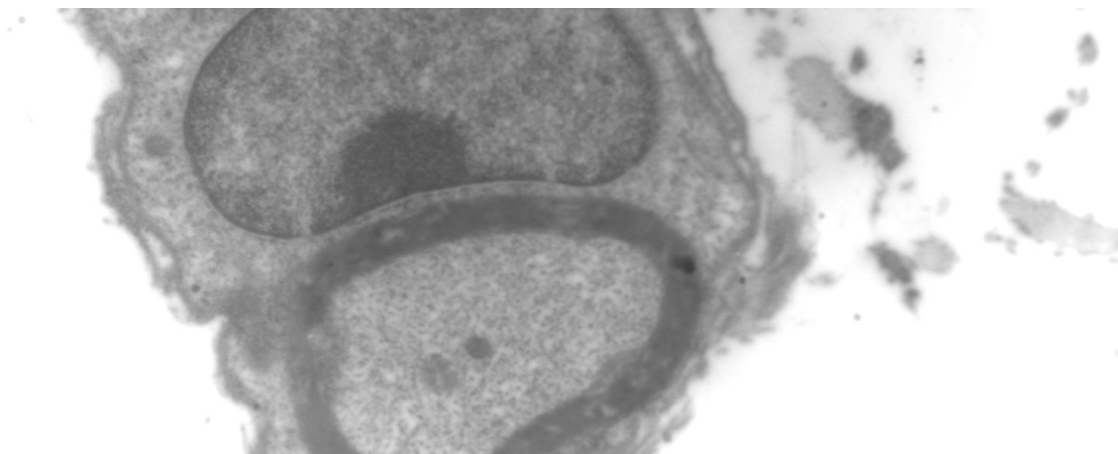


Tesina de Fin de Carrera de la Licenciatura en Bioquímica



Estudio de las fibras nerviosas de ratones Trembler J y Wild Type desde el punto de vista ultraestructural y bioquímico

Lucía Veloz

Tutora: Dra. Alejandra Kun, Co-tutor: M. Sc. Carlos Romeo

Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos - IIBCE

Octubre 2017

Tabla de Contenidos

Resumen	2
Introducción	4
La fibra nerviosa como unidad estructural del SNP	5
Estructura de la fibra mielinizada	5
Composición proteica de la mielina	7
Síndrome Charcot Marie Tooth	10
Modelo murino Trembler J	11
Objetivos	13
Materiales y Métodos	14
Ejemplares utilizados	14
Disección de nervios ciáticos	14
Procesamiento de la muestra para MET	15
Fraccionamiento de los nervios, SDS-PAGE y Western Blot	16
Detección de las proteínas neo-sintetizadas	18
Extracción de ADN genómico y mitocondrial para qPCR	19
Resultados	23
Análisis por MET de nervios TrJ y WT	23
Caracterización funcional de ribosomas TrJ	30
Caracterización de componentes axoplásmicos y mielínicos	32
Evaluación de la cantidad de mitocondrias mediante qPCR	34
Discusión	38
Análisis de las fibras nerviosas por MET	38
Caracterización funcional de la maquinaria traduccional	44
Caracterización bioquímica de los componentes axoplásmicos y de CS	45
Análisis por qPCR del ADN mitocondrial	46
Conclusiones	48
Referencias Bibliográficas	49

Resumen

Las Charcot Marie Tooth son un grupo de poli-neuropatías sensoriales y motoras progresivas, de amplia heterogeneidad tanto genética como clínica. Es el grupo de neuropatías periféricas hereditarias más común en humanos, teniendo una prevalencia en la población de 1 en 2500 -0.04% de la población mundial. Los individuos con CMT experimentan una neuropatía motora y sensorial distal progresiva en brazos y piernas, que se manifiesta entre la segunda y la tercera década de vida. Esta resulta en debilitamiento y atrofia muscular.

En particular, CMT1E es un grupo de mielopatías causadas por mutaciones puntuales en el gen *pmp22* (Li et al., 2013). La proteína codificada por el mismo, PMP22, es una pequeña glicoproteína altamente hidrofóbica que cuenta con unos 160 residuos aminoácidos, y un peso molecular de 22 kDa, siendo una de las proteínas mayoritarias de la mielina compacta. La afectación de PMP22 produce la hipomielinización de las fibras nerviosas, acompañada de la formación de agregosomas perinucleares principalmente conformados por PMP22, afectando el normal funcionamiento de la fibra.

Para acercarnos a la comprensión de a qué niveles afecta el normal funcionamiento de la fibra la mutación presente en las CMT1E, se utiliza el modelo murino Trembler J para su estudio. Estos animales presentan una mutación puntual en el gen *pmp22*, idéntica a una mutación humana (Valentijn et al., 1992), que resulta en el cambio de una leucina por una prolina en la posición 16 de la proteína, lo que los vuelve un modelo ideal para el modelado de estas neuropatías.

A partir del estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión hallamos un número de mitocondrias incrementado en los nervios ciáticos de ratones Trembler J con respecto a los animales WT. Estos resultados podrían indicar que las fibras afectadas tienen mayores requerimientos energéticos, acompañados de un envejecimiento celular incrementado a causa de la acumulación de “basura celular”, lo que podría

dificultar el reciclaje mitocondrial. A su vez los nervios ciáticos de ratones TrJ presentaron una síntesis proteica incrementada y una mayor cantidad de incisuras de Schmidt- Lanterman.

Este trabajo presenta una perspectiva general del fenotipo neurodegenerativo en las fibras TrJ, que desde un punto de vista metabólico podría abrir una nueva perspectiva en la comprensión de la neuropatía periférica modelizada en el murino TrJ.

Palabras Clave: CMT1E, Trembler J, mitocondria, ribosomas.

Abreviaturas:

SN: Sistema Nervioso

SNC: Sistema Nerviosa Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

CS: Célula de Schwann

CMT: Charcot Marie Tooth

Tr J: Trembler J

WT: Wild Type

MET: Microscopía Electrónica de Transmisión

Introducción

El Sistema Nervioso (SN), carga con la compleja tarea de captar, procesar e integrar la información a modo de controlar y coordinar de forma rápida el organismo para lograr una adecuada interacción con el entorno cambiante. El mismo puede ser subdividido en Sistema Nervioso Central (SNC), compuesto por el encéfalo y la médula espinal y Sistema Nervioso Periférico (SNP) formado por grupos neuronales denominados ganglios, y por nervios periféricos. El SNP está constituido por los componentes que actúan como comunicación entre el SNC y los distintos órganos efectores y receptores (Chouza, 2002), de modo que, a pesar de encontrarse anatómicamente separados, sus funciones se encuentran interconectadas.

Dentro del SN encontramos diferentes tipos celulares: neuronas, glías, tejido epitelial, tejido conectivo, células madre y otros elementos celulares (Fedoroff & Richardson, 2001). Existen diferentes tipos de neuronas, las cuales se caracterizan por poseer un cuerpo celular, y sus prolongaciones: dendritas y axones. Las células gliales (conocidas también genéricamente como glía o neuroglia) son las células nodriza del sistema nervioso que desempeñan, de forma principal, la función de soporte mecánico, trófico y protección de las neuronas.

En el SNP de vertebrados, un grupo importante dentro de la glía son las células de Schwann mielinizantes. Éstas envuelven a los axones, conformando una estructura multilamelar compuesta por repetidas unidades moleculares de proteínas y lípidos que permite la rápida conducción saltatoria y asegura la integridad axonal: la mielina (Quintes, 2010).

La fibra nerviosa como unidad estructural del Sistema Nervioso Periférico

El conjunto del axón, sus células de Schwann y la lámina basal (exclusividad del SNP) forman la fibra nerviosa (Scherrer y Arroyo, 2002, Salzer et al, 2008).

En el SNP, la fibra nerviosa está compuesta por el axón y múltiples células de Schwann (CS) que lo acompañan a lo largo de su trayectoria, desde el cono de arranque hasta las proximidades de las terminales nerviosas, cumpliendo un rol tan importante que la pérdida del soporte glial conduce al axón a la degeneración y el padecimiento de enfermedades neurodegenerativas.

Las neuronas y las células gliales interactúan en el SNP de vertebrados, con una proporción significativamente mayor de glías que neuronas (Quintes et al., 2010). Así, la fibra nerviosa constituye una unidad estructural y funcional, cuya organización es esencial para la propagación del potencial de acción, la conducción saltatoria y la integridad funcional del axón (Salzer et al., 2008; Simons & Trotter, 2007; Salzer, 2003). El desarrollo de la fibra requiere interacciones muy complejas (Simons & Trotter, 2007), hecho que se manifiesta cuando cualquiera de sus dos componentes se ven afectados.

Estructura de la fibra mielinizada

Una intrincada red de señalización entre neuronas y células de Schwann controla la mielinización periférica y el mantenimiento de la mielina (Quintes et al., 2010). La mielinización en nervios periféricos implica una serie de complejas fases funcionalmente distintas, incluyendo migración longitudinal de la CS, asociación de la misma con segmentos axonales específicos, envoltura de la membrana y finalmente su compactación (Jessen & Mirsky, 2005). Estas alteraciones dinámicas en la forma celular y en su motilidad, requieren un rearrreglo constante en el citoesqueleto de actina, donde el rol de la actina filamentosa (F-actina) en la unión a proteínas de la membrana glial ha sido caracterizada (Trapp et al., 1989), y también se conocen proteínas reguladoras de la actina con funciones críticas para el proceso de mielinización (Lee et al., 2014).

La CS mielinizante exhibe polaridad tanto radial como longitudinal (Poliak & Peles, 2003; Salzer, 2003; Sherman & Brophy, 2005). La polaridad radial se ve determinada por el hecho de que tiene dos superficies en contacto con su membrana plasmática: una interna en contacto con el axón y una externa en contacto con la lámina basal (Salzer, 2008).

Los axones mielinizados se organizan en series de dominios especializados con distintas funciones y composición molecular. Estos dominios que incluyen los nodos de Ranvier, las regiones paranodales flanqueantes, los juxtaparanodos y el internodo, se forman como resultado de las interacciones entre el axón y la célula mielinizante de Schwann, cada uno con un set de proteínas características. Esta organización de los dominios es fundamental para la funcionalidad e integridad general del axón (Salzer, 2008)

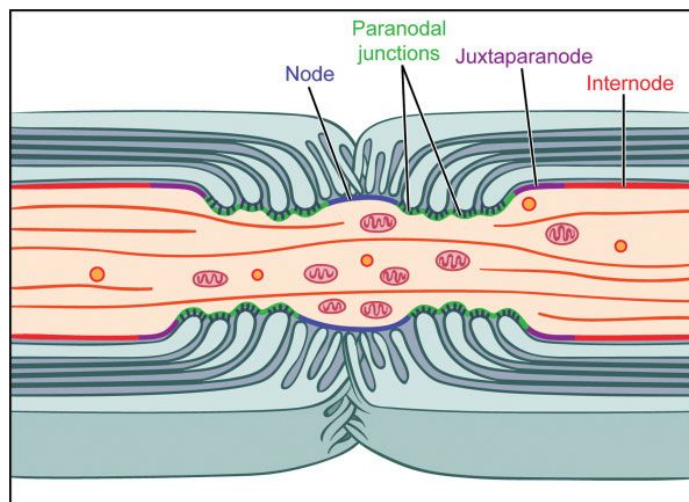


Figura 1: Organización y composición de los dominios de en las fibras nerviosas periféricas mielinizadas.

Corte longitudinal a través de la fibra donde el axón se ve representado en naranja y las células de Schwann en azul. A su vez, cada dominio es representado con un color. Azul paranodos, verde para regiones paranodales, violeta para juxtaparanodo y rojo para internodos. Imagen tomada de Salzer 2003.

