neuronas por condición experimental.

Dada la localización sináptica de Lrig1 obtenida por bioquímica, nos preguntamos si esta proteína podría regular la densidad y/o maduración de las espinas dendríticas. Para ello realizamos ensayos de silenciamiento de Lrig1, en los cuales las neuronas hipocampales fueron transfectadas con un plásmido que expresa GFP (control) o shLrig1-GFP en cultivos primarios de neuronas hipocampales mantenidas in vitro por 13 días. Permitimos progresar estos cultivos por tres días consecutivos antes de fijarlos y analizarlos (figura 13. A). En estos ensayos, las neuronas transfectadas con shLrig1-GFP mostraron un aumento significativo en la densidad de espina al ser comparadas contra las neuronas del grupo control (figura 13. B). En particular, esta inhibición de la expresión de Lrig1 indujo la formación de espinas maduras, tipo Hongo, Vara y Copa (figura 13. C). En

conjunto, estos ensayos sugieren un posible rol de Lrig1 en la regulación de la remodelación y maduración de las espinas dendríticas.

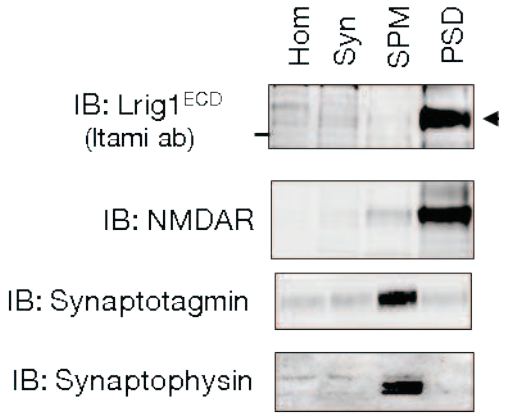


Figura.12: Localización de Lrig1 en Fracciones Sinápticas.
A) Inmunoblot que muestra la presencia de Lrig1 y de proteínas de compartimentos sinápticos específicos de fraccionamientos subcelulares obtenidos a partir de homogenatos totales de hipocampo de ratones Lrig1$^{+/+}$. Fraciones homogenato total (Hom), sinaptosomas crudos (Syn), membrana plasmática sináptica enriquecida en estructuras pre y postsináptica de membrana (SPM), y enriquecidas en densidades postsinápticas (PSD). Panel superior: Localización de Lrig1 (Itami) en fracciones de PSD. Panel medio 1: Localización de subunidad 1 del receptor NMDA, receptor postsináptico, en fracciones de PSD. Panel medio 2: Localización de Sinaptotagmina, proteína vesicular presináptica, en fracciones de SPM. Panel inferior: Localización de Sinaptofisina, proteína vesicular presináptica, en fracciones de SPM. El mismo blot fue utilizado para realizar el revelamiento de todas las proteínas mencionadas (N=3).

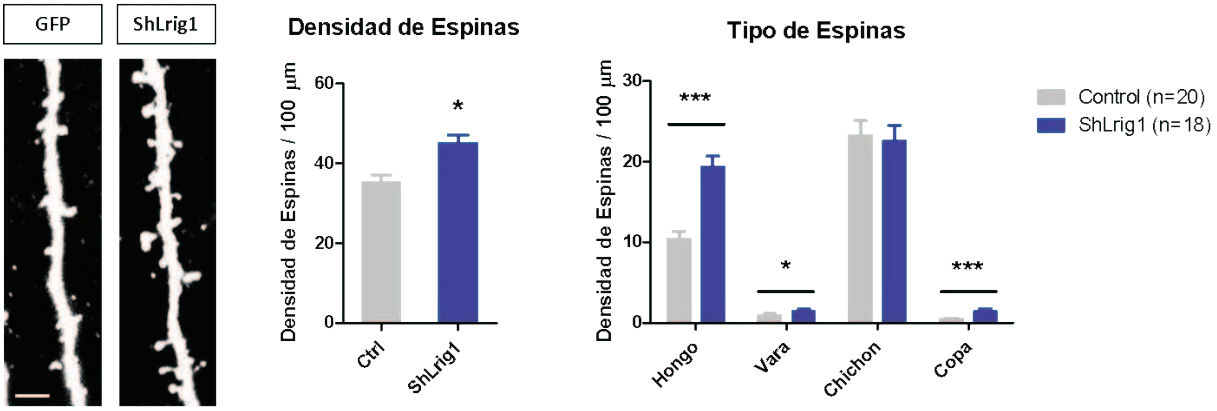


Figura.13: La inhibición de la expresión de Lrig1 aumenta la densidad de las espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo
A) Imágenes confocales representativas de espinas dendríticas de neuronas en cultivo. Neuronas de hipocampo de ratón fueron cultivadas durante 13 días, transfectadas y luego mantenidas durante los tres días subsiguientes. Panel izquierdo, grupo control transfectado con GFP. Panel derecho, grupo tratado transfectado con shRNA-Lrig1-GFP .Barra de escala, 10 µm.
B) Cuantificación del efecto de la disminución de la expresión Lrig1 sobre la densidad de espinas de los cultivos representados en A (los resultados son representados como la media ± SEM, * p <0,05, t de Student, N replica = 3). El ensayo se repitió tres veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron 20 neuronas por condición experimental.
C) Cuantificación del efecto de la disminución de la expresión Lrig1 sobre la densidad de diferentes tipos de espinas de los cultivos representados en A. (Los resultados son representados como la media ± SEM, * p <0,001 por la prueba t de Student). El ensayo se repitió tres veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron un total de 20 neuronas por condición experimental.

Lrig1 regula la arborización dendrítica dependiente de TrkB y BDNF

Trabajos previos destacan el rol que cumple el receptor tirosina kinasa TrkB (proteina LRR) y su ligando BDNF en el desarrollo y funcionamiento del hipocampo. Se sabe que este sistema ligando-receptor, es responsable de regular la arborización dendrítica proximal en neuronas hipocampales [129, 130, 135-140];

de modular la maduración y el mantenimiento de sus espinas dendríticas; y destacablemente de modular su actividad eléctrica al asociarse con los receptores glutamatérgicos NMDA [141-144]. Dado que (i) Lrig1 es un regulador de diferentes receptores tirosina kinasa y (ii) que los ensayos de silenciamiento de Lrig1 fenocopian de forma sorprendente los efectos morfológicos promovidos por el sistema BDNF/TrkB en cultivo de neuronas hipocampales, nos preguntamos si esta vía de señalización estaría siendo regulada por Lrig1.

Para evaluar la posibilidad de que estas dos proteínas pudieran interactuar físicamente realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación entre Lrig1 y TrkB, a partir de hipocampo de rata joven (P15). TrkB fue co-inmunoprecipitado solo en aquellos extractos en los que utilizamos a Lrig1 como anzuelos de precipitación. No fuimos capaces de detectar señal positiva para TrkB cuando utilizamos un anticuerpo inespecífico (Anti-Flag). A modo de control el lisado total de los extractos de hipocampo presentó señal positiva para TrkB, confirmando no solo la presencia de TrkB en el extracto inicial sino también la sensibilidad de detección. Del mismo modo, la preparación de inmunoprecipitación presento señal positiva para Lrig1 solo cuando el anzuelo de Lrig1 fue utilizado, confirmando la eficiencia y la especificidad de la inmunoprecipitación (figura 14. A).

Para investigar si Lrig1 podría regular la actividad del receptor neurotrófico TrkB, transfectamos células HEK de modo de sobreexpresar al receptor TrkB etiquetado con hemaglutinina (HA) en presencia o en la ausencia de Lrig1 etiquetado con Flag. Luego, deprivamos a las células de suero para reducir su estado basal de actividad y las tratamos con o sin BDNF durante 15 min. Evaluamos la actividad de TrkB mediante un anticuerpo específico que reconoce la forma fosforilada de TrkB en tirosina 705 (Y705), un residuo de tirosina localizado dentro del bucle de activación del dominio Kinasa de TrkB. Notoriamente, las células que expresan Lrig1 mostraron una reducción substancial en la fosforilación de TrkB inducida por BDNF (figura 14. B). Estos datos sugieren que Lrig1 sería capaz de interactuar con TrkB y a su vez, la presencia de Lrig1 sería suficiente para inhibir la fosforilación de TrkB inducida por BDNF.

Una gran variedad de estudios describen la importancia del mecanismo de retroalimentación negativa como un control molecular para asegurar niveles fisiológicos de la inducción de una respuesta biológica eficiente (Alsina et al, 2012). Basado en este concepto, analizamos si la expresión génica Lrig1 podría ser inducida por BDNF en neuronas hipocampales. El análisis de RT-PCR semicuantitativa (Figura 14. C) y el análisis de RT-PCR en tiempo real también reveló una inducción creciente del ARNm de Lrig1 posterior a la estimulación con BDNF de cultivos primarios de neuronas hipocampales (figura 14. D), sugiriendo que Lrig1 se induciría para regular retrógradamente el estado de activación de TrkB en estas neuronas.