Las CS se enrollan a lo largo del axón mielinizado de forma tal que la maquinaria molecular responsable de la propagación de los potenciales de acción se encuentra discontinuamente ubicada a lo largo del axón, en los nodos de Ranvier. La presencia

de mielina como un aislante de los internodos asegura que la despolarización ocurra solamente en los nodos, permitiendo la rápida conducción saltatoria (Sherman & Brophy, 2005).

Composición Proteica de la Mielina

Las láminas de mielina puede ser dividida en dos dominios según su grado de compactación: mielina compacta o mielina laxa, cada una con su propia composición proteica.

La mielina compacta, se caracteriza por no presentar citoplasma y sus proteínas características son la Proteína mielínica 0 (MPZ), la proteína periférica de la mielina (PMP22) y la proteínas de unión a la mielina (MBPs), mientras que la mielina laxa posee citoplasma y sus proteínas principales son la E-Cadherina, MAG, DM20 y claudinas (Sherrer & Arroyo, 2002).

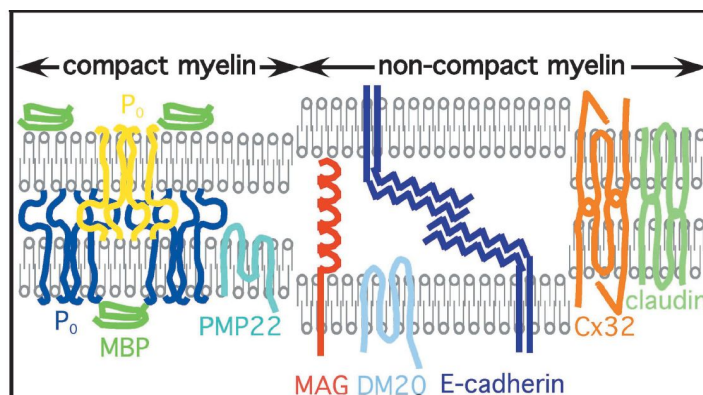


Figura 2: Principales proteínas de la Mielina. En la figura se esquematizan las principales proteínas presentes en la mielina compacta (izquierda) y en la mielina laxa (derecha). Imagen tomada de Scherrer y Arroyo, 2002.

La mielina compacta conforma la mayor parte de la mielina, mientras que la laxa se encuentra en los paranodos e incisuras de Schmidt-Lanterman (Sherrer y Arroyo, 2002).

La principal proteína expresada por las CS, representando un 50% de de todas las proteínas mielínicas en el SNP es la MPZ (Greenfield et al., 1973), luego le sigue MBP,

encontrándose en un 25% y PMP22 con un valor entre el 2 y el 5% del total, entre otras de menor abundancia (Pareek et al., 1993).

MPZ es una glicoproteína de membrana que consta de unos 219 residuos aminoácidos. Cumple importantes funciones como molécula de adhesión, con un rol activo en la compactación de la mielina y su mantenimiento, sosteniendo láminas adyacentes de membranas mielínicas juntas (Katona et al., 2006).

Las MBPs, se localizan en la cara citosólica de la membrana glial, desde donde participan en la formación de la mielina y en la reducción de la capacitancia del internodo (Sherman et al., 2005, Arroyo & Scherer., 2002).

PMP22 es una pequeña glicoproteína hidrofóbica que cuenta con unos 160 residuos aminoácidos, y un peso molecular de 22 kDa (Mobley et al., 2007, Myers et al., 2008, Pareek et al., 1997, Snipes et al., 1992). Desde su localización en la membrana, a la que atraviesa cuatro veces, exponiendo al citosol ambos extremos N- y C- terminal y dos bucles a la región extracelular (Mobley et al., 2007), parece cumplir funciones de abrochamiento de la mielina interaccionando consigo misma mediante interacciones homofílicas en su primer bucle y con MPZ mediante interacciones heterofílicas a través de su segundo bucle (Hasse et al., 2004). Esta interacción heterofílica se propone como importante en el mantenimiento de la estructura de la mielina en el SNP (D'Urso et al., 1999).

La alta hidrofobicidad de PMP22 (Sedzik et al., 2002) y la presencia un dominio altamente conservado de aminoácidos consenso para el reconocimiento e interacción con colesterol (CRAC) dentro sus dominios transmembrana la hacen una buena candidata para mediar interacciones con colesterol y a través de éste con balsas lipídicas (Sedzik et al., 2013). Esta posible interacción de PMP22 con el colesterol presente en las membranas se ve apoyada, a su vez por el conocimiento de una proteína presente en el SNC, la proteína proteolipídica (PLP), crítica para la mielinización en oligodendrocitos, que une directamente al colesterol (Werner et al.,

2013) y cuya estructura con cuatro dominios transmembrana es similar a la que presenta PMP22.

Cerca del 80% de la PMP22 neo sintetizada por la CS es degradada en condiciones normales, bajo la acción del proteasoma. Esta alta tasa de degradación es propuesta como consecuencia de problemas en el plegamiento de la proteína debida a su carácter altamente hidrofóbico (Notterpek et al., 1999; Pareek et al., 1997). Este comportamiento proteico afecta en especial a células metabólicamente activas, como las CS que son particularmente sensibles a la acumulación de proteínas dañadas (Rangaraju et al., 2008).

Las mutaciones descritas en la región codificante de PMP22 incluyen 44 sustituciones de base simples, 14 deleciones, 2 inserciones, una translocación recíproca y varios sitios de escisión. La mayoría de las mutaciones observadas en pmp22 muestran una heredabilidad autosómica dominante (Russo et al., 2011).

Durante el proceso de mielinización, el balance entre la cantidad de proteínas y lípidos asociados a la mielina es crucial (Meyer zu Horste et al., 2006).

La comunicación entre las células de Schwann, las neuronas y sus axones es tan importante que distintos fenotipos clínicos surgen si éstas se encuentran perturbadas o ausentes, como es el caso de muchas neuropatías periféricas hereditarias.

En particular, los niveles de PMP22 deben ser estrictamente regulados, ya que alteraciones en los niveles de esta proteína producidos por mutaciones en su gen son responsables de más del 50% de las neuropatías periféricas hereditarias (Li et al., 2012). Un ejemplo entre ellas, es el heterogéneo grupo de desórdenes Charcot Marie Tooth (CMT) .

Síndrome Charcot Marie Tooth (CMT)

Las CMTs son un grupo de poli-neuropatías sensoriales y motoras progresivas, de amplia heterogeneidad tanto genética como clínica. Es el grupo de neuropatías periféricas hereditarias más común en humanos, teniendo una prevalencia en la población de 1 en 2500 (Niemann et al., 2006; Vallat et al., 2004; Vallat, 2003). Los individuos con CMT experimentan una neuropatía motora distal progresiva en brazos y piernas, que se manifiesta entre la segunda y la tercera década de vida. Esta resulta en debilitamiento y atrofia muscular (Bird, 1998). La mayoría de los pacientes que poseen CMT tienen una herencia dominante autosomal, aunque algunos pacientes presentan la enfermedad ligada al cromosoma X, o herencia autosomal recesiva (Saporta et al., 2012).

Las CMTs tienen múltiples clasificaciones, algunas de ellas en base a detalladas diferencias entre rasgos clínicos (Lambert et al., 1968) y otras en relación a los loci implicados, siendo la más habitual clasificación la que divide a las CMTs en dos grandes grupos: CMT1 haciendo referencia a las que implican mutaciones en la CS -schwannopatías, y CMT2 refiriéndose a las que involucran al axón -axonopatías (Suter U. & Scherer S., 2003; Berciano J & Combarros O., 2003; Armati, 2007).

El fenotipo neurodegenerativo CMT1 presenta debilidad y pérdida muscular, junto a denervación y pérdida axonal. Se caracteriza además, por una disminución de la conducción del impulso nervioso y la presencia de “bulbos de cebolla”, estructura asociada a la pérdida de compactación de la mielina, y a procesos de desmielinización y remielinización sucesivos (Patel & Lupski, 1994). Otro cambio asociado a esta mielopatía es un aumento en la cantidad de mitocondrias en fibras periféricas desmielinizadas (Ravera et al., 2013). El incremento en el número de mitocondrias, es considerado como un cambio adaptativo, para satisfacer requerimientos energéticos en las fibras periféricas desmielinizadas (Hogan et al., 2009; Saporta et al., 2009; Trapp & Nave 2008), en particular para compensar la

pérdida de la respiración aerobia por parte de la mielina (Ravera et al., 2013, Morelli et al., 2011)

CMT1A es el CMT1 más habitual, usualmente causado por una duplicación de 1.4 megabases en el cromosoma 17 (en humanos), el cual contiene al gen de PMP22, generando individuos que poseen tres copias para este gen. Deleciones en esa misma región causan neuropatía hereditaria con sensibilidad a la presión (HNPP), generando individuos con una única copia del gen (haploidía) (Russo et al., 2011) e hipomielinización. La duplicación/delección es probablemente debida a un crossing-over entre dos grandes repetidos que flanquean la región duplicada (Chance et al., 1994).

CMT1A se caracteriza por una disminución en la velocidad de conducción del impulso nervioso, generada por la desmielinización axonal en intervalos a lo largo del internodo (Amici et al., 2007).

CMT1E es un grupo de mielopatías causadas por mutaciones puntuales en PMP22 (Li et al., 2013). Tiene manifestaciones clínicas de gravedad variable, desde mediana, similares a HNPP, a muy severas neuropatías desmielinizantes. Se ha propuesto en las CMT1E, que PMP22 posee un mecanismo de ganancia de función, volviéndola tóxica (Giambonini-Brugnoli et al., 2005).

El conocimiento de estas neuropatías ha resultado en fuerte evidencia acerca de la importancia que tiene PMP22 en la mielina periférica, y el de su correcto mantenimiento de sus niveles (Vallat et al., 1996).

Modelo Murino Trembler J

Los ratones Trembler J (TrJ) son portadores de una mutación en el gen de pmp22, que se traduce en un cambio de una Leucina por una Prolina en la posición 16 de PMP22 (Suter U et al., 1992).

Su mutación en los ratones TrJ, lleva a la hipomielinización, y un desensamblaje de la estructura mielínica, además de generar acúmulos a nivel citoplasmático debido a problemas en su plegamiento. Estas características, hacen al murino TrJ un valioso modelo biológico para la comprensión de enfermedades del grupo de neuropatías periféricas humanas CMT (Valentijn et al., 1992). Estudios en múltiples tipos celulares indican que tanto la expresión a la alta como a la baja de PMP22 tiene profundos efectos en la dinámica de las membranas (Brancolini et al., 1999, 2000), implicando alteraciones en el citoesqueleto de actina. Una posible conexión entre PMP22 y actina se apoya en la distribución irregular de la F-actina en los ratones TrJ mutantes para PMP22 (Rosso et al., 2012). En nervios normales PMP22 se vio localizada en balsas lipídicas insolubles con detergentes, las cuales se conoce que interaccionan con F-actina en oligodendrocitos (Taguchi et al., 2005). En ausencia de PMP22, los niveles y distribución de los constituyentes claves de las balsas lipídicas, incluyendo el colesterol, se ven alterados. En algunos de estos casos, los defectos celulares vinculados con PMP22 pueden ser revertidos con suplementación de colesterol en los individuos (Lee et al., 2014).

El estudio de las variaciones estructurales entre las fibras nerviosas de los ratones TrJ en relación a las fibras nerviosas de ratones Wild Type (WT), permitirá visualizar las implicancias estructurales de la mutación de la proteína PMP22, acercándose al entendimiento de la degeneración de la fibra en gran cantidad de las CMT 1, ya que en ellas un 50% de los casos se deben a alteraciones en pmp22 (Vallat, 2003). Para ello, se plantea el estudio de las fibras nerviosas de los ratones TrJ en comparación con las fibras normales de ratones WT mediante microscopía electrónica.

La presencia incrementada de partículas ribosomales en fibras nerviosas con neuropatías tanto centrales como periféricas, hablan de requerimientos diferenciales en el abastecimiento proteico entre la condición normal y la de las neuropatías (Verheijen et al., 2014). Para corroborar esto en el murino TrJ, se plantea el estudio de la presencia ribosomal en las fibras tanto TrJ como WT y la posterior caracterización de estos ribosomas mediante ensayos bioquímicos y funcionales.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar diferencias entre fibras nerviosas de ratones Trembler J y Wild Type desde el punto de vista ultraestructural y bioquímico.

Objetivos Específicos

1. Analizar mediante microscopía electrónica en nervios Tr J y WT:
 - Ultraestructura, grosor y organización de la mielina.
 - Variaciones en la cantidad, tamaños y localización de las mitocondrias.
 - Cantidad, tamaño y densidad electrónica de vesículas
 - Presencia y distribución de ribosomas
2. Caracterizar bioquímicamente la composición de nervios periféricos de ratones TrJ y WT mediante SDS-PAGE y Western Blot.
3. Caracterizar funcionalmente los ribosomas de los distintos fenotipos en estudio.
4. Evaluar eventuales diferencias en la cantidad de mitocondrias para cada genotipo mediante qPCR.

Materiales y Métodos

Ejemplares Utilizados

Los animales utilizados como modelo para la realización de esta tesina fueron ratones de dos meses y un año de edad con genotipo salvaje WT y ratones heterocigotas para la sustitución L16P en la proteína PMP22 debida a una mutación puntual en su gen (T1703C). Estos ratones pertenecen a la cepa B6.D2-Pmp22<Tr-J>/J (Jackson Lab., USA).

Los ratones fueron identificados mediante genotipado siguiendo los criterios establecidos en Rosso et al., 2010. El mantenimiento de la colonia, que se encuentra en el bioterio del IIBCE, así como la eutanasia de los ratones fue realizado por la Dra. Kun (C2), de acuerdo con las normas del Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) bajo las regulaciones establecidas en la ley nacional de experimentación animal N°18611.

Disección de Nervios Ciáticos

Para la disección de los nervios, ratones de la misma edad con fenotipo tanto TrJ como WT fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Los mismos fueron colocados en posición decúbito ventral para practicarles una incisión que permitiera separar la piel, descubriendo los miembros inferiores. En el tramo correspondiente al fémur, ubicado entre la cadera y la rodilla, se realizó una incisión en la aponeurosis para separar el músculo abductor mayor y el bíceps crural, permitiendo exponer el nervio ciático. El mismo fue separado del tejido y sostenido con pinzas para luego ser seccionado en su extremo distal. Mediante una fractura en la cadera del animal, se expuso todo el recorrido del nervio, desde la rodilla hasta la zona entre la 4ta y 5ta vértebra lumbar, donde fue cortado tratando de incluir la mayor cantidad de material (protocolo Martin et al., 2012).

Procesamiento de la muestra para Microscopía Electrónica de Transmisión

Una vez extraídos los nervios fueron fragmentados y fijados mediante inmersión en Glutaraldehído 2.5% en buffer PHEM durante 1 hora a 4°C, para la inmovilización y preservación de la estructura interna. Luego de cumplido este plazo, se quitó la solución fijadora y se procedió a retirar el exceso realizando tres lavados de 5 minutos en PHEM. Se procedió a deshidratar la muestra por inmersión en propanol a concentraciones crecientes desde 25% a 95%, dos en isopropanol puro durante 1 hora, seguida de otras dos inmersiones en óxido de propileno, 15 minutos cada una. Inmediatamente las piezas fueron infiltradas en concentraciones crecientes de araldita (resina epóxica, Durcupan TM-Sigma-Aldrich) y decrecientes de óxido de propileno, hasta araldita pura durante toda la noche, en condiciones anhidras a temperatura ambiente. Al día siguiente los nervios fueron puestos en nueva araldita pura 1 hora a temperatura ambiente. Luego, los fragmentos de nervios fueron montados en pequeños bloques con nueva araldita pura, posicionándolos de forma transversal o longitudinal con respecto a la cara frontal del bloque, que será la cara de corte. Los bloques fueron colocados en un horno de hibridación a 45°C durante 24 horas para permitir la polimerización de la resina y a 60°C otras 24 horas.

Para la obtención de las secciones ultrafinas se empleó el ultramicrotomo RMC Boeckeler - Power Tome XL, utilizando cuchillas de vidrio preparadas el mismo día a ser utilizadas.

En una primera instancia, y con el fin de alcanzar la zona de interés, se realizaron cortes semifinos de 300 nm de espesor. Los mismos fueron montados en portaobjetos y teñidos con azul de toluidina al 0.01% en agua, y examinados al microscopio de campo claro. Una vez alcanzada la sección deseada, se re-talló la cara de corte, para centrar las regiones de interés del tejido. Se realizaron cortes ultrafinos de 60 nm de espesor que fueron extendidos con cloroformo y montados en grillas de mesh de cobre, con y sin Formvar.

Los cortes ultrafinos fueron contrastados con sales metálicas pesadas para la visualización de las estructuras celulares. Para ello, las grillas con los cortes fueron sumergidas en una solución de acetato de uranilo al 1% en agua ultrapura a 4°C durante toda la noche o a temperatura ambiente, por una hora, y lavadas abundantemente en tres baños sucesivos de agua ultrapura para quitar el exceso de sales. Finalmente las grillas fueron cuidadosamente secadas por aproximación de papel filtro y almacenadas hasta el momento de la observación. Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio electrónico de transmisión Jeol X-100 y en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010.

Fraccionamiento de los nervios, SDS- PAGE y Western Blot

Para la caracterización de algunos de los componentes de las fibras nerviosas periféricas, nervios ciáticos de animales de ambos genotipos fueron extraídos, para realizarse un protocolo de extrusión axoplasmática de la mielina a modo de obtener en fracciones diferentes los componentes del axoplasma y la mielina, para su posterior detección por Western Blot.

Siguiendo con el protocolo propuesto por Rishal et al., 2011 (con ligeras modificaciones para adaptarlo a nervios de ratones) para el aislamiento del axoplasma, una vez extraídos los nervios, el epineuro de los mismos fue quitado. Se realizó un teasing y las fibras nerviosas se cortaron en fragmentos para facilitar la extrusión del material axoplasmático desde el interior de la mielina. Parte de los nervios fueron reservados en PBS 1X con antiproteasas para conformar la fracción total. Los fragmentos fueron incubados en PBS 0.2X con antiproteasas durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego incubados en PBS 1X con antiproteasas durante otros 30 minutos, tiempo durante el que los componentes del axoplasma serían teóricamente liberados a la solución. Pasado este plazo, y con el objetivo de separar la fracción CS se realizó una centrifugación a 10.000 g y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante, correspondiente a la fracción axoplásmica fue separada y el pellet resuspendido en PBS 1X con antiproteasas conformando la fracción CS.

Tanto la fracción total como la fracción CS fueron sonicadas a modo de solubilizar los componentes en el buffer.

Con las diferentes fracciones así obtenidas, se realizó una corrida de SDS-PAGE. Para ello, las muestras fueron desnaturalizadas con beta-mercaptoetanol, SDS, y calor y cargadas en un sistema vertical de geles de acrilamida bis-acrilamida (ABA) (concentrador 6% ABA, separador 12% ABA). Se realizó la corrida a un voltaje constante de 80 V y 4°C. Una vez finalizada la corrida electroforética se realizó la transferencia de las proteínas presentes en el gel a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm de tamaño de poro. Para ello se utilizó buffer de transferencia y una corriente constante de 40 mA toda la noche a 4°C.

Luego se procedió a la detección de las proteínas transferidas mediante marcación indirecta. La membrana fue bloqueada con leche al 5% en buffer TBS-T durante 30 minutos (temperatura ambiente), para bloquear los sitios de unión inespecíficos. Seguidamente se llevó a cabo la incubación con anticuerpos específicos anti-Rib, anti-PMP22 y anti-NF68 (ver Tabla 1) como un componente específico de los filamentos intermedios neuronales. Esta incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El exceso de anticuerpo específico se eliminó lavando con TBS-T y se procedió a incubar con los anti-anticuerpo conjugados a fluorocromo (Tabla 1), durante 1 hora a temperatura ambiente, protegido de la luz. El exceso de anticuerpo fue eliminado mediante lavados en buffer TBS-T y la membrana escaneada en el escáner Fla-reader 9000 (Fuji Japón).

Tabla 1: Anticuerpos y sondas utilizadas en los diferentes experimentos realizados en este trabajo, con sus correspondientes número de catálogo y dilución de uso.

Anticuerpo/Sonda	Código	Empresa	Dilución de uso
Mouse anti-PMP22 IgG	sc-65739	Santa Cruz Biotechnology	1:250
Rabbit anti-Rib*	-	-	1:250
Chicken anti-NF 68	ab72997	abcam	1:250
Goat anti-Mouse IgG 488	A11029	Thermo-Fisher	1:1000
Goat anti-Chicken IgY 633	ab97147	abcam	1:500
Goat anti-Rabbit IgG 543	A11035	Thermo-Fisher	1:1000
Alexa Fluor 546 Phalloidin	A22283	Thermo-Fisher	1:150
DAPI	D1306	Invitrogen Thermo-Fisher	1:1000

Detección de las proteínas neo sintetizadas

Para la caracterización funcional de los ribosomas se utilizó el kit Click-IT™ AHA (Thermo-Fisher, N° de catálogo C10289) para la marcación de las proteínas neo sintetizadas. El kit fue puesto a punto para los fines del experimento que se iba a realizar, llegando al siguiente protocolo:

Los nervios extraídos fueron incubados en una placa con medio RPMI, depletado de metionina a modo de que fuera consumida la metionina endógena de las células. La incubación se realizó en estufa a 37°C, durante 10 minutos.

Pasado este plazo, el medio fue quitado y se añadió nuevamente medio RPMI sin metionina con L-azido homoalanina (componente A del kit) 1/1000, y antiproteasas para evitar la degradación de la muestra. La incubación se dio nuevamente en la estufa a 37°C por un período de 30 minutos. Se quitó en exceso de componente A mediante dos lavados de dos minutos dentro de la estufa. Luego los nervios fueron fijados en 3% de Paraformaldehído en PHEM durante 15 minutos, y se realizaron tres lavados de 5 minutos en en PHEM para eliminar el exceso de fijador.

El epineuro de los nervios se quitó con pinzas bajo lupa, y luego se realizó el teasing de los nervios para independizar paquetes de fibras.

Se procedió a realizar la permeabilización de la muestra utilizando el detergente Tritón al 0.1% en PHEM durante 20 minutos y luego el exceso de detergente se quitó mediante dos lavados con PHEM. Seguidamente se incubó la muestra en un mix de los componentes B y C a las concentraciones indicadas por el protocolo del kit. Pasados 45 minutos de incubación se realizó un lavado con BSA al 3% en PHEM y dos lavados en PHEM. Se realizó una incubación con las sondas Faloidina y DAPI (Tabla 1) durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego de ser lavada la muestra se montó en portaobjetos con Prolong Gold Antifade.

Las imágenes fueron obtenidas para su posterior cuantificación utilizando el microscopio confocal Olympus FV300 del IIBCE.

Extracción de ADN genómico y mitocondrial para qPCR

Los nervios de tres ratones Trj y tres ratones WT fueron homogeneizados por separado en buffer de homogeneización (Tris-HCL 0.2 M; SDS 1%; EDTA 1 mM; pH 7,5). Se añadió en cada tubo ARNasa y se incubaron a 4°C durante una hora.

Los homogeneizados fueron centrifugados a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C y luego fueron tomados 300 µL de muestra y colocados en 150 µL de fenol y 150 µL de Cloroformo-Isoamílico 24:1 para ser mezclados en una noria durante 30 minutos.