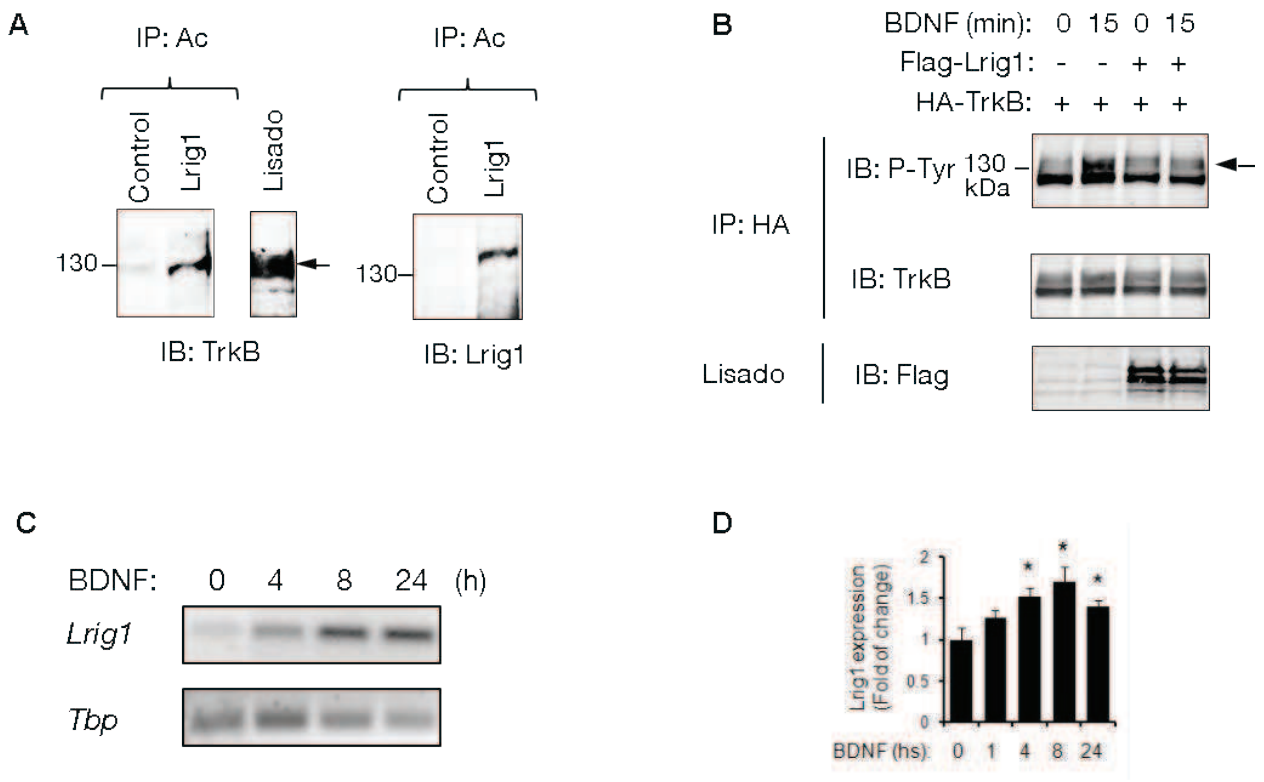


Figura.14: La expresión de Lrig1 es inducida por BDNF y su producto es capaz de asociarse e inhibir a TrkB.
A) Interacción ex vivo de Lrig1 y TrkB. Coimmunoprecipitation de Lrig1 y TrkB endógenos de extractos de tejido de hipocampo de rata P15. Las muestras se dividen en partes iguales, el primer grupo, control se inmunoprecipita con anti-HA (etiqueta exógena de hematoglutinina). El segundo grupo, tratado, se inmunoprecipita con Lrig1. En el panel de la izquierda, los inmunoprecipitados se corren, transfieren y luego se revelan con anti-TrkB. Adjunto también se muestra una alícuota del extracto de lisado total inicial, revelado con anti-TrkB. La flecha indica la banda de TrkB coinmunoprecipitando con Lrig1 o presente en la alícuota de extracto inicial. En el panel derecho, los mismos inmunoprecipitados son corridos, transferidos y revelados con anti-Lrig1 (control de inmunoprecipitacion).
B) Activacion ligando dependiente de TrkB. La fosforilacion de TrkB (pTrkB) se evaluó mediante la transfección transitoria de células HEK que fueron o no estimuladas con BDNF. Mediante un vectores de expresion se expresó TrkB-HA, junto a un vector vacio o con un vector de expresando Lrig1-Flag. Luego de 36 h de expresión, las células fueron sincronizadas por deprivacion de suero y se estimularon (o no) con BDNF (30 ng / ml) durante 15 min. El nivel de activación de TrkB (p-TrkB) se evaluo sobre inmunoprecipitados de TrkB reprobados con anticuerpos anti-fosfo-Tyrosina (PTyr-TrkB). Los controles de expresión fueron realizados mediante el uso de anticuerpos anti-HA (TrkB) y anti-Flag (Lrig1) en la misma inmunotransferencia donde fuera detectada la fosforilacion. Los cambios de fosforilacion de TrkB observados son relativos a la expresión de TrkB total. Resultados similares fueron obtenidos en dos ensayos independientes adicionales.
C) Imagen representativa del análisis semicuantitativo de la induccion de Lrig1 por BDNF (50 ng / ml) en cultivos de neuronas hipocampales durante 0, 4, 8 o 24hs.
D) Grafico analitico de la cinetica de expresión del mensajero de Lrig1 medido por qRT-PCR en muestras provenientes de cultivos de neuronas hipocampales de rata (DIV 10) tratados con BDNF (50 ng / ml) durante 0, 1, 4, 8 o 24hs. Los niveles de expresión se normalizaron utilizando la expresión del gen constitutivo tbp. Los resultados son representados como la media ± SEM de determinaciones por triplicado. * $p < 0{,}05$ ANOVA seguido por Dunnett. Resultados similares fueron obtenidos en otros ensayos independientes.

La localización in vivo observada para Lrig1 en las secciones del hipocampo es consistente con el patrón de expresión de TrkB que se ha descripto previamente en las neuronas piramidales CA1-CA3 y las células granulares del giro dentado (GCS) [130, 145, 146]. Como se informó anteriormente, las inmuno-fluorescencias in vitro revelaron que TrkB se expresa en casi todas las neuronas hipocampales en cultivo y se localiza principalmente en el área somática y dendrítica proximal [147]. Nuestros hallazgos indican que más del 95% de las neuronas TrkB$^+$ en cultivo, co-expresan a Lrig1 (figura 15. A), y que ambas proteínas están altamente localizadas en el compartimiento somatodendrítico (Coeficiente de Mander $_{\text{Lrig1-TrkB}}$: 0.92 ± 0.01, figura 15. B). Esta evidencia,

entonces, es coherente con un rol de Lrig1 en el control de la señalización del receptor TrkB.

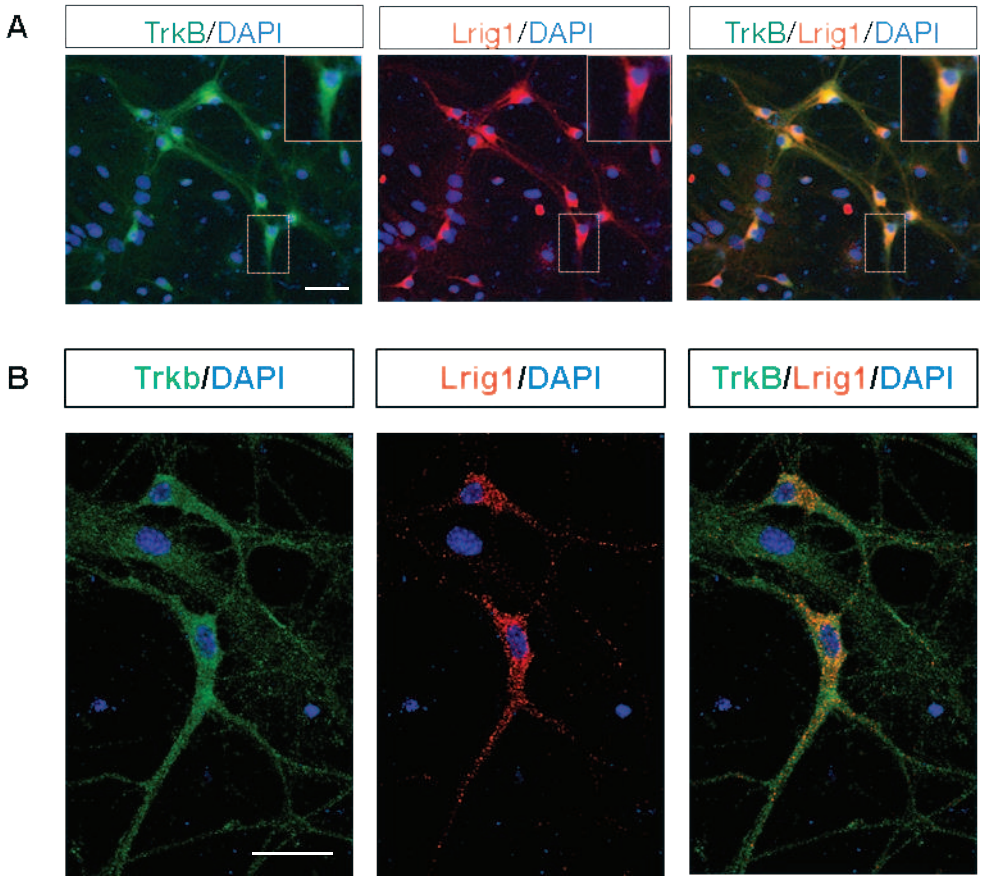


Figura.15: Colocalización de Lrig1 y TrkB en neuronas hipocampales.
A) Imágenes representativas de cultivo de neuronas hipocampales de raton de 13 dias in vitro. Panel izquierdo, inmunotincion anti-TrkB (verde); panel central, inmunotincion anti-Lrig1 (rojo); panel derecho, colocalizacion de Lrig1 y TrKB (amarillo). Barra de escala, 30 µm.
B) Imágenes confocales representativas de neuronas hipocampales del cultivo representado en A. Neuronas de hipocampo de ratón cultivadas durante 13 días. Panel izquierdo, inmunotincion anti-TrkB (verde); panel central, inmunotincion anti-Lrig1 (rojo); panel derecho, colocalizacion de Lrig1 y TrKB (amarillo). Coeficiente de Mander de Lrig1 sobre TrkB: 0,92. Barra de escala, 20 µm.

Lrig1 restringe la arborización proximal de las neuronas del hipocampo aun en presencia de BDNF

Para estudiar el papel de Lrig1 en el desarrollo dendrítico mediado por BDNF, realizamos ensayos de ganancia de función en los cuales sobreexpresamos Lrig1 en neuronas hipocampales en cultivo. Con este fin, trasnfectamos cultivos de neuronas hipocampales en DIV 7 con un vector de expresión control (vector vacío) o uno codificante para Lrig1 etiquetado con Flag; ambos en combinación con un vector de expresión codificante para GFP. Después de la transfección, las neuronas se cultivaron en presencia de 30 ng/ml de BDNF durante 72 h, y se fijaron en DIV 10 para evaluar sus parámetros morfológicos por medio del análisis de Sholl (figura 16. A). Sorprendentemente, la sobreexpresión de Lrig1 no solo fue suficiente para reducir la arborización dendrítica proximal (figura 16. B) sino también varios parámetros morfométricos tales como el largo dendrítico total, el número promedio de bifurcaciones y el número de dendritas primarias promedio; aun en presencia de BDNF (figura 16. C-F).

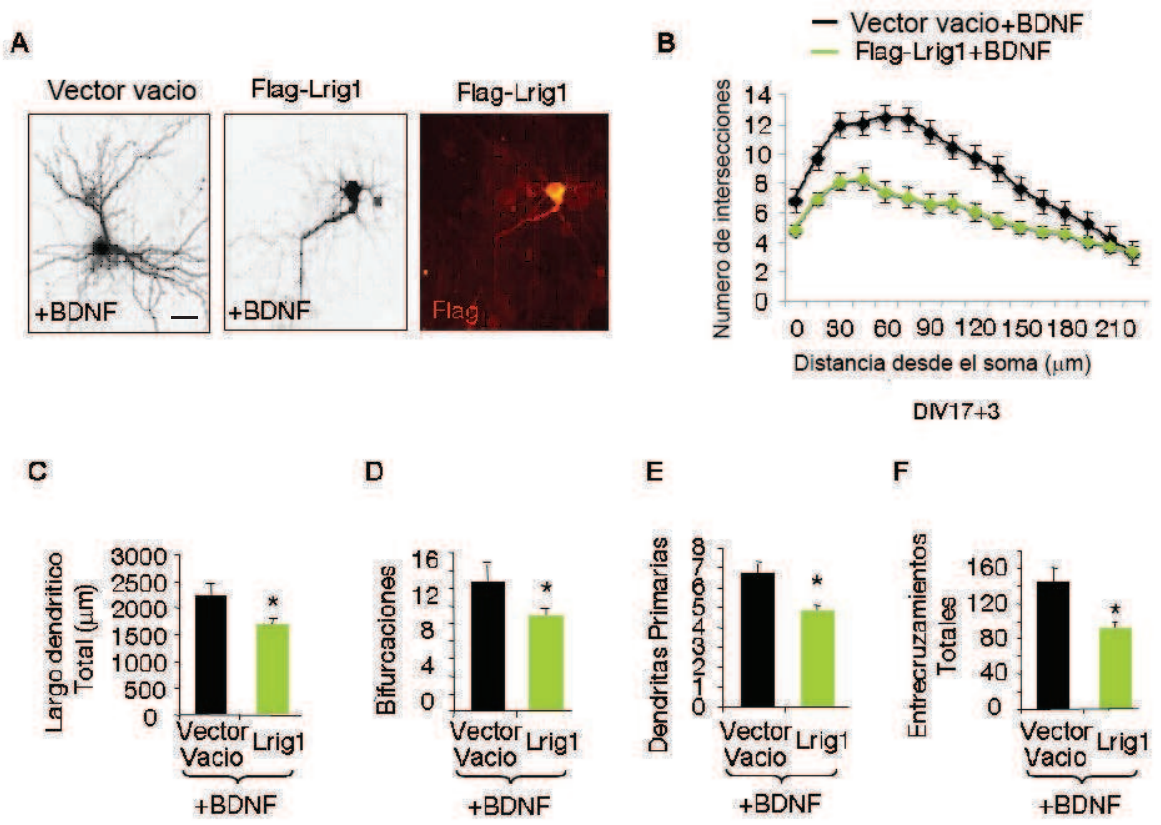


Figura.16: Lrig1 reduce la arborización dendrítica proximal de neuronas hipocampales en cultivo aun cuando son estimuladas con BDNF.