Una nueva centrifugación en las mismas condiciones que la anterior fue realizada, a partir de lo que se recuperó la fracción acuosa y se agregaron 1/10 volúmenes de buffer 3M en acetato de sodio, pH=4.8, y 2 y ½ volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se homogeneizó y se dejó precipitando a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente se realizó una centrifugación durante 10 minutos a 12.000g y 4°C. Seguidamente se realizaron dos lavados con etanol 70%, una nueva centrifugación durante 10 minutos a 12.000g, 4°C. El sobrenadante de la centrifugación fue descartado y el pellet se dejó secar con el fin de eliminar los restos de etanol, que podrían dificultar la solubilización del ADN. Una vez completado el secado, se

resuspendió el ADN en 20 µL de agua ultrapura previamente calentada a 65°C para favorecer la resuspensión.

Una PCR a tiempo final en gradiente de temperatura fue realizada, con el fin de poner a punto las temperaturas de hibridación para cada par de primers. Durante este paso cada reacción de PCR fue sometida a una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg , hibridación a 51 grados por 20 seg (temperatura determinada durante el gradiente), y 1 minuto de extensión a 71°C. A continuación se corrieron los productos de PCR en un gel de acrilamida 6% TAE teñido con gel red, y se observó a qué temperatura se producía el annealing, para los genes 12s rRNA mitocondrial y 18s rRNA nuclear.

Finalmente se realizó una Real Time PCR buscando amplificar una región de ADN nuclear, y una región de ADN mitocondrial a modo de cuantificar de la cantidad de ADN mitocondrial en las fibras nerviosas de ratones TrJ y WT con respecto al ADN nuclear, como es descrito en el trabajo realizado por Zhang et al., 2009.

Para esto se utilizaron en una primera instancia primers específicos contra una región ribosomal tanto en el ADN nuclear (18S) como en el ADN mitocondrial (12S), tomados del artículo que describe la técnica. En una segunda instancia los experimentos fueron realizados sustituyendo los cebadores contra del 18S nuclear por otro par de cebadores específicos contra el gen del 18S rRNA. Las secuencias de los cebadores utilizados, así como su gen blanco y el tamaño del amplicón se encuentran detallados en Tabla 2.

La PCR cuantitativa fue realizada por triplicados en tubos separados para el ADN mitocondrial y el ADN nuclear en el termociclador Rotor Gene 3000 (Corbett Research Alemania), utilizando el kit Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen EEUU número de catálogo 11744-100). Cada tubo contenía 30 ng de ADN proveniente de la misma extracción, 20 µl de mix de reacción iQ™ SYBR Green Supermix (1 × final), y cebadores 0.5 µM. Cada reacción se sometió a la desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos: desnaturalización

a 95°C por 30 segundos, 51°C para la hibridación por 20 segundos y 1 minuto de extensión a 72°C.

Tabla 2: Primers utilizados durante Real Time PCR para la cuantificación de ADN mitocondrial con respecto al ADN nuclear.

Gen	Gene ID	Amplicón	Primer Forward	Primer reverse
12S rRNA	NC_006914	177	5'- ACCGCGGTCATACGATTAAC -3'	5'-CCCAGTTTGGGTCTTAGCTG-3'
18S rRNA	NR_003278	219	5'-GCGGGTTCTATTTTGTGGT-3'	5'- AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'
18s rRNA	NR_003278	91	5'-GATTGATAGCTCTTTCTCGATTCC-3'	5'-CGTTCGTTATCGGAATTAACC-3'

La eficiencia de la reacción para los cebadores utilizados se determinó mediante diluciones seriadas en base 5 con 7 puntos del producto de transcripción para los primers. Para cada dilución se realizaron triplicados que fueron analizados a través del software Rotor Gene 6000 Series v.1.7 (QIAGEN Alemania).

Se define CT (Cycle Threshold) como el número de ciclos de PCR donde la señal de fluorescencia de una reacción excede el valor de Background (Pfaffel M., 2006). El CT es inversamente proporcional a la cantidad de ADN blanco presente en la reacción. Mediante la herramienta Auto-Find Threshold del software Rotor Gene, se determinaron los valores CT y la eficiencia de la reacción de cada réplica técnica para cada dilución, de acuerdo a la siguientes fórmulas:

$$CT = M \times \log (\text{Concentración}) + B \quad (\text{Ec. 1})$$

Siendo M y B la pendiente y la ordenada en el origen respectivamente. La pendiente de esta curva permite calcular la eficiencia de la reacción:

$$\% \text{ Eficiencia} = (10^{-1/M} - 1) \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Cabe destacar que la herramienta Auto-Find Threshold, establece automáticamente un umbral para determinar los CTs, optimizando el coeficiente de correlación de la Ec. 1, que ajusta los datos de la curva estándar a una regresión lineal. En todos los casos se obtuvieron eficiencias entre 90 y 110% y fueron consideradas como 100%. Con el valor de umbral obtenido en la curva estándar, se analizaron las reacciones de PCR realizadas con las muestras extraídas de nervios ciáticos de ratones TrJ y WT mediante el método de $2^{(-\Delta \Delta CT)}$ - delta delta CT (Pffaf, 2004), cuyo cálculo puede verse en la Ec. 3.

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT(\text{muestra blanco}) - \Delta CT(\text{muestra referencia}) \quad (\text{Ec. 3})$$

Este método es ampliamente utilizado para el análisis de datos de qPCR como una estrategia de cuantificación relativa.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los diferentes sets de datos (en los casos correspondientes) fue realizado mediante la prueba t de Student. Las poblaciones de ratones TrJ y WT fueron consideradas como muestras independientes, con una distribución normal para los parámetros analizados. Empleamos la prueba t de dos colas para muestras con diferente varianza. Las diferencias entre poblaciones fueron consideradas significativas para valores de $p < 0.05$.

Resultados

Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión de nervios TrJ y WT

Con el fin de estudiar la estructura de la mielina tanto en nervios de ratones Trembler J, como Wild type y compararlas se procesaron nervios ciáticos de ambos ejemplares para la examinación por microscopía electrónica de transmisión (MET), como es detallado en Materiales y Métodos. Para evidenciar el efecto de la mutación de la proteína PMP22 presente en los animales TrJ en la estructura de la mielina compacta, se clasifican las fibras mielinizadas de ambos fenotipos en las siguientes categorías: fibras con mielina compacta intacta y fibras con mielina compacta delaminada o mal “abrochada”, formando “bulbos de cebolla” (típicas estructuras neurodegenerativas), donde las láminas de mielina están alternadas con regiones citoplasmáticas de la CS. Los bulbos de cebolla son una estructura característica del fenotipo degenerativo CMT1, y se encuentran asociados a la pérdida de compactación de la mielina y a procesos de desmielinización y remielinización originados en la compactación defectuosa.

De un total de 41 fibras TrJ examinadas en animales de 2 meses de edad, un 10% pertenecieron a la categoría de bulbos de cebolla, estando los restantes en la categoría de mielina compacta, mientras que el total de 22 fibras WT examinadas pertenecieron a la categoría de mielina compacta (Tabla 3). A su vez, en esas mismas fibras se buscó la presencia de incisuras de Schmidt-Lanterman, encontrando una gran proporción de estas en los nervios de animales con la mutación (Tabla 3) siendo la mayoría hemi-incisuras o incisuras incompletas (Small et al., 1987), y no encontrando presencia de las mismas en nervios de animales salvajes.

Tabla 3: Estructura y organización de la mielina en fibras nerviosas de ratones TrJ y WT

	Mielina Compacta	Bulbos de Cebolla	Incisuras
WT	22/22	0/22	0/22
Tr J	37/41	4/41	18/41

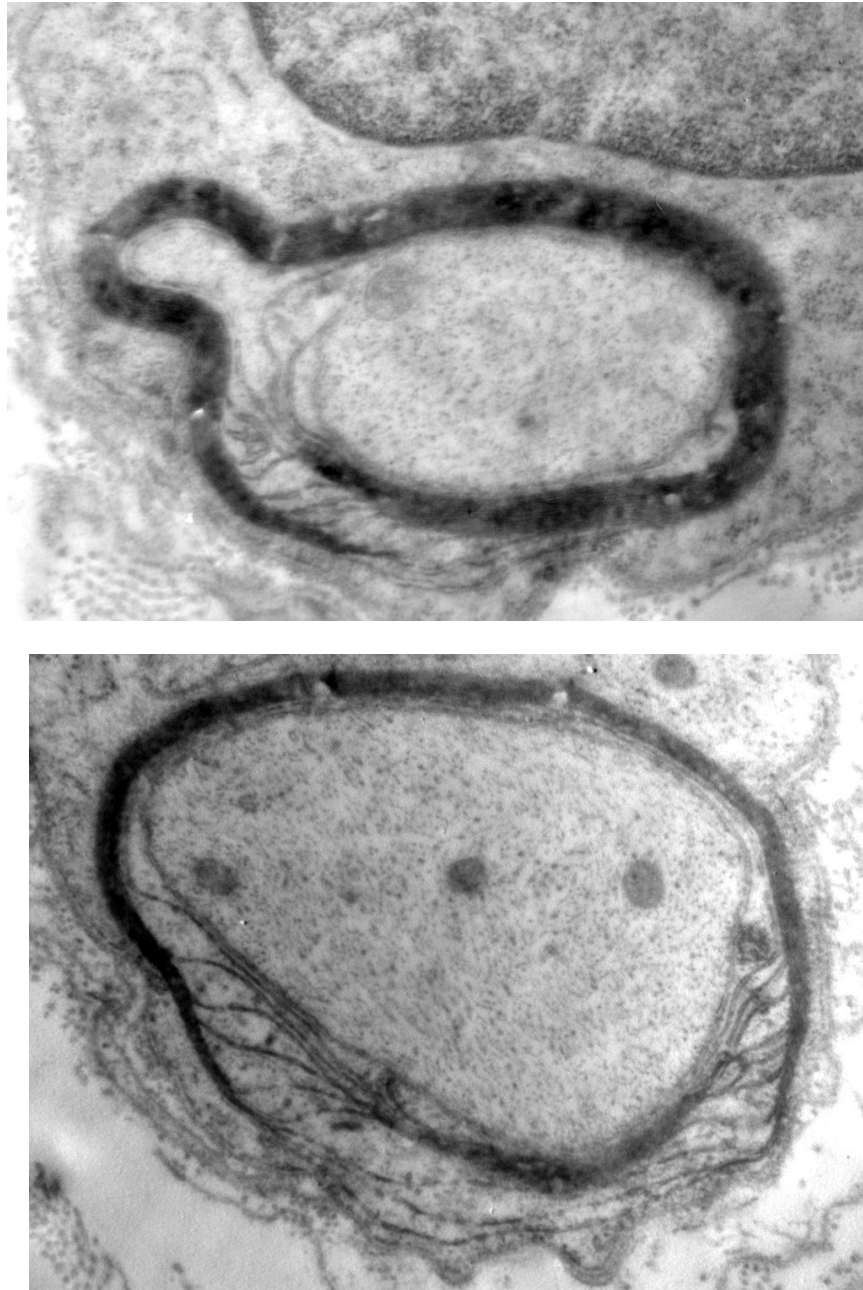


Figura 3: Incisuras en fibras TrJ. A. Hemi-incisura en fibra nerviosa de ratón TrJ de 2 meses de edad. Magnificación 29.000 X. **B.** Incisura en fibra nerviosa TrJ. Magnificación 24.000 X.

Trabajando con las fibras que fueron clasificadas dentro del grupo “mielina compacta”, el espesor de la mielina fue evaluado para cada fenotipo, utilizando la herramienta de medidas del programa Fiji - Image J. Se obtuvo un espesor promedio de 142 nm para TrJ contra un espesor promedio de 473 nm para WT (Figura 4).