A) Imagen representativa de neuronas hipocampales de animales salvajes 17 dias y estimuladas durante los tres siguientes con BDNF (50ng/ml). Panel izquierdo imagen representativa de neurona hipocampal de raton salvaje estimulada con bdnf. Panel central, neurona representativa de cultivo transfectado con Lrig1-Flag y estimulado con bdnf. Panel derecho, imagen representativa de control de transfeccion de Lrig1-Flag, inmunotincion Anti-Flag (rojo). Barra de escala, 20 µm.

B) Análisis de Sholl de la arborización dendrítica de las neuronas del hipocampales representadas en A (* p <0,05, ANOVA de dos factores, Bonferroni de múltiples vías, N =3).

C-F) Cuantificación de longitud dendrítica total (C), ramificaciones dendríticas promedio (D), número de dendritas primarias (E), número de entrecruzamientos totales (F) de las neuronas ilustradas en el panel A (los resultados son representados como la media ± SEM; * p <0,0001, t de Student, N = 3). El experimento se repitió tres veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron un total de 20 neuronas por condición experimental.

Para confirmar que la dosis de BDNF utilizada fuese suficiente para inducir la respuesta biológica esperada repetimos el ensayo en presencia o ausencia de BDNF (figura 17. A). Si bien la dosis de BDNF utilizada, aumenta el número de dendritas primarias y secundarias de neuronas hipocampales en cultivo, BDNF no fue capaz de promover cambios en el número de dendritas de neuronas hipocampales que sobre-expresan Lrig1-Flag (figura 17. B-C). Esto indica que Lrig1 interferiría la capacidad de BDNF de promover el crecimiento dendrítico proximal. Dado que Lrig1 es capaz de asociarse a TrkB, receptor canónico de BDNF, es posible pensar que esta asociación seria la que impediría la activación de TrkB por parte de BDNF.

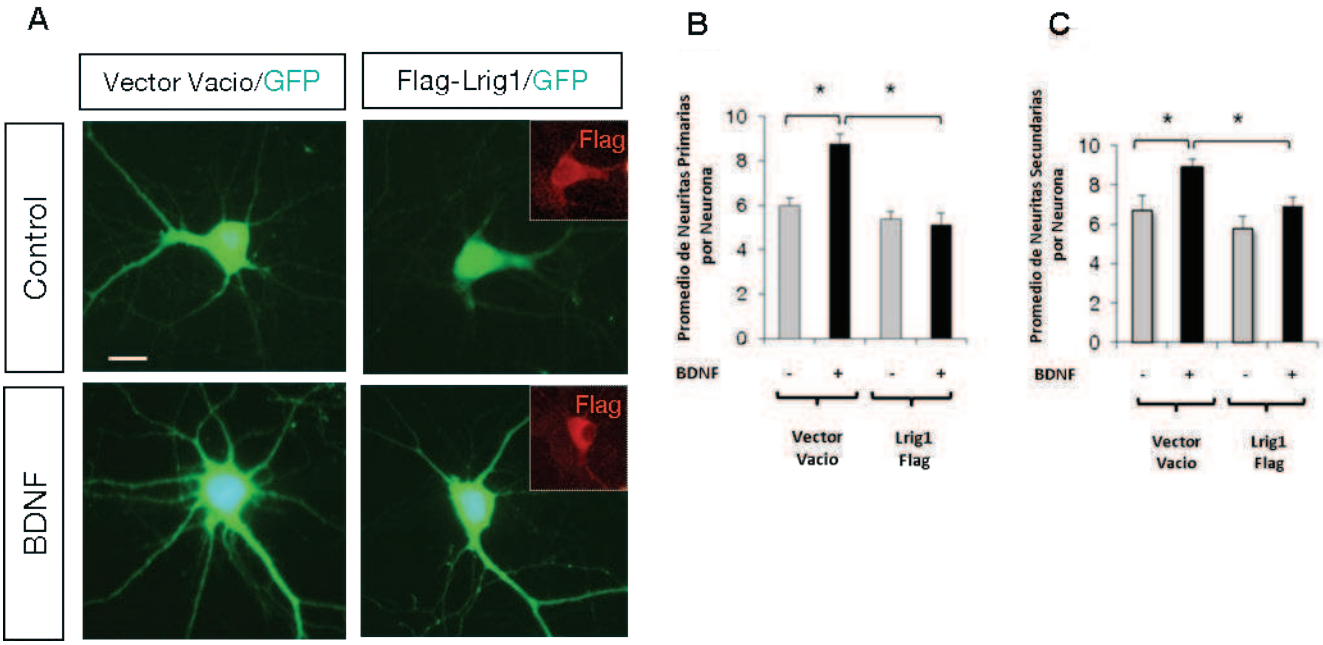


Figura.17: Lrig1 reduce la arborización dendrítica proximal de neuronas hipocampales en cultivo aun cuando son estimuladas con BDNF.
A) Imagen representativa de neuronas hipocampales de animales salvajes 17 dias y estimuladas durante los tres siguientes con bdnf (50ng/ml). Panel izquierdo imagen representativa de neurona hipocampal de raton salvaje sin estimular o estimulada con bdnf. Panel derecho, imagen representativa de neuronas transfectadas con Lrig1-Flag (insertos, control de expresión en rojo), estimulada o no con BDNF. Barra de escala, 20 µm.
B-C) Cuantificación de número de dendritas primarias (B) y Secundarias (C), de las neuronas ilustradas en el panel A (los resultados son representados como la media ± SEM; * $p < 0,05$, t de Student, N = 3). El experimento se repitió dos veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron un total de 20 neuronas por condición experimental.

La inhibicion farmacológica de TrkB bloquea el desarrollo dendritico exacervado en neuronas Lrig1 deficientes

A través de ensayos de inhibición farmacológica de TrkB evaluamos si este RTK podría ser inhibido por Lrig1 para controlar la arborización dendrítica proximal de neuronas hipocampales. Nosotros hipotetizamos que el bloqueo farmacológico de TrkB sería suficiente para abolir las diferencias en el crecimiento del árbol dendrítico detectado en las neuronas hipocampales deficientes en Lrig1. Para ello, realizamos cultivos celulares de neuronas hipocampales provenientes de ratones Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$, cultivados por 8 días in vitro en presencia o ausencia del antagonista farmacológico específico para TrkB, ANA-12 (1 mM) durante los 7 días previos a la fijación e inmunotinción con el marcador dendrítico MAP2 (figura 18. A). El análisis de Sholl mostró que las neuronas hipocampales provenientes de ratones (P0) Lrig1$^{-/-}$ poseen una mayor complejidad proximal de su árbol dendrítico respecto de neuronas provenientes de ratones Lrig1$^{+/+}$. Sin embargo, la inhibición de TrkB suprimió estas diferencias en la arborización dendrítica proximal detectadas entre neuronas Lrig1$^{+/+}$ y Lrig1$^{-/-}$ (figura 18. B). Esta inhibición fue capaz de reducir varios parámetros morfológicos como el número de dendritas primarias, el número de bifurcaciones, el número de procesos primarios, el largo total del árbol dendrítico (figura 18. C-E). De esta manera, estos ensayos complementan a los previos, que indican que Lrig1 regula los efectos dendritogénicos de BDNF sobre neuronas hipocampales.

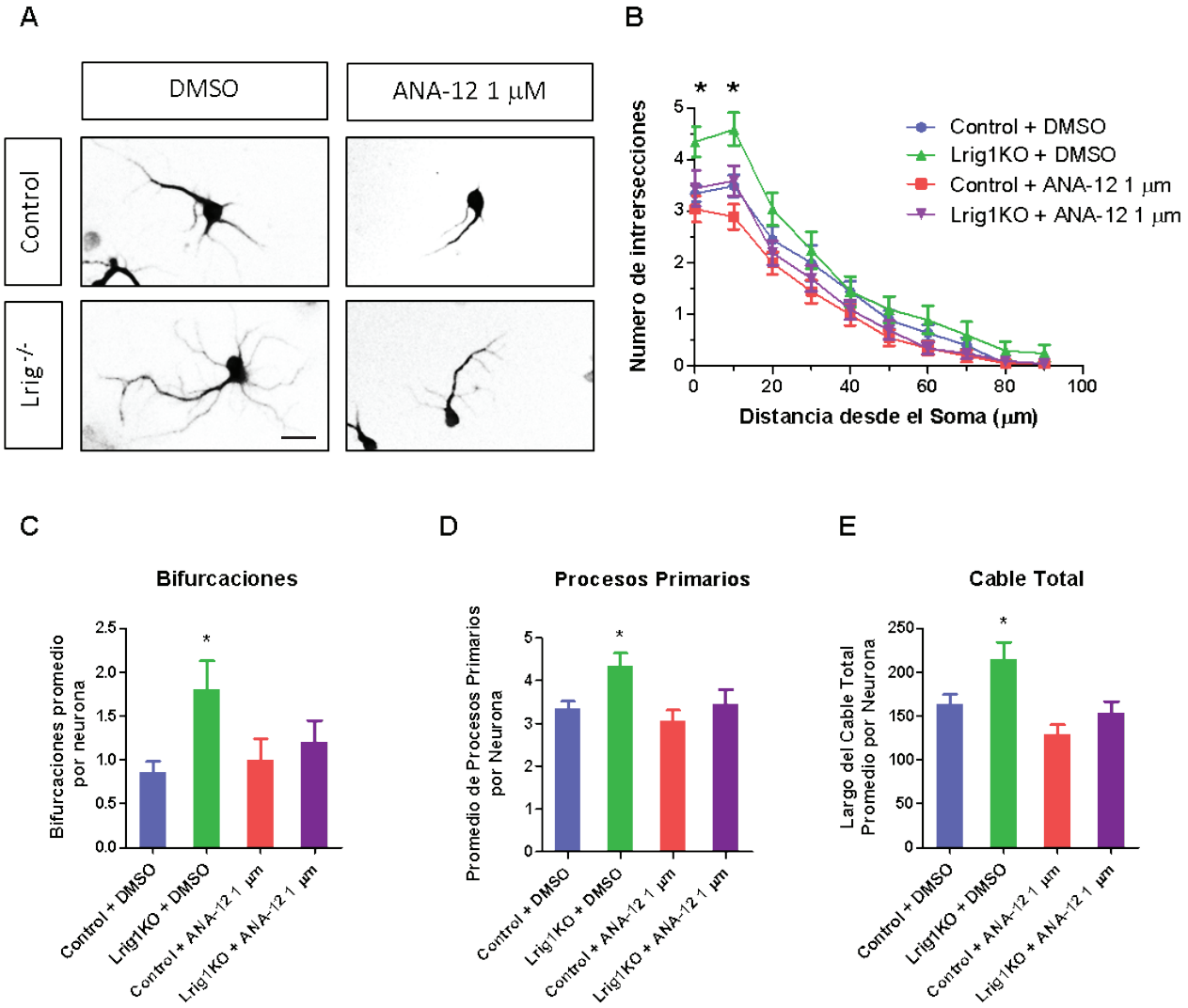


Figura.18: ANA-12 antagoniza los efectos sobre la arborización dendrítica promovidos por la ausencia de Lrig1 en cultivos hipocampales.
A) Imagen representativa de neuronas hipocampales de cultivos primarios provenientes de animales salvajes o Lrig1KO, de 9 dias in vitro. Los cultivos fueron tratados o no con ANA-12 1mM/ml. Las tinciones fueron realizadas con anti-map2. Panel izquierdo superior, imagen representativa de neurona hipocampal de cultivo de raton salvaje sin condicionar. Panel derecho superior, neurona representativa de cultivo hipocampal proveniente de raton salvaje condicionado con ANA-12. Panel izquierdo inferior, imagen representativa de neurona de cultivo proveniente de raton Lrig1KO sin condicionar. Panel derecho inferior, imagen representativa de neurona de cultivo proveniente de raton Lrig1KO condicionado con ANA-12. Los insertos son magnificaciones del área somatodendritica de Barra de escala, 20 µm.
B) Análisis de Sholl de la arborización dendrítica de las neuronas de los cultivos hipocampales representados en A (* p <0,05, ANOVA de dos factores, Bonferroni de múltiples vías, N = 3).
C-E) Cuantificación de longitud dendrítica total (C), ramificaciones dendríticas promedio (D), número de dendritas primarias (E) de las neuronas de los cultivos ilustrados en el panel A (los resultados son representados como la media ± SEM; * p <0,05, t de Student, N = 3). El experimento se repitió tres veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron un total de 20 neuronas por condición experimental.

Lrig1 modularía la arborización de neuronas piramidales corticales in Vivo

Resultados previos de nuestro laboratorio, obtenidos mediante tinción de Golgi, ya habían mostrado alteraciones en la morfología de neuronas piramidales de CA1 y CA3 de hipocampos provenientes de ratones Lrig1$^{-/-}$ [148]. Por otro lado, aquí hemos mostrado que la expresión de Lrig1 localiza no solo en la región hipocampal sino tambien en todas las cortezas. Dado que las estructuras corticales comparten con el hipocampo una gran cantidad de características relacionadas con los factores neurotróficos que las regulan y los mecanis-

mos moleculares que modulan su desarrollo y su función. Nos propusimos investigar, posibles alteraciones debidas a la ausencia de Lrig1 en estas estructuras. Para ello realizamos tinciones de Golgi en secciones coronales de cerebro de ratones salvajes y Lrig1 mutantes, de tres y cuatro meses de edad. Esta tinción genera un precipitado de cloruro de plata, opaco que tiñe con gran especificidad a las neuronas. Existe una gran diversidad de tipos de neuronas en las cortezas, cada una con su propia morfología y función [149]; nosotros en particular dirigimos nuestro análisis sobre las neuronas piramidales verticales de la capa V (figura 19. A). Nuestros resultados preliminares muestran un incremento de la complejidad dendrítica en este tipo neuronal en las cortezas de animales mutantes (figura 19. B-D). Los análisis muestran que este aumento se debe en parte a un mayor número de dendritas primarias (figura 19. E). Pero también, a un apreciable aumento de las bifurcaciones de las dendritas salientes del soma (Basales, figura 19. F) y un sutil aumento de las bifurcaciones de las dendritas salientes de la dendrita apical (Apicales, figura 19. G). En estas neuronas las diferencias observadas, se encuentran principalmente en los dominios neuronales donde normalmente Lrig1 estaría expresándose, las regiones somato-dendríticas proximales.

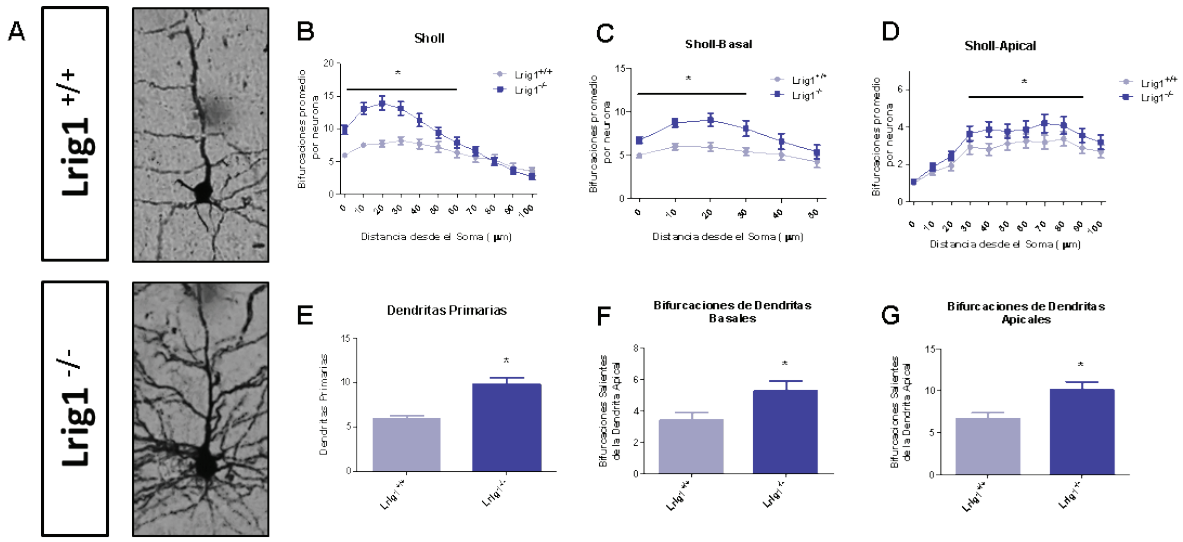


Figura.19: Lrig1 modularía la morfología de neuronas piramidales corticales.
A) Imagen representativa de neuronas piramidales verticales de corteza de ratones Lrig1$^{+/+}$ o Lrig1$^{-/-}$, tinción de Golgi. Barra de escala, 20 µm.
B) Análisis de Sholl de la arborización dendrítica de las neuronas piramidales verticales de la corteza (* p <0,05, ANOVA de dos factores, Bonferroni de múltiples vías, N = 2/3).
C-D) Análisis de Sholl de la arborización dendrítica de las neuronas piramidales verticales de la corteza (C) Basales (D), Apicales (* p <0,05, N = 2/3).
E) Cuantificación de dendríticas primarias de las neuronas ilustradas en el panel A (los resultados son representados como la media ± SEM; * p <0,05, t de Student, N = 2/3). Se analizaron al menos 17 neuronas por condición experimental.
F-G) Cuantificación de Bifurcaciones Basales (F) y Apicales (G) de las neuronas ilustradas en el panel A (los resultados son representados como la media ± SEM; * p <0,05, t de Student, N = 2/3).

Lrig1 modula la arborización y la densidad de neuronas granulares del Giro Dentado in Vivo

El Giro dentado del Hipocampo es una de las estructuras más singulares del sistema nervioso. Hasta donde se sabe, en roedores es una de las únicas dos estructuras con capacidad neurogénica en etapas ajenas

al desarrollo del sistema nervioso central y la única vinculada a procesos cognitivos. En esta estructura la expresión de TrkB es muy marcada a los largo del desarrollo perinatal, postnatal y durante la adultez. Nuestros resultados muestran que la expresión de Lrig1 posee una localización y una temporalidad compatible con la de TrkB. Dado que Lrig1 es un reconocido inhibidor de receptores tirosina Kinasa, que podría estar modulando no sólo a TrkB sino también a otros receptores, nos propusimos investigar la manifestación de posibles alteraciones debidas a la ausencia de Lrig1, en esta estructura. Para ello realizamos inmunotinciones para Doblecortina (DCX) en secciones coronales de cerebro de ratones salvajes y Lrig1 mutantes, de dos meses de edad. Este marcador identifica con gran especificidad fenotipos de neuronas Granulares del Giro Dentado de estadios inmaduros y jóvenes, nacidas dentro de los últimos 21 días previos a la fijación del tejido [150-153]. Esta característica de DCX permitió utilizarlo de dos modos; por un lado, para evaluar la densidad de neuronas granulares positivas para DCX (DCX^+); y por otro como marcador de las proyecciones. De esta manera pudimos estimar el balance neurogénesis/sobrevida de este tipo celular y evaluar la complejidad de sus árboles dendríticos, para lo cual se utilizaron reconstrucciones tridimensionales de segmentos de Giro Dentado, obtenidas por microscopia confocal (figura 20. A). Se observó un incremento de aproximadamente 50% ($Lrig1^{+/+}$: 5.930 ± 0.68 $Lrig1^{-/-}$: 8.961 ± 0.72, t-student de dos colas, $p<0.05$) en el número de neuronas granulares DCX^+ en los cortes provenientes de animales $Lrig1^{-/-}$ respecto de aquellos provenientes de animales salvajes (figura 20. B). Un análisis de Sholl detallado mostro que las neuronas granulares de animales $Lrig1^{-/-}$ poseen una complejidad dendrítica superior a la registrada en las neuronas granulares de los animales Lrig1 salvajes (figura 20. C). En estas neuronas las dendritas tienden a bifurcar de manera más próxima al soma y puede observarse un mayor número de bifurcaciones en sus árboles entre otros parámetros analizados (figura 20. D-F). Llamativamente los procesos de estas neuronas parecieran poseer un mayor calibre respecto del de las granulares de animales salvajes.

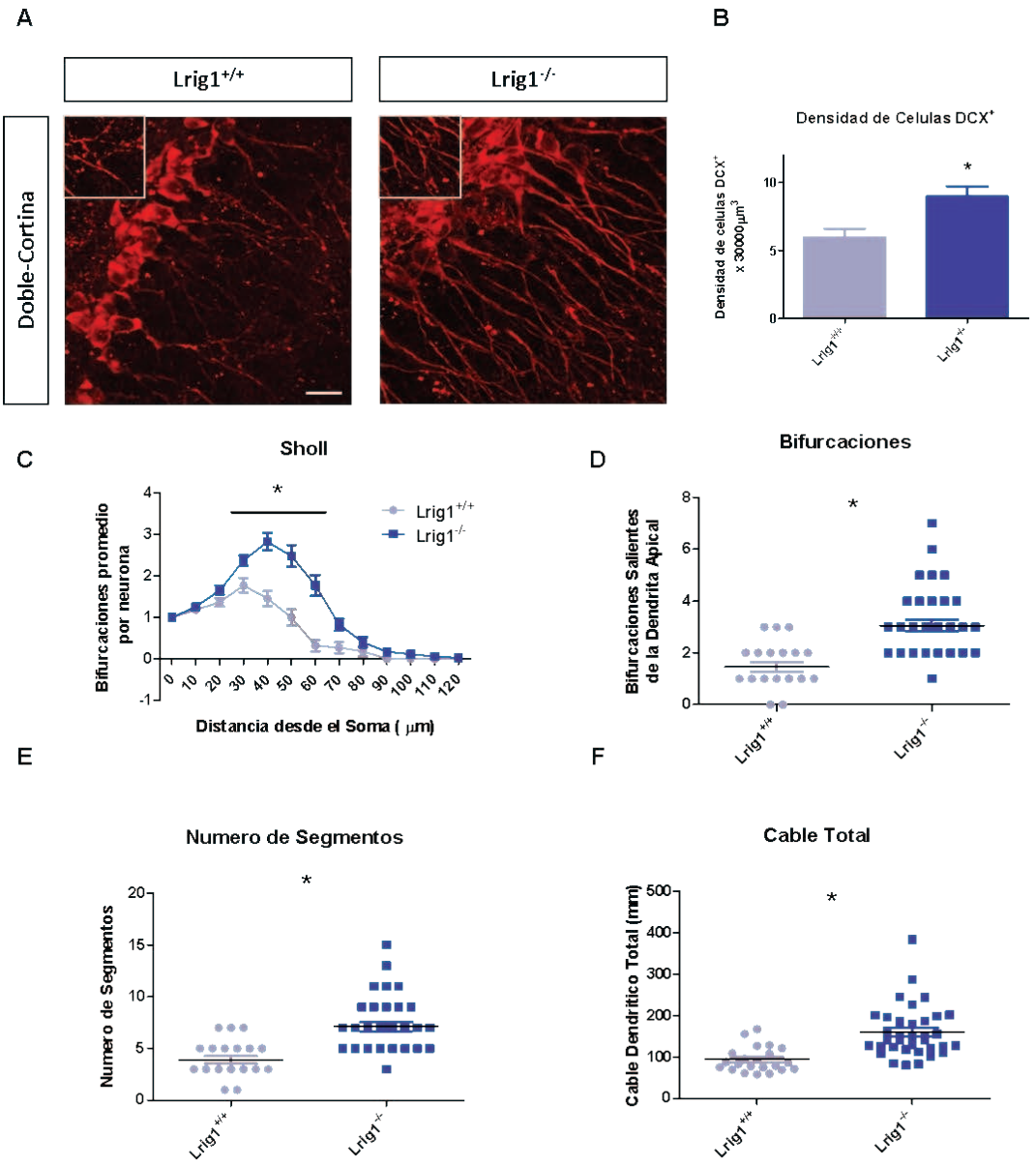


Figura.20: Neuronas granulares del giro dentado carentes de Lrig1 exhiben alteraciones en sus arboles dendríticos.
A) Imagen representativa de cortes coronales de giro dentado proveniente de ratones Lrig1$^{+/+}$ o Lrig1$^{-/-}$, inmunofluorescencia contra Doblecortina. Barra de escala, 20 µm.
B) Cuantificación que muestra el número de neuronas granulares de giro dentado DCX^{+} por cada 30000 mm^{3} de giro dentado.
C) Análisis de Sholl de la arborización dendrítica de las neuronas granulares del giro dentado (* p <0,05, ANOVA de dos factores, Bonferroni de múltiples vías, N = 2).
D-F) Cuantificación de Bifurcaciones (C), numero de dendríticas promedio (D), Cable total distinguido (E) de las neuronas ilustradas en el panel A (los resultados son representados como la media ± SEM; * p <0,05, t de Student, N = 2). El experimento se repitió dos veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron un total de 15 neuronas por condición experimental.