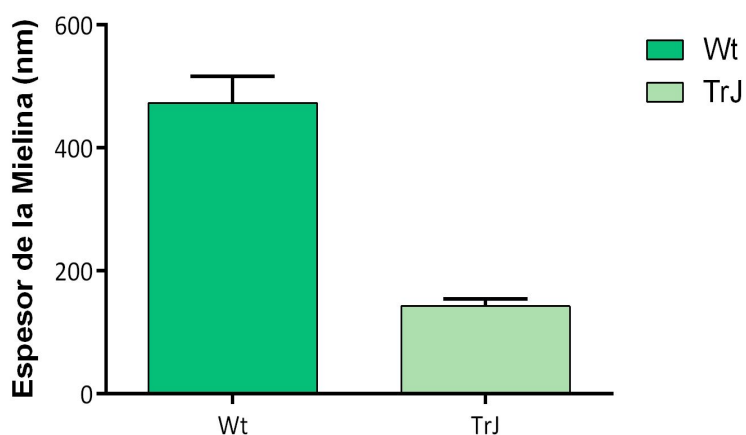


Figura 4: Espeor de la mielina. Valor promedio del espeor de la mielina en fibras de animales WT (verde oscuro) y de animales TrJ (verde claro) con su SEM correspondiente.

Variaciones en la cantidad, tamaos y localizaci3n de las mitocondrias en fibras TrJ y WT

A partir de las im3genes obtenidas por microscop3a electr3nica de transmisi3n para nervios ci3ticos de ambos genotipos, se estudiaron diferencias en la cantidad de mitocondrias y su distribuci3n a lo largo de la fibra. Para esto se cont3 la cantidad de mitocondrias totales por corte realizado para cada fibra, la cantidad de mitocondrias totales en la regi3n de la CS y en la regi3n axonal, a partir de lo que se obtuvo un promedio y error (SEM) para cada genotipo como puede verse en la Figura 5. Se encontr3 una cantidad tres veces mayor de mitocondrias en las fibras de ratones TrJ que en ratones salvajes, obteniendo un promedio de 6 mitocondrias por fibra. En cuanto a la distribuci3n de las mitocondrias, en el caso de ratones TrJ, su localizaci3n principal fue en la CS con un valor al menos dos veces mayor con respecto al

obtenido para el axón. Para los animales WT los resultados obtenidos fueron inversos, encontrando a las mitocondrias localizadas principalmente en la región axonal.

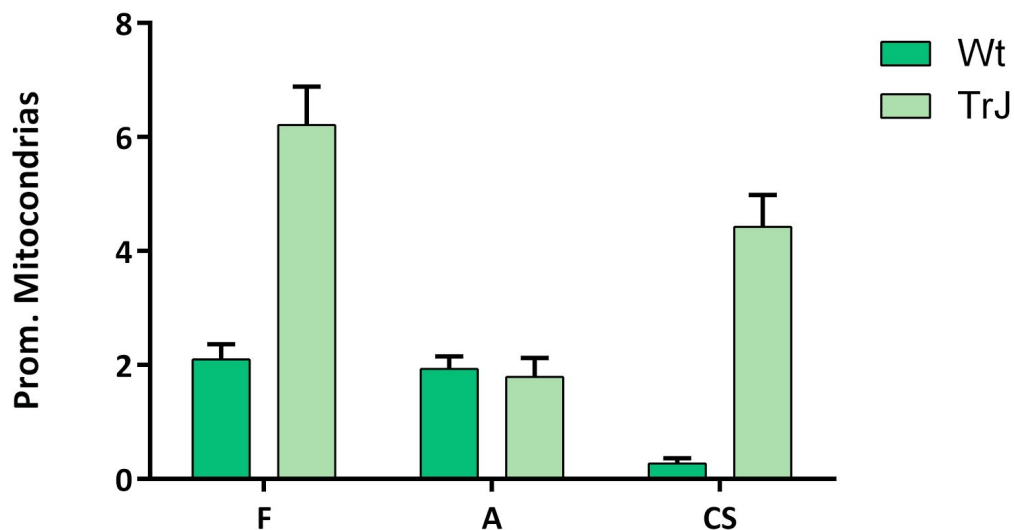


Figura 5. Distribución de las Mitocondrias en ratones TrJ y WT: Promedio de mitocondrias por fibras en ratones WT (verde oscuro) y TrJ (verde claro) con su desvío (SEM) correspondiente (F). Distribución de las mitocondrias totales de las fibras TrJ y WT entre la región axonal (A) y la región de la célula de Schwann (CS).

Los tamaños de las mitocondrias encontradas también fueron evaluados ya que los mismos tienen importancia para la funcionalidad mitocondrial. Las mitocondrias medidas fueron separadas en rangos de tamaños en base al diámetro mayor. A partir de este análisis se obtiene que los ratones TrJ no sólo poseen mayor cantidad de mitocondrias en sus fibras, sino que las mismas adquieren tamaños mayores que en ratones salvajes, llegando a alcanzar 600 nm; las mitocondrias en fibras WT, mientras tanto alcanzan valores máximos de 300 nm. Podemos ver además que el rango de tamaños con mayor frecuencia es el de 150-200 nm para WT, y el de 200-250 nm para TrJ (Figura 6).

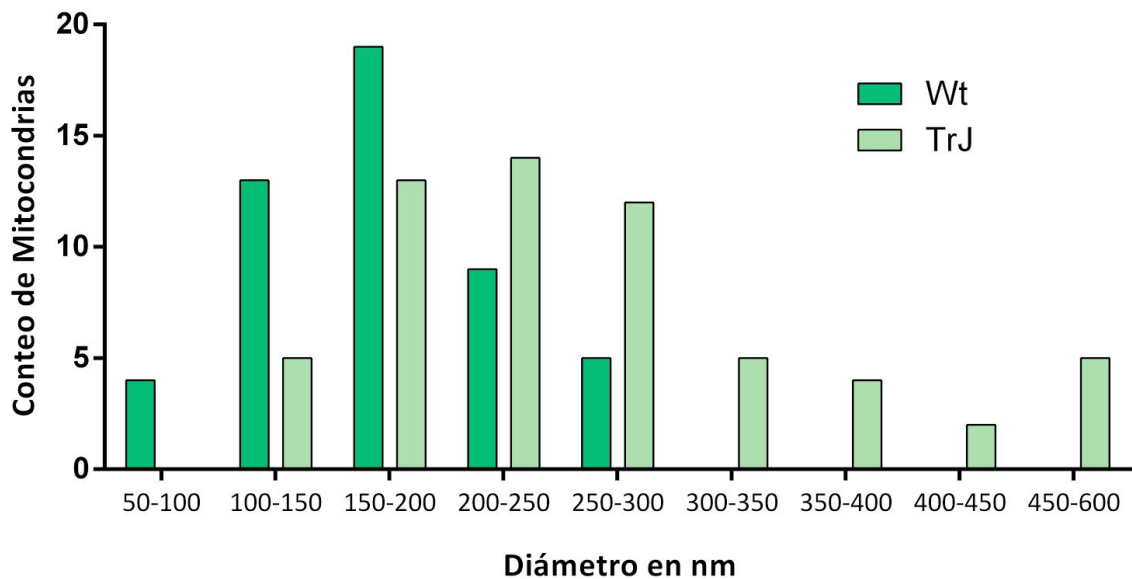


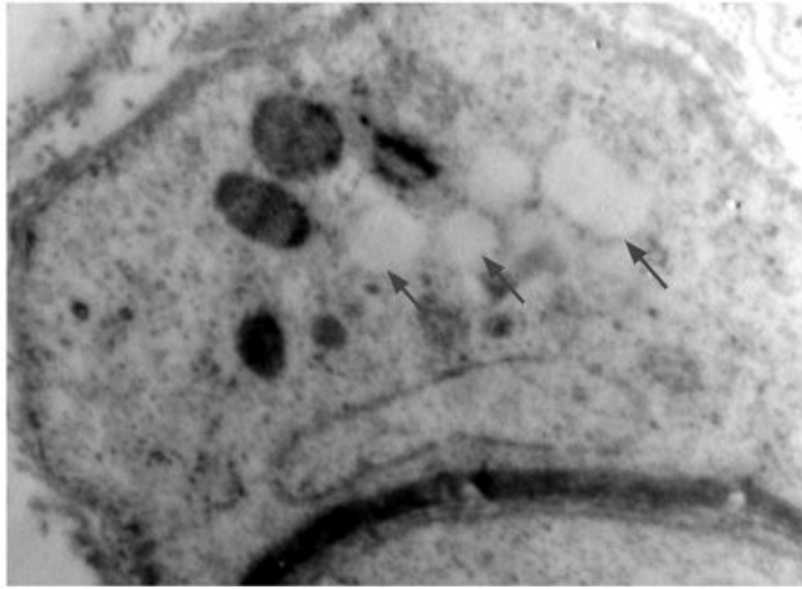
Figura 6. Rangos de tamaños mitocondriales: Conteo de las mitocondrias organizadas en rangos de tamaños (en nm) del diámetro mayor mitocondrial en animales WT (verde oscuro) y TrJ (verde claro).

Presencia de vesículas

Se evaluó la presencia de vesículas en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) para ejemplares de 2 meses de edad pertenecientes a ambos fenotipos.

En estos animales la presencia de vesículas no fue notable, si bien encontramos vesículas en dos ejemplares de las más de cuarenta fibras examinadas para el fenotipo TrJ y en ningún caso para fibras de origen Wt. A su vez fue detectada en varias fibras TrJ la presencia de agregosomas y cuerpos lisosomales, que no fueron detectados en animales salvajes (Figura 7).

A



B



Figura 7. Presencia de inclusiones en fibras TrJ: **A.** Se señalan con flechas las vesículas presentes en axones TrJ. Foto tomada en el microscopio electrónico de Facultad de Ciencias. Magnificación 20.000x. **B.** Se señala con flechas las inclusiones citoplasmáticas halladas en una fibra TrJ. Imagen tomada en el microscopio electrónico del IIBCE. Magnificación 39.000x.

Al examinar mediante la misma técnica fibras de ejemplares TrJ de más de un año de edad, la presencia de vesículas se ve notablemente incrementada, encontrándose en más de un tercio de la población de fibras y con dimensiones importantes con respecto al tamaño axonal (Figura 8).

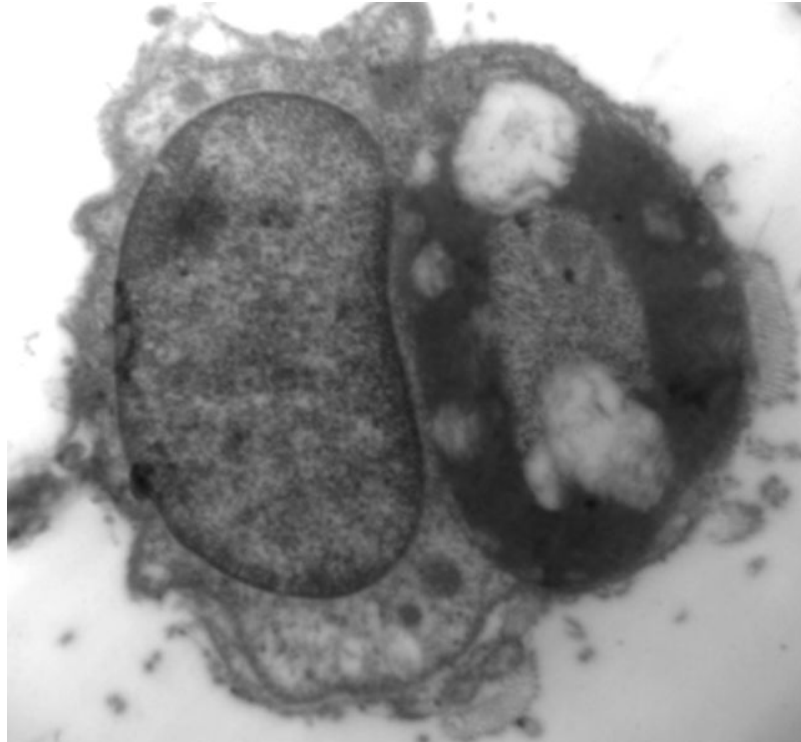


Figura 8. Fibra nerviosa de ejemplar TrJ de 2 años de edad: Se observa la presencia de grandes vesículas atravesando la mielina de un ejemplar TrJ de dos años de edad. Imagen tomada en el microscopio electrónico del IIBCE. Magnificación 29.000x.