Expresión de Lrig2 y Lrig3 en el Hipocampo

Dado que Lrig1, parece cumplir roles crítico en el desarrollo de una correcta arquitectura neuronal, nos preguntamos si Lrig2 y Lrig3 se expresarían de forma similar a Lrig1. Con esta inquietud, analizamos la expresión del ARNm de ambas proteínas por RT-PCR en tejido hipocampal proveniente de ratas de un estadio final del desarrollo embrionario (figura 21. A y B). Se observa que los mensajeros de ambas proteínas se encuentran

presentes al menos en el tejido hipocampal disociado. Luego, para investigar los tipos celulares que podrían estar expresando Lrig2 y Lrig3 en el hipocampo, realizamos cultivos primarios obtenidos de hipocampos disociados (figura 21. C), y a través de inmunomarcaciones detectamos a estas proteínas en los cultivos. Nuestros resultados muestran que Lrig2 solo se expresa en neuronas (βIII tubulina^{+}) de forma exclusiva, puesto que no se observa localización de Lrig2 en astrocitos (S100β^{+}). En cambio, Lrig3 exhibe su expresión tanto en neuronas como en astrocitos de modo indistinto (figura 21. D).

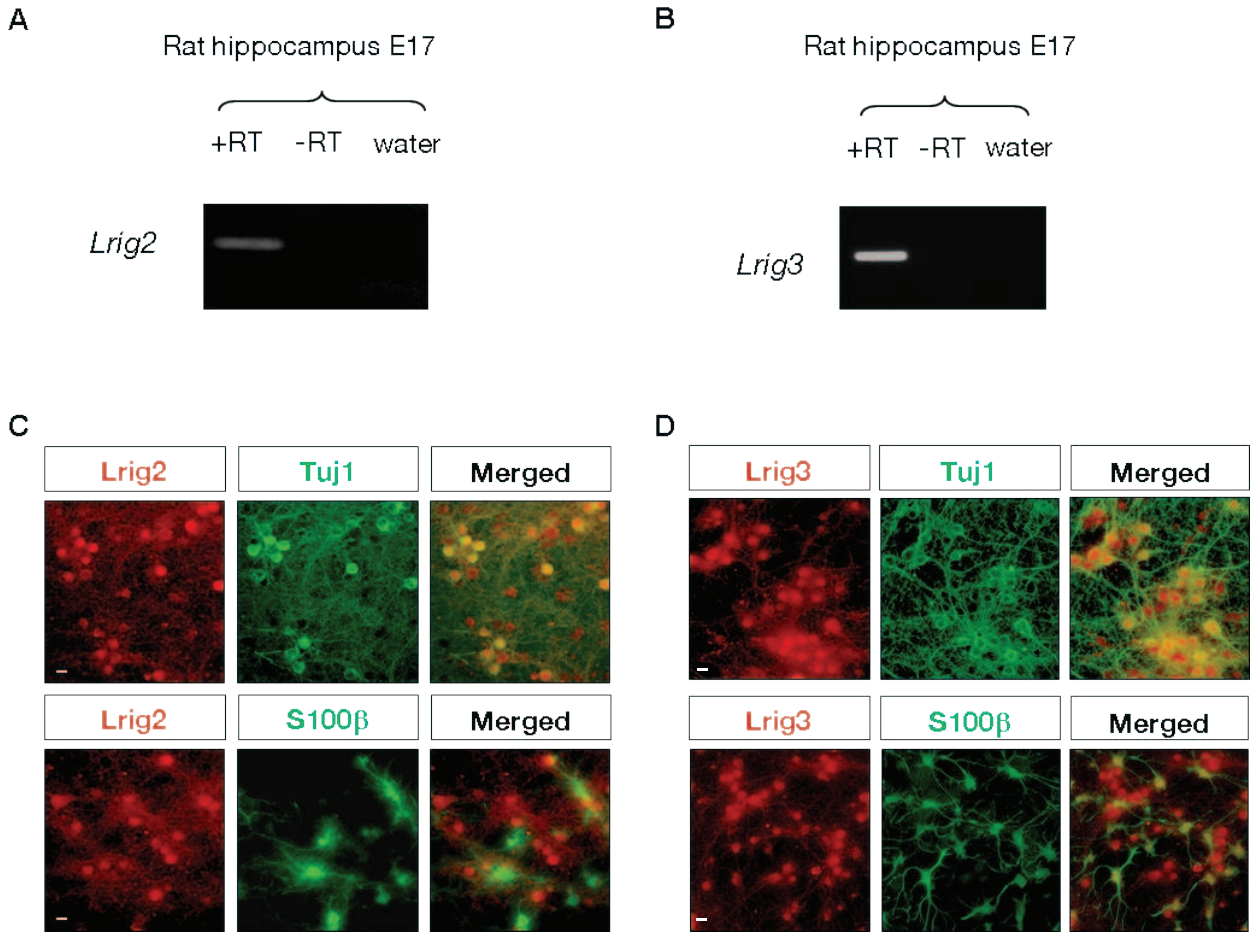


Figura.21: Expresión de Lrig2 y Lrig3 en tejido hipocampal.
A) Análisis cualitativo de la expresión del mensajero de Lrig2 en hipocampo de rata durante el desarrollo, cuantificado por RT-PCR. El recuadro muestra la expresión de Lrig2 en hipocampo de rata embrionaria de estadio E17.5 evaluada por retro-transcripcion del mensajero de Lrig2 (control de Iniciadores).
B) Análisis cualitativo de la expresión del mensajero de Lrig3 en hipocampo de rata durante el desarrollo, cuantificado por RT-PCR. El recuadro muestra la expresión de Lrig3 en hipocampo de rata embrionaria de estadio E17.5 evaluada por retro-transcripcion del mensajero de Lrig3 (control de Iniciadores).
C) Tinción de inmunofluorescencia de Lrig2 (rojo) y el marcador neuronal ßIII-tubulina (verde) en células de hipocampo disociadas cultivadas durante 7 días in vitro. En amarillo se indica colocalización de Lrig2 y el marcador neuronal. La tinción de inmunofluorescencia de Lrig2 (rojo) y el marcador astrocítico S100β (verde) en las células hipocampales disociadas cultivadas durante 7 días in vitro. El amarillo indica colocalización de Lrig2 y el marcador astrocítico. La localización de Lrig2 se presenta estrictamente neuronal. Barra de escala, 15 µm.
D) Tinción de inmunofluorescencia de Lrig3 (rojo) y el marcador neuronal ßIII-tubulina (verde) en células de hipocampo disociadas cultivadas durante 7 días in vitro. El amarillo indica colocalización de Lrig3 y el marcador neuronal. La tinción de inmunofluorescencia de Lrig3 (rojo) y el marcador astrocítico S100β (verde) en las células hipocampales disociadas cultivadas durante 7 días in vitro. El amarillo indica colocalización de Lrig3 y el marcador astrocítico. Se observa escasa marca de colocalizacion. Lrig3 se expresa en linajes gliales y neuronales. Barra de escala, 15 µm.

Modulación del Crecimiento Neurítico de Neuronas Hipocampales en cultivo por parte de Lrig2 y Lrig3

Debido a que estas proteínas también se expresan en neuronas hipocampales al igual que Lrig1, quisimos investigar posibles efectos morfológicos mediados por Lrig2 y Lrig3 en este mismo tipo celular. Para ello redujimos la expresión del ARNm de estas proteínas en cultivos maduros de neuronas hipocampales obtenidas a partir de ratónes P0. Utilizamos construcciones plasmidicas basadas en el sistema de silenciamiento por interferencia (shRNA). En los ensayos de análisis de efectos morfológicos, los cultivos son desarrollados durante 10 días in vitro y luego son transfectados con el vector plasmidico correspondiente, que expresa GFP (control) o la construcción de interferencia asociada con una secuencia de expresión para GFP. Tres días después de la transfección (13 DIV), las neuronas se fijan y se analizan como ya se mencionó anteriormente (figura 22 y 23. A). Tanto la inhibición de Lrig2 como la de Lrig3 reducen la arborización neurítica de estas neuronas (figura 22 y 23 B.). Esto se evidencia por la reducción de varios parámetros relativos a la morfología neuronal como lo son, el número de neuritas primarias, el crecimiento neuritico total, el número de bifurcaciones o de puntos terminales, y otros caracteres más (figura 22. C-G y 23. C-F). Notablemente, los efectos por los cuales se percibe una arborización reducida en cada caso parecen ser levemente diferentes. Con el silenciamiento de Lrig2 se registra una reducción general de los parámetros morfológicos neuronales, lo que no nos permite descartar que también puedan existir efectos en la sobrevida neuronal. En contraparte, el silenciamiento de Lrig3 pareciera utilizar otros mecanismos diferentes a los utilizados por Lrig2. En este caso pareciera que existiera una redistribución de los elementos de construcción del árbol dendrítico a modo tal de elongar las proyecciones en vez de ramificarlas. Esto podría implicar que Lrig3 podría cumplir un rol en el control de la homeostasis del árbol dendrítico, regulando que tipo de procesos se verían favorecidos durante el desarrollo o el mantenimiento del mismo.

La eficiencia de las construcciones de silenciamiento de Lrig2 y Lrig3 fue controlada a traves de ensayos de expresión y silenciamiento realizados previamente en células MN1 transfectadas transitoriamente con los vectores de expresión de Lrig2 y Lrig3 y sus correspondientes vectores de silenciamiento; posteriormente lisados y analizados por Western Blot (figura 22. H y 23. G).

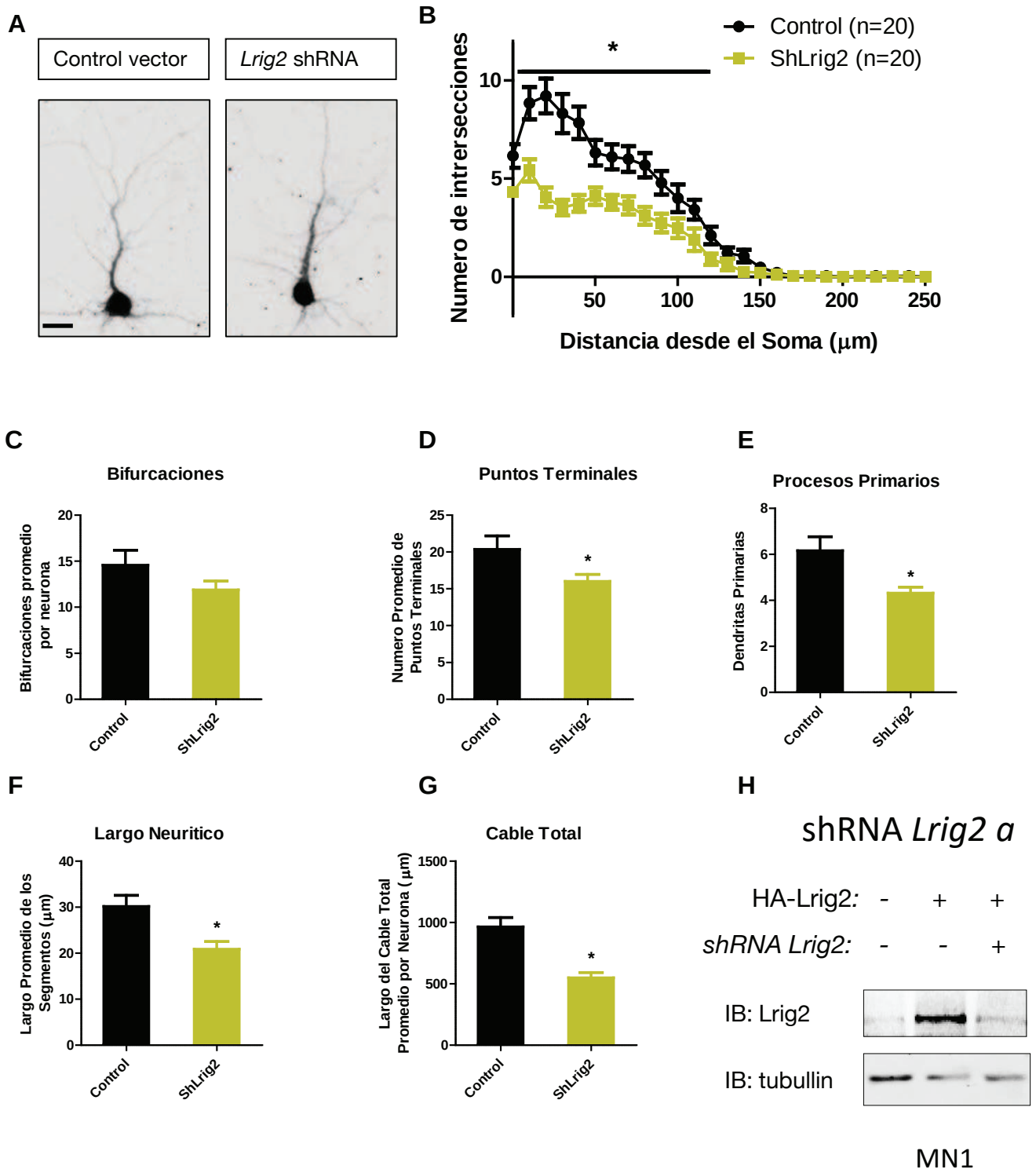


Figura.22: La inhibición de la expresión de Lrig2 reduce el crecimiento de la arborización dendrítica en neuronas hipocampales cultivadas.

A) Imagen representativa de neuronas hipocampales cultivadas durante 9 días, luego transfectadas y mantenidas durante los siguientes tres sucesivos. Grupo Control transfectado con GFP, Grupo Tratado transfectado con ShLrig2-GFP. Panel izquierdo imagen de neurona Control. Panel derecho neurona expresando el small harpin de Lrig2. Barra de escala, 20 µm.

B) Análisis de Sholl de la arborización dendrítica de las neuronas del hipocampales representadas en el panel A (* p <0,001, ANOVA de dos factores, Bonferroni de múltiples vías, N = 3).

C-G) Cuantificación de las bifurcaciones (C), ramificaciones neuriticas terminales (D), procesos primarios (E), largo neuritico promedio (F) y cable total promedio (G) de las neuronas ilustradas en el panel A (los resultados son representados como la media ± SEM; * p <0,0001, t de Student, N = 3). El experimento se repitió tres veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron un total de al menos 20 neuronas por condición experimental.

H) Control de Western Blot de la inhibición de la proteína Lrig2 en células derivadas de motoneurona de ratón MN1 transfectadas con la construcción de expresión de Lrig3 y/o de silenciamiento ShLrig2-GFP.

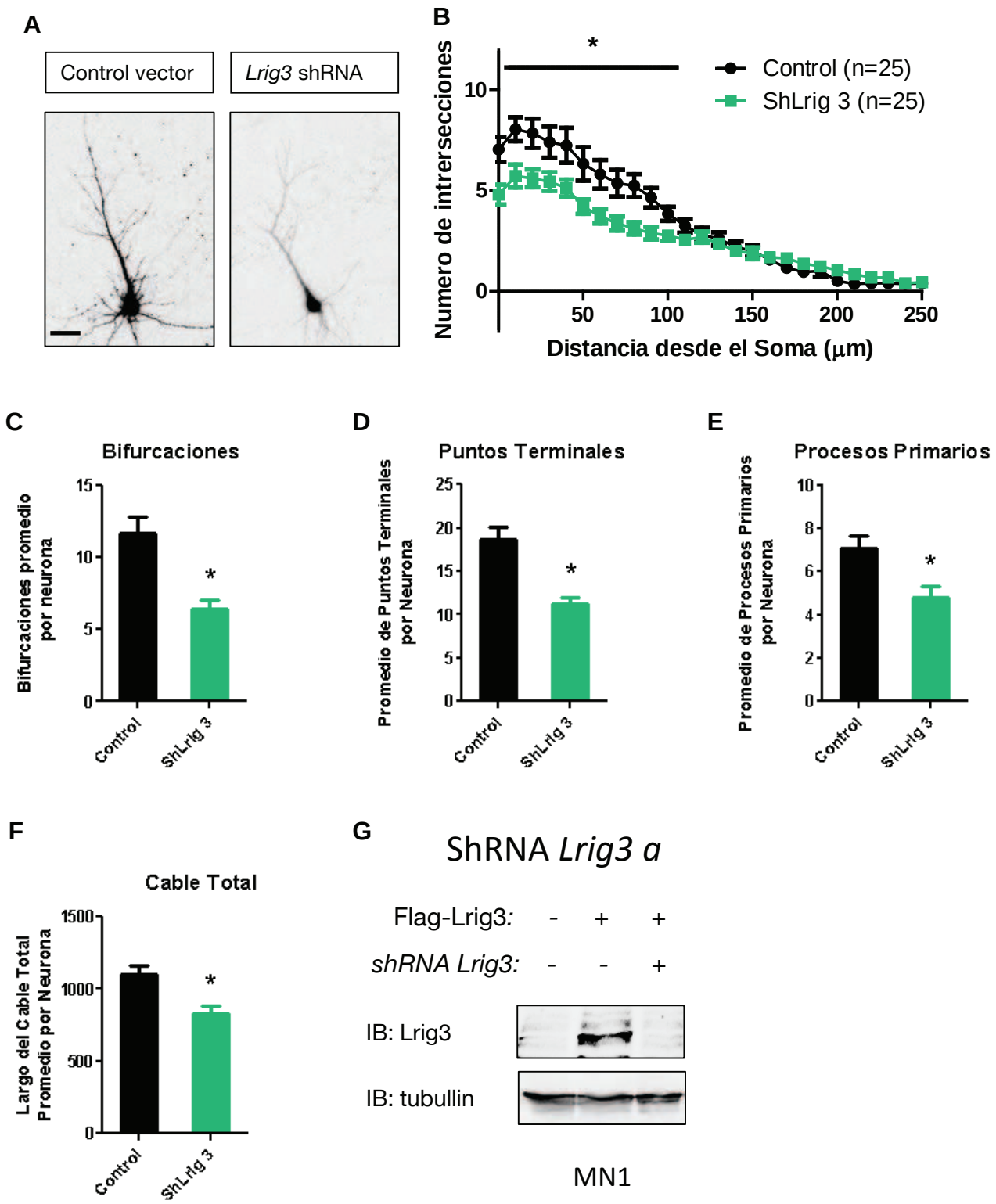


Figura.23: La inhibición de la expresión de Lrig3 reduce el crecimiento de la arborización dendrítica en neuronas hipocampales cultivadas.

A) Imagen representativa de neuronas hipocampales cultivadas durante 9 días, luego transfectadas y mantenidas durante los siguientes tres sucesivos. Grupo Control transfectado con GFP, Grupo Tratado transfectado con ShLrig3-GFP. Panel izquierdo imagen de neurona Control. Panel derecho neurona expresando el small harpin de Lrig3. Barra de escala, 20 µm.

B) Análisis de Sholl de la arborización dendrítica de las neuronas del hipocampales representadas en el panel A (* p <0,001, ANOVA de dos factores, Bonferroni de múltiples vías, N = 3).

C-G) Cuantificación de las bifurcaciones (C), ramificaciones neuriticas terminales (D), procesos primarios (E) y cable total promedio (F) de las neuronas ilustradas en el panel A (los resultados son representados como la media ± SEM; * p <0,0001, t de Student, N = 3). El experimento se repitió tres veces con resultados similares. En cada ensayo, se analizaron un total de al menos 20 neuronas por condición experimental.

H) Control de Western Blot de la inhibición de la proteína Lrig3 en células derivadas de motoneurona de ratón MN1 transfectadas con la construcción de expresión de Lrig3 y/o de silenciamiento ShLrig3-GFP.

Discusión

Las dendritas permiten a las neuronas integrar la información proveniente de una serie ordenada de entradas sinápticas. De hecho, el patrón específico de ramificaciones dendríticas limita el grado y el tipo de información que una neurona puede recibir, y a su vez influye en el modo en el que las señales sinápticas se propagan y decaen en su travesía hacia el soma [154]. En consecuencia, existe una relación bien definida entre la morfología dendrítica de una neurona y su función. Esto se debe a que el patrón espacial de la arborización dendrítica influencia su relación con el resto de su entorno, interviniendo tanto en su funcionamiento como en el rol que desempeñara dentro del circuito cerebral al que pertenezca. Por tanto es importante determinar cómo hacen las dendritas para adquirir su tamaño característico y su morfología durante desarrollo.

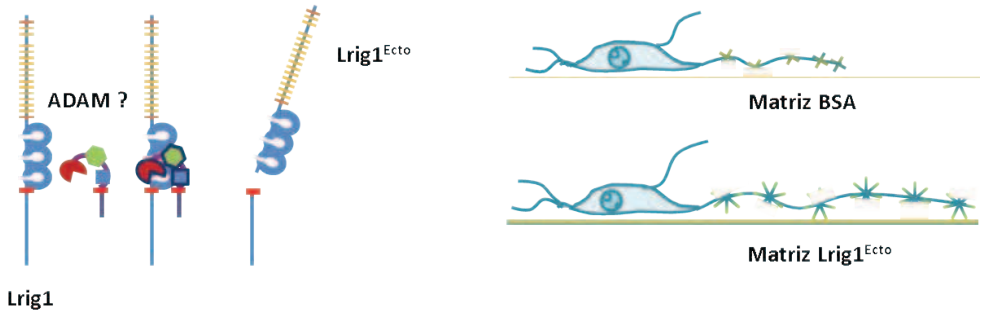
A nivel celular, el árbol dendrítico crece mediante un delicado balance entre los costos metabólicos que depende del resultado de la interacción entre factores extra-celulares, moduladores intrínsecos y la actividad eléctrica [32]. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares que modulan la morfogénesis y la complejidad dendritica en dominios específicos de una neurona [155]. En esta tesis se muestra que Lrig1 es un nuevo modulador intrínseco de la morfogénesis neuronal hipocampal.

Por un lado mostramos que Lrig1 es capaz de liberarse al medio extra-celular y que presentado ectópicamente induce la vía de señalización de MAPK. Además, al presentarse como matriz puede promover el crecimiento axonal y estimular la protrusión de proyecciones filopodiales.