Presencia y distribución de ribosomas

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión fueron evaluadas en busca de presencia ribosomal, sin embargo no se logró llegar a la magnificación necesaria para poder resolver la estructura ribosomal en gran parte de las imágenes obtenidas.

Los ribosomas fueron detectados en unión con el Retículo Endoplásmico, formando RER en 10 casos de 70 fibras examinadas, encontrándose en todos los casos

presentes en la CS. En nervios WT, si bien se pudo visualizar retículo endoplásmico liso, no se encontró retículo en asociación con ribosomas.

Caracterización funcional de ribosomas en TrJ

Utilizando el kit Click-it, luego poner a punto el protocolo para el trabajo con nervios, se evaluó la actividad de síntesis de los ribosomas en nervio ciático de ratones TrJ, comparándolos con los mismos en animales WT a través de la medición de la fluorescencia producida por la L-azidohomoalanina (análogo de la metionina), que es incorporada en las proteínas recientemente sintetizadas. La misma fue cuantificada a lo ancho de la fibra nerviosa utilizando el programa Fiji - Image J, y los anchos de la fibras fueron normalizados para obtener los porcentajes de las mismas.

Se sabe a partir de trabajos realizados anteriormente en el laboratorio, que la relación axón/fibra se mantiene tanto para WT como para TrJ, representando la CS un 60% del ancho total, ubicada hacia los extremos entre las regiones de 0-30% y 70-100%, y la región axonal el 40% central. Fue graficado el promedio (con más de 500 mediciones para cada condición) de la intensidad de fluorescencia en función de las regiones normalizadas (Figura 9), donde se observó que las proteínas recientemente sintetizadas se encuentran principalmente en la región axonal en ambos fenotipos (entre 40% y 70%). A su vez se observa mayor intensidad de fluorescencia en fibras TrJ que en WT, señalando una síntesis proteica incrementada en el fenotipo neurodegenerativo tanto la región de la CS como en la región axonal (Figura 10).

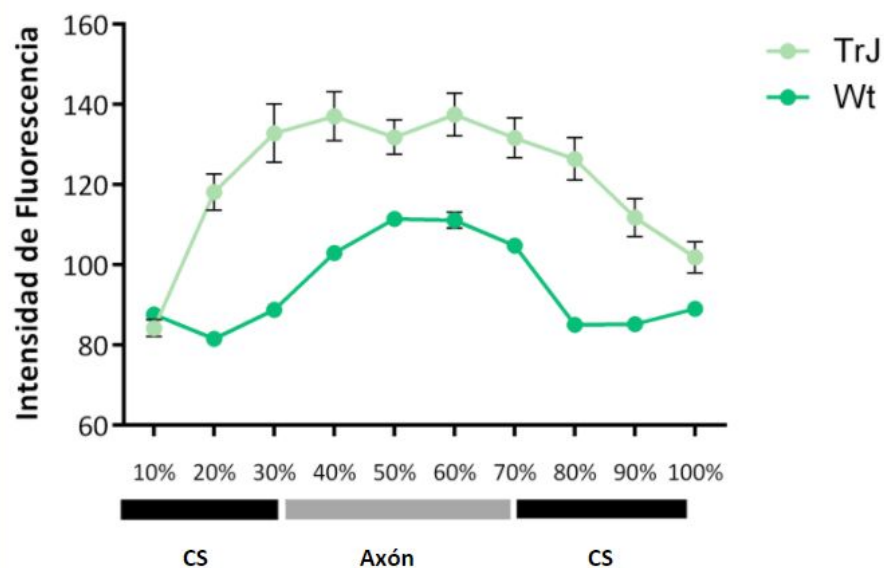


Figura 9. Distribución de las proteínas neo sintetizadas en el ancho de la fibra: El promedio de la intensidad de fluorescencia, referida a la síntesis proteica reciente, con su desviación (SEM) es graficado en función de las regiones en las fibras de TrJ (verde claro) y WT (verde oscuro).

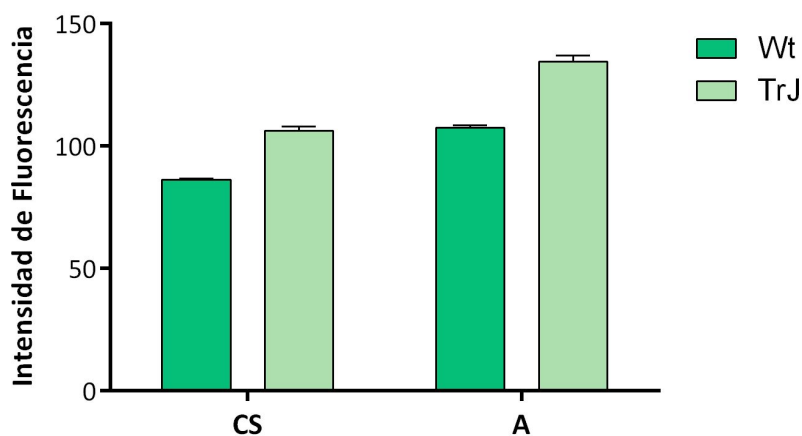


Figura 10. Proteínas Neo sintetizadas en: El promedio de la intensidad de fluorescencia, referida a la síntesis proteica reciente con su desviación (SEM), es graficado para las regiones correspondientes a la célula de Schwann (CS) y el axón (A) tanto para fibras TrJ (verde claro) como WT (verde oscuro).

Caracterización de componentes axoplasmáticos y mielínicos

La caracterización bioquímica de los dominios axonales y gliales de las fibras nerviosas mielinadas del SNP, ha sido siempre un desafío por la estrecha relación estructural y funcional que ambas células mantienen en las fibras nerviosas periféricas. Recientemente, el trabajo de Rishal et al., 2011 ha empleado la extrusión diferencial de dominios celulares provocada por shock osmótico, para obtener fracciones enriquecidas en axoplasma. En nuestro abordaje, adaptamos ese método para el estudio de fibras nerviosas mielinadas WT y TrJ, recuperando también la fracción enriquecida en el resto de los componentes de la fibra nerviosa (CS y mielina).

Luego de obtener las distintas fracciones: total (Ft), axoplásmica (Fax) y de CS (Fcs, que incluyen citoplasma de CS y mielina), las mismas fueron sembradas en un gel desnaturizante SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa y finalmente marcadas con anticuerpos contra ribosomas, PMP22 y Neurofilamentos. La marcación de los últimos se utilizó como control de calidad de la separación, ya que los mismos son un típico componente axoplasmático.

Del revelado de las distintas fracciones con anticuerpos contra neurofilamentos (NF68) se encontraron bandas del peso molecular esperado (68 kDa) tanto en la Ft como en Fcs, y ausencia de bandas en la Fax (Figura 11A), tanto para el fraccionamiento de nervios ciáticos TrJ como el de nervios WT.

El revelado de las distintas fracciones con anti-PMP22, mostró la aparición de bandas, de distintas intensidades, en todas las fracciones en el entorno de los 55 kDa, y no para menores pesos moleculares(Figura 11B).

Finalmente, para el reconocimiento de las proteínas en la membrana con anti-Rib (Figura 11C), varios componentes ribosomales fueron detectados tanto en la fracción total como en la fracción CS, con pesos moleculares entre 30 y 65 kDa.

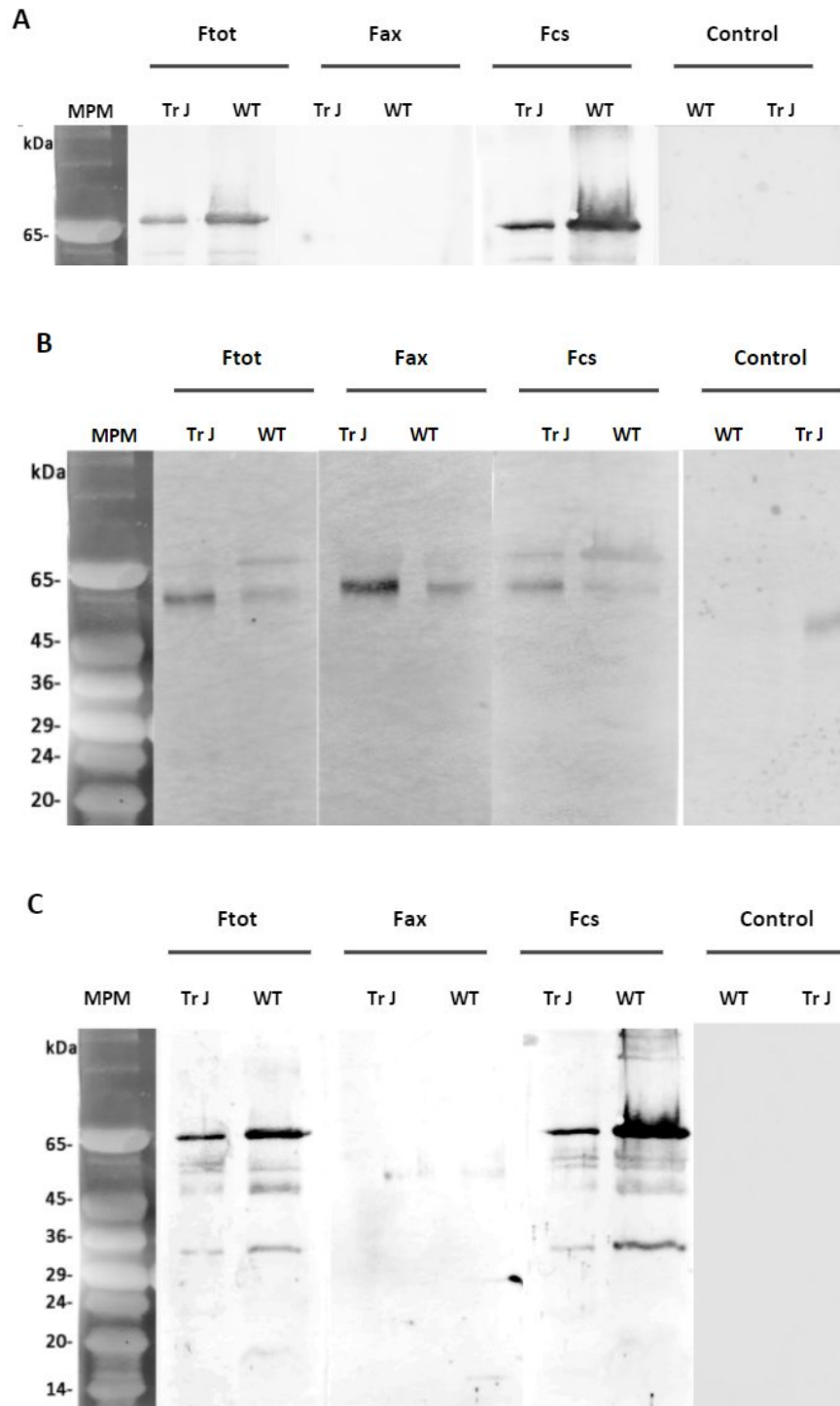


Figura 11. Western Blot de fraccionamiento de nervios ciáticos: **A.** Western Blot de la fracción total (Ftot), fracción axoplásmica (Fax) y de la fracción de la célula de Schwann (Fcs) revelada utilizando anticuerpos contra Neurofilamento 68. **B.** Western Blot de las diferentes fracciones reveladas con anticuerpos contra PMP22. **C.** Western Blot de las diferentes fracciones obtenidas, revelado con anticuerpo específico contra componentes ribosomales.

Evaluación de la cantidad de mitocondrias qPCR

Con el fin de evaluar mediante una metodología suplementaria la cantidad de mitocondrias entre animales salvajes y Trembler J, se realizó una qPCR que permitieran cuantificar la cantidad de ADN mitocondrial con respecto al ADN nuclear. Tanto la metodología como los cebadores (ver Tabla 2) fueron tomados del trabajo realizado por Zhang et al., 2009.

Los ensayos realizados con estos cebadores obtuvieron una eficiencia mayor a la aceptable para el amplicón del gen rRNA 18s correspondiente al ADN nuclear (1,20) por lo que se realizaron curvas de melting con el fin de asegurar la especificidad de la reacción para los cebadores mencionados y otro juego de cebadores contra el 18s nuclear con el que contábamos en el laboratorio (Figura 12).

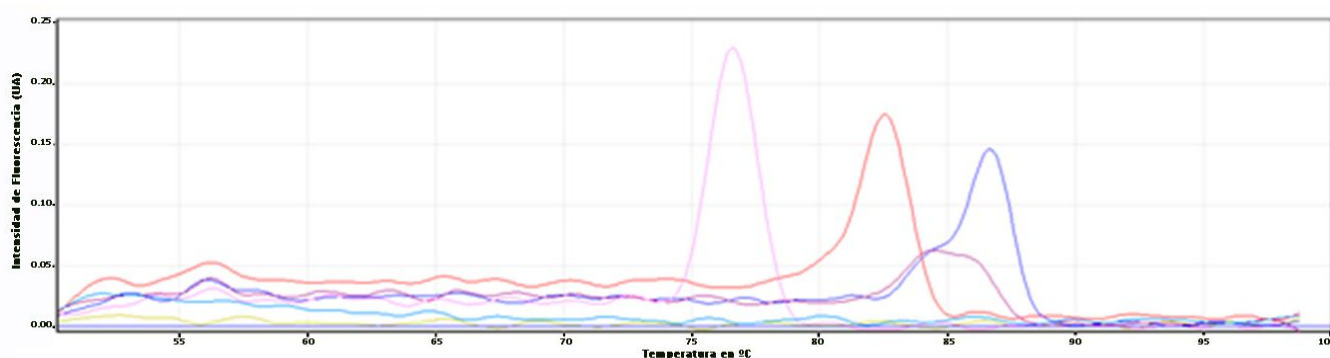


Figura 12. Curva de melting: En rosado la curva correspondiente al juego de primers mitocondrial, en azul se observa la curva de los cebadores nucleares obtenidos Zhang, su control negativo en bordó, y en rojo la curva de cebadores nucleares propios.

En ella se puede ver como la curva correspondiente a los cebadores para el 18s rRNA obtenidos por Zhang presenta un “hombro” antes del pico máximo. Las curvas bimodales de melting no implican en todos los casos una reacción inespecífica. Especialmente cuando se trata de amplicones largos (>200 pb), las mismas pueden aparecer cuando la reacción es específica debido a una amplificación heterogénea de la muestra (Pfaffl M., 2006).

Si bien el amplicón para el 18s de Zhang era un amplicón mayor a 219 pb, no podemos explicar esta bimodal como efecto de una amplificación heterogénea ya que se observa una curva en el control negativo correspondiente a esta juego de cebadores y la misma coincide con el “hombro” anteriormente descrito. Otra análisis de especificidad en la amplificación realizado, fueron los geles de agarosa con los productos de amplificación de la qPCR corrida. Este ensayo confirma lo encontrado en las curvas de melting (Figura 13). A partir de este resultado, ese juego de cebadores fue sustituido por el juego de cebadores contra el 18s rRNA con el que se contaba en el laboratorio. El aumento en la eficiencia por fuera del rango aceptable para los cebadores contra el 18s nuclear de Zhang probablemente se trate de una dimerización entre este juego de cebadores, resultando en un aumento en la señal de fluorescencia.

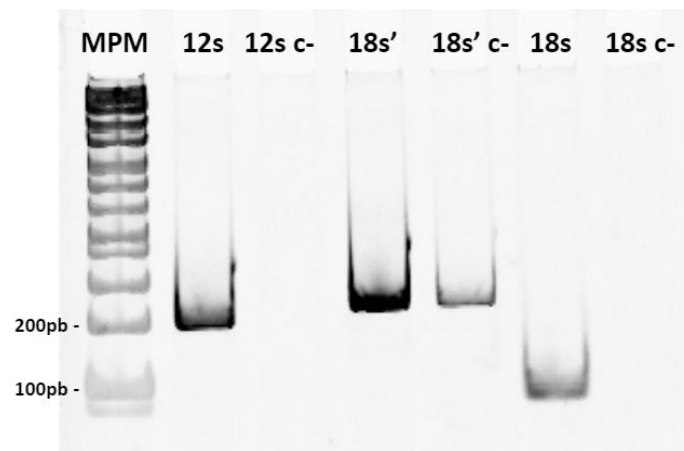


Figura 13. Gel de agarosa con producto de PCR: A partir del producto de reacción de PCR se realiza un gel de agarosa. Primer carril marcador de peso molecular. En el segundo y tercer carril, los productos de reacción de 18s nuclear propio (18s) y su control negativo (18s c-). En el cuarto y quinto carril se ve el producto de reacción del 18s obtenido de Zhang (18s') y su control correspondiente (18s' c-). Finalmente en los carriles sexto y séptimo se ve el producto de PCR mitocondrial (12s) y el control negativo de la misma (12s c-).

Con el nuevo juego de cebadores para el 18s rRNA y el juego de cebadores mitocondrial se corrieron dos curvas estándar, a concentraciones conocidas con diluciones seriadas en base cinco. A partir de cada curva se obtuvieron las eficiencias

de los juegos de cebadores para la reacción y un valor de umbral o Threshold mitocondrial Tmt y uno nuclear Tn (Figuras 14 y 15).

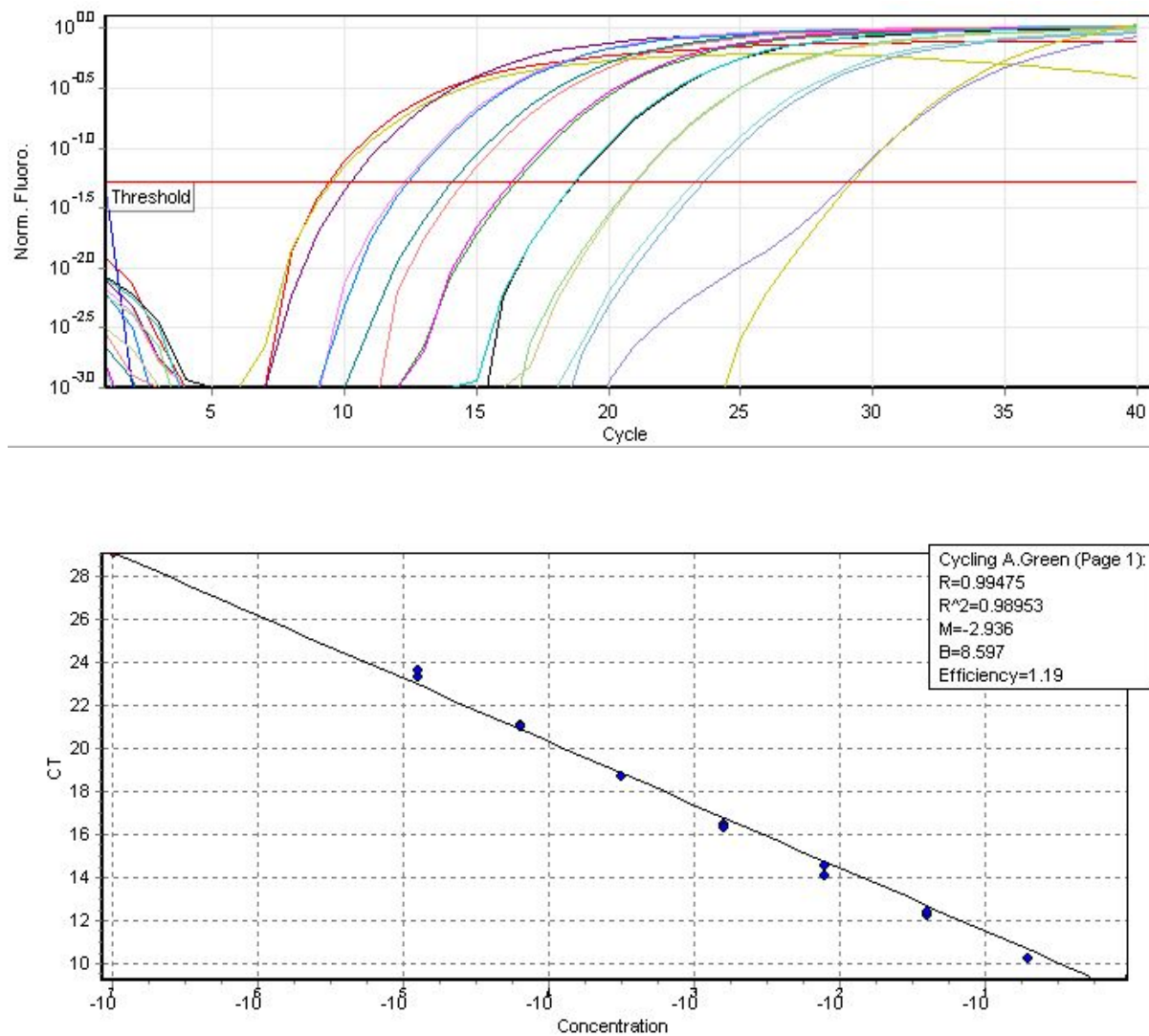


Figura 14. Curva estándar para el juego de cebadores contra rRNA 12s mitocondrial. A partir de una qPCR para concentraciones conocidas de ADN en diluciones seriadas en base cinco. Se obtiene el Threshold mitocondrial Tmt=0,53 y la eficiencia de reacción para los cebadores Ef=1.19.

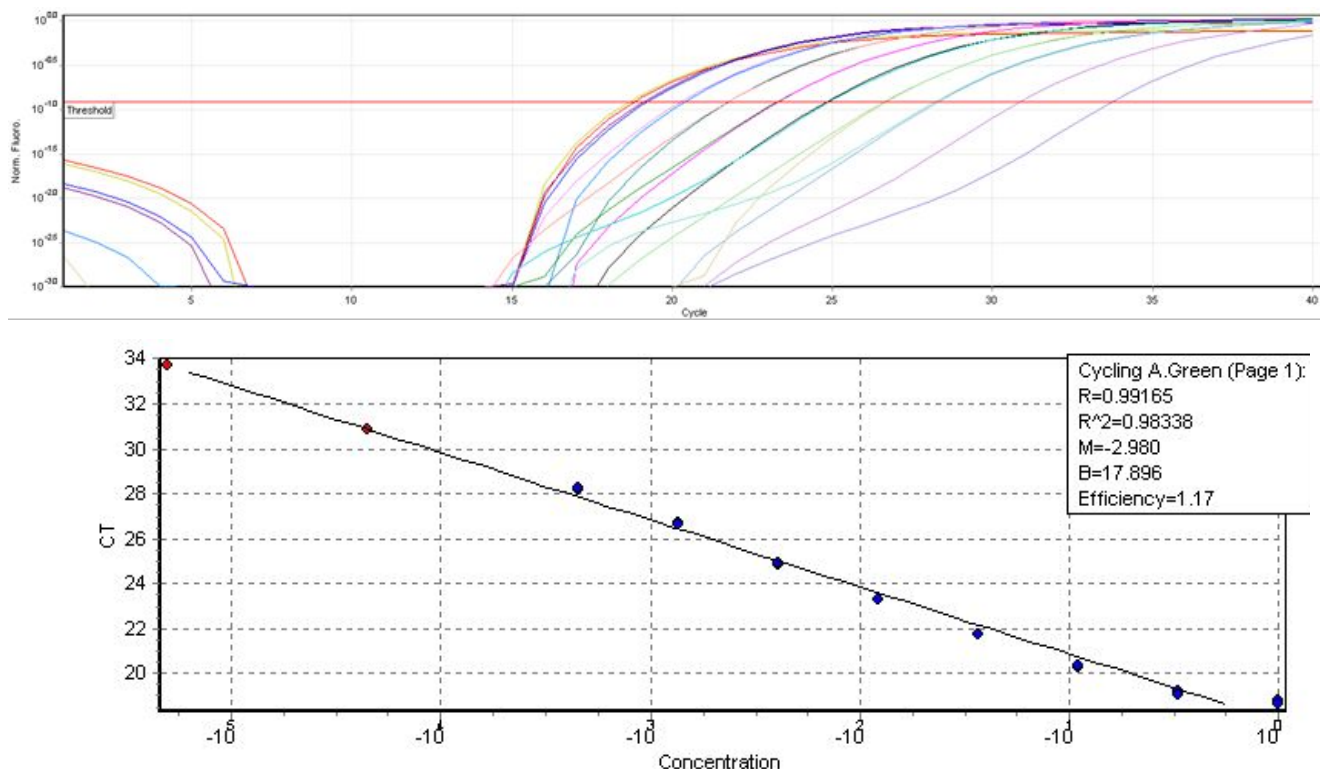


Figura 15. Curva estándar para el juego de cebadores contra rRNA 18s nuclear. A partir de una qPCR para concentraciones conocidas de ADN en diluciones seriadas en base cinco. Se obtiene el Threshold nuclear $T_n=0,122$ y la eficiencia de reacción para los cebadores $E_f=1.17$.