Por otro lado, pudimos demostrar que BDNF induce la expresión del ARNm de Lrig1 en el hipocampo y se expresa somatodendríticamente y en regiones de densidades postsinápticas. Interesantemente, Lrig1 es capaz de asociarse con TRKB y esta unión sería la responsable de reducir la activación de TrkB inducible por BDNF en neuronas hipocampales que sobrexpresan Lrig1 ectópicamente. A nivel celular, la inhibición de la expresión de Lrig1 por shRNA aumenta la formación de dendritas primarias y secundarias; y su sobreexpresión reduce la dendritogénesis promovida por BDNF. Además a nivel estructural, la reducción en la expresión de Lrig1 promueve un incremento en el número total de espinas y altera la composición de los distintos tipos de espinas. El hecho de que el antagonista farmacológico específico de TrkB, ANA-12, sea suficiente para restaurar los fenotipos neuronales deficientes en Lrig1; sugieren que estos efectos sean dependientes de la señalización mediada principalmente por TrkB. Finalmente los análisis in vivo, demuestran que una deficiencia de Lrig1 aumenta la complejidad proximal de las dendritas de neuronas Granulares del Giro Dentado y sugieren que lo mismo ocurriría en las neuronas piramidales de la corteza.

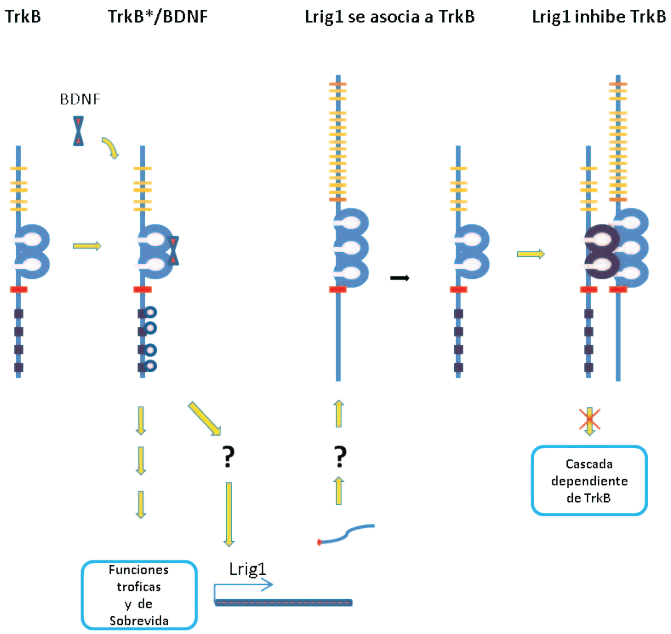
En su conjunto, los primeros resultados sugerirían que Lrig1 es clivado y liberado en el medio hipocampal extra-celular; donde la región extra-celular de Lrig1 sería capaz de inducir cambios morfológicos estructurales

en los axones, potencialmente mediados por las vías de señalización dependientes de MAP Kinasas. E incluso, quedaría sugerida la posibilidad de que Lrig1 pudiese cumplir algún rol en el sensado del medio por parte de los axones.



Clivaje y liberación de Lrig1. Crecimiento de axones y estructuras de sensado del medio extracelular.

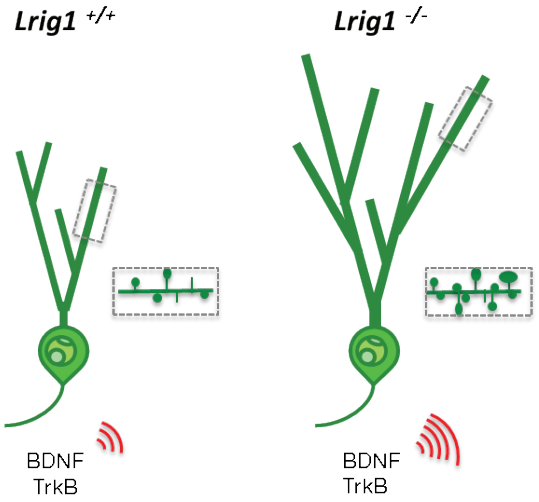
El segundo grupo de resultados, sugieren que la activación de TrkB inducida por BDNF sería capaz de promover la expresión de Lrig1 en neuronas hipocampales. Una vez expresada en membrana, Lrig1 se asociaría con TrkB para modular las respuestas biológicas mediadas por este receptor. Entre las respuestas biológicas que analizamos pudimos evidenciar alteraciones, del crecimiento del árbol dendrítico de neuronas piramidales y granulares, de la formación de espinas dendríticas y de la modulación del balance neurogénico/sobrevida de las células granulares del giro dentado.



Mecanismo molecular de interaccion de Lrig1 TrkB propuesto.

Lrig1 ha sido descripto previamente como un inhibidor de varios receptores tirosina Kinasa [39, 40, 47], algunos de ellos como el receptor Met y al menos una variante del receptor de EGF, llamada Caleb, han demostrado ser capaces de modular también la dendritogénesis en neuronas hipocampales [126, 156, 157]. Esta evidencia

plantea la posibilidad de que la reducción de la complejidad dendrítica observada en las neuronas Lrig1 mutantes pueda ser debida, al menos en parte, a la ausencia de interacción de Lrig1 con estos otros receptores. Tal vez un argumento a favor de nuestra hipótesis sea el de que la ausencia Lrig1 fenocopia con mayor similitud los efectos morfológicos promovidos por TrkB-BDNF que aquellos promovidos por estos otros receptores; y más importante aún, el antagonismo farmacológico especifico contra este receptor es suficiente para restaurar los fenotipos morfológicos observados en neuronas mutantes. A pesar de ello, podrían requerirse experimentos adicionales para poder discernir este interrogante.



Esquema propuesto de funciones biológicas controladas por Lrig1 en neuronas granulares del giro dentado.

Es factible que Lrig1 influya indirectamente en el número de sinapsis, no solo por el empobrecimiento que ocasiona en la arborización dendrítica, sino también por una reducción de la expresión y/o el tráfico de proteínas sinápticas asociadas a vesículas; o incluso modulando la actividad de receptores de neurotransmisores dependientes de la acción de neurotrofinas [144, 158-161]. Será necesario seguir trabajando para dilucidar las posibles alteraciones sinápticas de las neuronas Lrig1 mutantes. Sin embargo, el presente aumento detectado en el número de espinas dendríticas en ausencia de Lrig1 y su localización, obtenida por fraccionamiento, en densidades postsinápticas, anticipa un posible rol de esta proteína en el control de los contactos sinápticos.

Por otra parte, es concebible pensar que la ausencia de Lrig1 también pudiera afectar el modo en el que los axones se desarrollan e inervan, en los animales mutantes. Experimentos in vivo podrían aportar información acerca de esta posibilidad.

En la última década han sido descriptas una gran variedad de proteínas LRR de localización dendrítica, que presentan una expresión diferencial dependiendo del tipo celular, y cuyos dominios presentan una organización estructural similar entre si. Sin embargo, la importancia de tal diversidad no es aun, bien comprendida. Recientemente, se ha informado de que otra proteína que contiene dominios LRR, Slitrk5, es capaz de mejorar la señalización y las respuestas biologicas de TrkB inducida por BDNF en neuronas GABAérgica estriatales

[140]. Esta evidencia, concuerda con la hipótesis de que las proteínas LRR podrían servir como reguladores cruciales de señalización del receptor de BDNF, TrkB. En este contexto, consideramos que nuestros resultados ponen en relevancia la contribución fisiológica de proteínas LRR en el control de la señalización de BDNF y establecen que la participación de los receptores TrkB con proteínas LRR específicas, representa un nuevo mecanismo general de cómo las neuronas de una región particular del cerebro regulan el amplio repertorio de respuestas biológicas mediadas por la señalización inducida por BDNF durante el desarrollo.

Creemos entonces, que este estudio (i) proporciona nuevos conocimientos sobre los mecanismos mediante los cuales las proteínas LRR controlan la conectividad neuronal en regiones específicas del cerebro, y (ii) contribuye a la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la regulación, en subdominios neuronales específicos, de la señalización inducida por neurotrofinas, que modulan tanto el desarrollo como la función de las estructuras donde se expresan.

Aunque la comprensión de las funciones de las Lrigs in vivo dista de ser completa; evidencias fisiológicas indican que los genes Lrig tienen funciones redundantes e independiente durante el desarrollo [162]. Sin embargo, los experimentos de silenciamiento de Lrig2 y Lrig3 que realizamos en cultivos de células hipocampales parecieran mostrar alguna diferencia respecto de los efectos promovidos por lrig1 sobre neuronas hipocampales. En estos experimentos el silenciamiento de Lrig2 o Lrig3 mostro una retracción de la morfología neuronal. Llamativamente, el silenciamiento de Lrig2 causó un empobrecimiento de la complejidad dendrítica en casi todos los parámetros morfológicos de los cultivos hipocampales. Por su parte, el silenciamiento de Lrig3 mostro una reducción en frondosidad del árbol dendrítico, similar a lo observada con el silenciamiento de Lrig2. En consecuencia, la contribución funcional de Lrig2 y Lrig3 pareciera distar de aquella revelada para Lrig1 durante el desarrollo del sistema nervioso; y por tanto a nuestro entender sigue siendo aún desconocida. Haría falta estudiar más profundamente a estas dos proteínas para poder comprender en forma inequívoca sus funciones.

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Biblioteca Digital FCEN-UBA

El capítulo 2 fue retirado a pedido del autor

At author's request chapter II has been withdrawn

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Biblioteca Digital FCEN-UBA

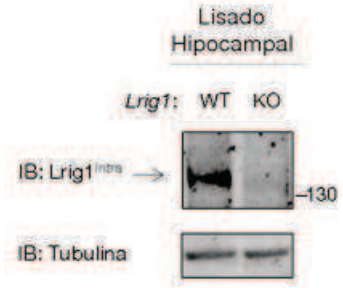
El apartado “Conclusión general y perspectivas” fue retirado a pedido del autor.

At author’s request section ““Conclusión general y perspectivas” has been withdrawn.

Procedimientos Experimentales

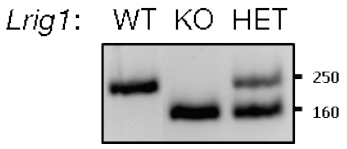
Ratones mutantes deficientes en Lrig1

Los ratones Lrig1-mutantes fueron producidos en los laboratorios de Hakan Heddman en la Universidad de Umeå, Suecia. Utilizando técnicas de recombinación homóloga y de recombinación por CRE, se crearon embriones de ratones C57BL6 carentes del exon1 del gen Lrig1. Esta ablación impide la expresión total de la proteína Lrig1. La progenie de estos ratones debió ser mantenida en colonia mixta SV129 / C57BL6 para reducir problemas en la reproducción de los mutantes. Todos los ratones utilizados en los ensayos son descendencia de una única primera pareja de ratones heterocigotos para el gen Lrig1.



Confirmación de la ablación de Lrig1 en animales Lrig1KO. Análisis de muestras de tejido hipocampal de animales salvajes y mutantes. El análisis por Inmunoblot es realizado con anticuerpo que reconoce la región intracelular de Lrig1 y reprobado contra Tubulina. Se observa ausencia de la proteína en tejido proveniente del animal mutante

Los ratones transgénicos se genotiparon con la siguiente secuencia de primers específicos para ratón: Lrig1KO-reverse: CTCCAGAATCACGCTCACT; Lrig1KO-foward: GCTAAGCGTTTTCAGTCCCAGA; Lrig1wt -foward: CTGTGAGTATCGCCTTTGCT. De esta forma se obtiene una banda de 250 pb para la banda wt y 160 pb para la banda KO como se muestra en la siguiente figura esquemática:



Confirmación de la ablación de Lrig1 en animales Lrig1KO. Análisis de muestras de tejido de animales salvajes, heterocigotos y mutantes. El análisis resuelto en gel de agarosa 3% es realizado por PCR con las secuencias arriba mencionadas. Estas secuencias reconocen una porción del exón 1, que es aquel modificado en la versión mutante para evitar su transcripción.

Líneas Celulares Recombinantes

Las células COS-7 provenientes de riñón de mono y HEK-293T de riñón humano, se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dullbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Ledda et al., 2008). MN1 es una línea celular inmortalizada derivada motoneuronas de ratón, la cual expresa Lrig1, esta línea fue cultivada en DMEM suplementado con 7.5% de FBS y 1% HEPES (Ledda, et al., 2008).

Transfección de Lineas Celulares Recombinantes

Las células COS-7, HEK-293T y MN1 fueron transfectadas con Polyetilenamina - PEI (Polysciences) a una concentración de 2mg de PEI por mg de DNA total; sobre cultivos de 80% de confluencia previamente acondicionados con medio fresco 30 minutos antes de la transfección. El medio de cultivo fue siempre reemplazado por medio fresco luego de 2 hs de transfección para evitar los efectos toxicos del PEI sobre los cultivos.

Cultivo primario de neuronas del hipocampales

Cultivos de neuronas hipocampales de rata fueron obtenidos a partir de la disociaron por trituración de hipocampos disecados de ratas de día embrionario (E) 17,5. Cultivos de neuronas del hipocampo de ratón se prepararon a partir de animales neonatos de día postnatal 0 (P0). En este caso, la disociación de la estructura hipocampal se obtuvo a través de la digestión con 45U de papaína y 0,05% de DNAsa en medio Hank equilibrada a 37 ºC durante 20 min, y la posterior trituración mecánica del tejido. En el caso de los cultivos provenientes de ratón se realizó un pre cultivo de dos horas en DMEM suplementado con suero fertal bobino 10%, penicilina, estreptomicina, y Glutamax (Gibco). Más tarde el medio se reemplazó por medio de desarrollo de cultivos neuronales que se detalla a continuación. En ambos casos las células disociadas fueron crecidas en medio Neurobasal (Gibco) con suplemento B27 (Gibco), penicilina, estreptomicina, y Glutamax (Gibco) y sembradas en placas de 24 pocillos recubiertos con poli-D-lisina (10 mg / ml).

Transfección de Cultivos primarios

Para la transfección de cultivos primarios, se sembraron neuronas hipocampales sobre cubreobjetos colocados en placas de 24 pocillos a una densidad de $1{,}2x10^5$ células por cubreobjeto. Las neuronas se cultivaron durante diferentes días in vitro antes de la transfección según los requerimientos de cada experimento. Para el procedimiento de transfección el medio de cultivo fue reducido a 150 ml por posillo. Se preparan soluciones de 2 mg de lipofectamina 2000 y de 1 mg de construcciones de expresión codificantes para distintas proteínas, según corresponda, en 50 ml de neurobasal por posillo. Ambas soluciones se mezclan y se las permite reposar por 20 minutos antes de ser añadidas a cada posillo. Al cabo de dos horas el medio de transfección es remplazado por medio fresco de crecimiento neuronal para evitar efectos de toxicidad por sobrexposición a lipofectamina.

Vectores de Expresión y Silenciamiento

Para los experimentos de silenciamiento, las neuronas hipocampales se transfectaron con 1 mg de Lrig1-shRNA-GFP. Para los experimentos de sobreexpresión, las neuronas se cotransfectaron con un vector de Lrig1 etiquetado con Flag (0,9 mg) y un vector de expresión de GFP (0,1 mg).

El vector Lrig2-HA fue adquirido de Cellogenetics, Inc. El vector que codifica Lrig1 etiquetado con Flag se ha descrito previamente (Nilsson et al., 2003). El vector de expresion Lrig3-Flag fue proporcionado amablemente por Lisa Goodrich (Escuela de Medicina de Harvard, EE.UU.) (Abraira et al., 2010). El vector que codifica TrkB-HA se ha descrito previamente (Bibel et al., 1999). El vector que codifica para GFP se obtuvo de Clontech.

El vector retroviral pRetro-U6G shRNA se utilizo como esqueleto de las tres secuencias de interferencia utilizadas para la expresión de Lrigs-shRNA-GFP. Lrig1-shRNA-GFP contiene la secuencia antisentido 5'-TCA GTC ACA TTG CTG AAG G-3 ', que corresponde a los nucleótidos 1494-1512 de Lrig1 de ratón/humano. La construcción de Lrig2-shRNA-GFP contiene la secuencia 5´-GCT TGG AAT CAG AAA CAT TAC-3´, y corresponde a los nucleótidos480-500 de Lrig2 de rata/ratón. Para la construcción de Lrig3-shRNA-GFP la secuencia contenida es 5´-GAG CCA CCT TCA AAG CCT TCA-3´, y corresponde a los nucleótidos 545-565 de Lrig3 ratón/rata/humano. Estas regiónes no contienen homología con los otros Lrigs u otros genes conocidos según lo determinado por una búsqueda en BLAST. La eficiencia del los silenciamientos inducidos por estos vectores fue confirmada por PCR en tiempo real y Western Blot para los tres vectores; y ademas en el caso de Lrig1-shRNA-GFP también se verifico por inmunofluorescencia. Los vectores de silenciamiento se obtuvieron de Cellogenetics.

Análisis de Cultivos Primarios

Para la evaluación de la morfología dendrítica y la densidad de espinas dendríticas, el axón fue identificado y excluido en base a la ausencia de inmunomarcacion para MAP-2. Fotos de neuronas disociadas fueron adquiridas utilizando un microscopio Olympus IX2081, los análisis de complejidad dendrítica fueron realizados sobre neuronas de morfología piramidal, con una dendrita principal de mayor espesor y varias dendritas secundarias más finas. La complejidad dendrítica se analizó mediante el análisis de Sholl, plug-in de NeuronJ y una variante del software de Matlab de Bonnie Firestein [257, 258] . Se realizó el análisis Sholl con anillos concéntricos de intervalos de 10 o 15 mm desde el soma. Las dendritas de menos de 3 mm de longitud fueron contabilizadas.

Para la evaluación de densidad de espinas dendríticas, las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal Olympus IX2081 con tecnología FV1000, utilizando un objetivo 60X y una amplificación digital de

2X. Para estos ensayos, una proyección en serie sobre el eje Z se realizó para cada neurona. La densidad se estimó como el número de espinas dendríticas en segmentos de al menos 100 mm de longitud por neurona.

Lisados de células totales, inmunoprecipitación y Western Blot

Las células se lisaron a 4ºC en una solución de lisis a base de Tris, EDTA y Sodio (TNE) con 0,5% de Triton X- 100, 1% octil-betaglucoside además de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los lisados obtenidosfueron aclarados por centrifugación y se analizaron por inmunoprecipitación y Western blotting como ya fuera descrito previamente (Paratcha et al., 2003). Las membranas de transferencias se escanean en un STORM PhosphorImager (GE Healthcare Life Sciences), y las cuantificaciones se realizaron con el software adjunto ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences). Los números debajo de cada calle indican las veces de inducción con respecto a la proteína control de normalización (βIII-Tubulina/Actina).

Tincion de Golgi

Brevemente, cerebros de ratones se colocaron en solución de fijación (formalina al 10%) y se almacenan en el la oscuridad durante 24 horas a temperatura ambiente (RT). Entonces, los cerebros se transfirieron a una 3% de solución de dicromato de potasio y se almacena a temperatura ambiente durante 4 días. A partir de entonces, el cerebro se transfirió a una solución de nitrato de plata 2% durante 24 h. Los cerebros fueron cortados en secciones de 100 µm de espesor usando un vibratomo. Secciones de hipocampo se recogieron en una solución de gelatina 0,3% y luego desidratados a temperatura ambiente, en alcohol y aclarado con xileno. Finalmente, se montaron sobre portaobjetos gelatinizados al 0,3%. La complejidad proximal y las ramificaciones de los dominios dendríticos apicales y basales fueron evaluadas en las neuronas piramidales de la corteza perirrinal (análisis Sholl). Las imágenes de campo claro fueron tomada en un microscopio Zeiss Axiophot.

RT-PCR

Se analizó la expresión del ARNm de las proteínas Lrig1, Lrig2, Lrig3 y la proteína de unión al TATA (TBP). El ARN total se aisló a partir de hipocampos de rata de diferentes etapas del desarrollo embrionario y postnatal. Para ello se utilizaron columnas de ARN-Easy (Qiagen). El ADNc se sintetizó usando transcriptasa inversa y hexámeros aleatorios a modo de iniciadores (Applied Biosystems). El ADNc fue amplificado utilizando los siguientes conjuntos de iniciadores: proteína de unión a TATA (TBP): forward, 5'- GGG GAG CTG TGA TGT GAA GT-3; reverse, 5'-CCA GGA AAT AAT TCT GGC TCA- 3 '; rata Lrig1: forward, 5-CTG CGT GTA AGG GAA CTC AAC-3; reverse, 5- GAT AGA CCA AAC TCA GCT CCA-3; Lrig2 de rata: forward, 5´- ACG ACA

CAG CAG ACC ACA AC-3´; reverse, 5´- CAG AGT AGC ATT GGG CAT GA-3´; Lrig3 de rata: forward, 5´-GGC TCC GAC GTG AGT TTT AC-3´; reverse, 5´- GTC TTT CTT CCA AGC GAA CG-3´.

La PCR en tiempo real se realizó utilizando el SYBR Green qPCR Supermix (Invitrogen) con sistema de detección de secuencias ABI7500 (Applied Biosystems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones se realizaron en un volumen de 15 µl. Los nucleótidos, la ADN polimerasa Taq, y buffer estaban incluidos en la mezcla LightCycler-DNA master SYBR Green mix (Invitrogen). La PCR en tiempo real se realizó utilizando el Kit SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen) con un sistema de detección de secuencia ABI7500 (Applied Biosystems), de acuerdo con la instrucciones del fabricante. Las reacciones se realizaron en 25 ml de volumen. Los desoxinucleótidos, la Taq polimerasa, y la solución Buffer están incluidas en el Kit LightCycler-Master mix de ADN SYBR Green (Invitrogen).

Ligandos e Inhibidores farmacológicos utilizados

Los compuestos se obtuvieron de diversas fuentes como se expresa a continuación: BDNF y Lrig1^{Ecto}-His fueron comprados en R&D Systems (Abingdon, Reino Unido). ANA-12 fue comprado en TOCRIS.

Anticuerpos

Los anticuerpos se obtuvieron de diversas fuentes como se expresa a continuación: anti-fosfotirosina (P-tyr) y anti-phosphoTrkB (p-tyr 705) eran de Santa Cruz Biotechnology, anti- TrkB fue de BD Biosciences Pharmingen, anti-Lrig1, policlonal de conejo del contra su dominio extra-celular (regalo del doctor Satoshi Itami, Universidad de Osaka, Osaka, Japón) (Ledda et al., 2008; Suzuki et al., 2002), anti-Lrig1 contra su dominio intracelular era de Sistemas RnD, anti- HA era de Roche, policlonal de conejo anti-Lrig2-147 (Rondahl et al., 2013) y policlonal conejo anti-Lrig3-207 eran del Dr. Håkan Hedman laboratorio (Universidad de Umeå, Suecia), anti-fosfo-MAPK (Thr-202 / Tyr-204) era de New England Biolabs, antiβIII-Tubulina era de Promega, y anti-MAP-2, anti-S100ß y anti-Flag (M2) eran de Sigma Aldrich.

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Biblioteca Digital FCEN-UBA

Las páginas 100 a 104 han sido retiradas a pedido del autor

At author's request pages 100 to 104 have been withdrawn.

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Biblioteca Digital FCEN-UBA

La bibliografía fue retirada a pedido del autor.

At author's request the bibliography has been withdrawn.

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Biblioteca Digital FCEN-UBA

El índice fue retirado a pedido del autor

At author's request the index has been withdrawn