A partir del análisis y la comparación de CTs se obtuvo una relación de ADN mitocondrial en función de ADN nuclear dos veces mayor en animales TrJ, que en animales WT. Al realizar el análisis estadístico para comparar ambas muestras las diferencias no resultaron significativas.

Los datos obtenidos reflejan que las diferencias en cantidad de CTs no son significativas entre ADN mitocondrial WT y TrJ y que las mayores diferencias encontradas en el delta delta CT eran debidas a variación de Cts en el gen de referencia nuclear.

Discusión

Análisis de las fibras nerviosas por MET

Mediante el estudio por MET de nervios ciáticos en ratones TrJ y en ratones WT se encontró cerca de un 10% de las fibras con mielina delaminada. Esto era esperado, y resulta ser consistente con la literatura, ya que PMP22 tiene como uno de sus roles participar en la compactación de la mielina (Hasse et al., 2004). La mutación que presenta PMP22 en los ratones TrJ, impide su normal inserción en la membrana. De este modo, los problemas de mal plegamiento que la proteína sufre debido a la mutación, afecta la función de “abrochamiento” y promueven su agregación citoplasmática.

Una estructura característica de las fibras nerviosas mielinizadas que fue analizada en este trabajo, son las incisuras de Schmidt-Lanterman. El desarrollo de las incisuras parece darse a lo largo del desarrollo postnatal, durante el cual estas estructuras se forman. La proporción de incisuras completas aumenta a lo largo de las primeras semanas de vida en ratas, hasta alcanzar un 100% de incisuras completas a los 21 días de nacidas (Small et al., 1987). Sin embargo, los ratones TrJ estudiados en el presente trabajo, con dos meses de edad, mostraron poseer un número de incisuras (tanto incompletas como completas) incrementado con respecto a los animales WT estudiados, con una importante proporción de incisuras incompletas (hemi incisuras).

Como ya fue estudiado, durante el desarrollo postnatal en ratones, las incisuras de Schmidt-Lanterman no se forman adecuadamente en nervios de animales PMP22 $-/-$, en los que la expresión y localización de moléculas asociadas con los dominios de la mielina poco compacta, las balsas lipídicas, el colesterol y otras moléculas se ven a su vez alteradas. PMP22 se localiza en dominios de la membrana ricos en colesterol que están en una estrecha relación con el citoesqueleto de actina subyacente (Lee et al., 2014), por lo que la inestabilidad de la membrana asociada a las deficiencias en

PMP22 observadas en este trabajo en animales TrJ, podrían también estar vinculadas a su interacción con balsas lipídicas y a través de éstas últimas con el citoesqueleto de actina.

El potencial vínculo entre el citoesqueleto de actina y PMP22 ya ha sido estudiado en el laboratorio dónde esta tesina se enmarca y se ve apoyado por una distribución irregular de la F-actina, sumada a un incremento en la misma, en los ratones TrJ mutantes para PMP22 (Kun et al., 2012). A su vez, estudios independientes en múltiples tipos celulares han demostrado que la expresión alterada de PMP22, tanto a la baja como su sobreexpresión, tiene profundos efectos en las dinámicas y movilidad de membranas (Brancolini et al., 1999, 2000; Roux et al., 2005, Zoltewicz et al., 2012), lo que sería consistente con los deterioros en la adhesión celular, en la migración, en la expansión de las membranas encontradas y en particular la estructura afectada de incisuras de Schmidt-Lanterman encontradas en el trabajo de Lee et al., 2014 en animales PMP22 -/- en comparación con las típicas estructuras en forma de “embudo” que las incisuras de animales WT presentan. Todos estos procesos y estructuras requieren de un preciso remodelado de la actina, indicando que la distribución de la actina filamentosa tanto en las incisuras como en otros dominios de mielina no compacta requiere el correcto ensamblaje de PMP22 en la mielina compacta para su normal funcionamiento.

Considerando la estructura de PMP22, numerosos autores señalan como improbable que ella se una a la actina de forma directa. Sin embargo, basados en la literatura algunos mecanismos por los que PMP22 afecta indirectamente la dinámica de la actina pueden ser propuestos (Lee et al., 2014), pudiendo incluso afectarla a través de su palmitilación, la que en otro contexto, de hecho tiene una fuerte influencia en la forma de las células epiteliales y su migración (Zoltewicz et al., 2012).

El colesterol es un conocido regulador de la mielinización tanto en el SNC como en el SNP (Saher et al., 2011). Algunos estudios han demostrado que la síntesis disminuida

del colesterol tanto en oligodendrocitos como en células de Schwann genera problemas en la formación de la mielina (Saher et al., 2005, 2011).

La mielina tiene un contenido particularmente alto de colesterol y de microdominios de membrana enriquecidos en el mismo, balsas lipídicas, que son funcionalmente relevantes para la regulación de proteínas tanto estructurales como de señalización. PMP22 se asocia con estas balsas lipídicas en fracciones solubles en detergente (Erne et al., 2002; Hasse et al., 2002), lo que es consistente con la localización de la proteína en las uniones estrechas (Notterpek et al., 2001).

Las balsas lipídicas cumplen importantes roles en la membrana plasmática ya que funcionan como anclas de complejos de señalización, los que incluyen las uniones estrechas y las uniones adherentes, que interaccionan con el citoesqueleto de actina (Head et al., 2014). Las uniones adherentes en las incisuras contribuyen a la estabilización de la arquitectura de la mielina (Fannon et al., 1995) y tienen un rol activo en la organización del citoesqueleto de actina (Tricaud et al., 2005).

Las anomalías similares en ratones deficientes en PMP22 y colesterol durante el desarrollo postnatal temprano, así como una mielinización retardada o una reducción en la cantidad de proteínas de la mielina compacta (Saher et al., 2005; Amici et al., 2006), soportan la idea de que PMP22 cumple importantes roles en secuestrar el colesterol de la mielina.

Los niveles descendidos de PMP22 en la membrana plasmática de la CS, podrían generar anomalías en el desarrollo de la mielina a causa de afectar la estabilidad y organización de las balsas lipídicas, afectando el citoesqueleto de actina como consecuencia. De esta forma, como en ratones deficientes de PMP22 (-/-) existen problemas en la formación de las incisuras en parte debida a las dinámicas afectadas del citoesqueleto de actina (Lee et al, 2014), los mismos ocurren en menor medida cuando menores cantidades de PMP22 son integradas en la mielina (como es el caso de TrJ) y esto podría estar impidiendo la formación de incisuras completas a lo largo del desarrollo postnatal, lo que justificaría la gran cantidad de incisuras incompletas observadas en este trabajo.

Al analizar el grosor de la mielina compacta en fibras nerviosas periféricas mielinizadas de ratones de ambos genotipos, se observó que el espesor de la misma se encuentra afectado en ratones TrJ, siendo en promedio tres veces menor que el de los animales WT. Así, además de poseer una importante descompactación en la mielina, estos animales sufren de hipomielinización, lo que afecta la funcionalidad de la fibra, ya que la mielina es una estructura con un importante rol vinculado al aislamiento axonal y, como consecuencia, a la eficiencia en la conducción del impulso nervioso, en la integridad de la fibra nerviosa y en la inhibición del brotamiento axonal.

Todos estos datos tomados en conjunto nos permiten hacer un estudio comparativo completo de las fibras nerviosas de ratones TrJ y WT, revelando importantes diferencias en la estructura de la fibra, principalmente en la estructura de la mielina que se ven reflejadas en los problemas funcionales que poseen los animales del genotipo neurodegenerativo.

El análisis comparativo de la presencia de mitocondrias en fibras nerviosas periféricas de ambos genotipos mostró grandes diferencias entre nervios WT y TrJ. El conteo de mitocondrias en cortes transversales de fibras mediante MET reveló la presencia incrementada en promedio unas tres veces en los nervios de animales TrJ con respecto a los nervios de los animales WT. Haciendo un análisis más profundo de la distribución de las mitocondrias se encontró que las diferencias en la cantidad de mitocondrias observadas se debía principalmente a diferencias a nivel de CS y no tanto a nivel axonal, donde los promedios de mitocondrias encontrados son similares en nervios de ambos genotipos (Fig. 5).

Las mitocondrias son organelos celulares dinámicos con la capacidad de ajustarse a las diferentes necesidades metabólicas mediante fusión, fisión, cambio de forma, transporte y mitofagia (Mishra & Chan, 2016). Estos procesos dinámicos regulan la función mitocondrial permitiendo su reclutamiento a compartimentos subcelulares, el intercambio de contenidos entre mitocondrias, el control de su forma, y el control

de su comunicación con el citosol. Como resultado, las mitocondrias pueden rápidamente adaptarse a cambios en las necesidades celulares así como a requerimientos fisiológicos y ambientales (Nisoli et al., 2004).

De esta forma, la cantidad aumentada de mitocondrias en la las fibras nerviosas TrJ, en particular en la CS de las mismas puede deberse a requerimientos metabólicos incrementados en este compartimento, producto de diversas funciones celulares en estas fibras que resultan en altos requerimientos energéticos. Si bien no tenemos evidencia directa de cuáles puedan ser estas funciones, se podría teorizar sobre algunas de ellas como el esfuerzo de la maquinaria celular para llevar al adecuado plegamiento de las proteínas agregadas, la degradación de las proteínas cuyos problemas de plegamiento no pueden ser solucionados, los esfuerzos celulares por la reconstrucción de una mielina afectada, etc.

La fisión mitocondrial puede ocurrir en respuesta a exceso de nutrientes o problemas en el mantenimiento celular y ha sido observada en diversas circunstancias (enfermedades cardíacas y neuronales, cáncer y obesidad). La misma facilita el recambio mitocondrial por autofagia (mitofagia).

Mientras que la fusión mitocondrial se ve asociada un incremento en la producción de ATP, la inhibición de la fusión mitocondrial se ha visto asociada a una cadenas respiratorias disfuncionales, falta de ADN mitocondrial y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). El balance entre la fusión y la fisión mitocondrial puede ser llevada en cualquier dirección por cambios en la disponibilidad de nutrientes y en las demandas metabólicas causando su fragmentación o su forma hiper tubular (Mishra and Chan, 2016).

El envejecimiento celular, que afecta principalmente a las células postmitóticas (típicamente miocitos cardíacos y neuronas) y a la matriz extracelular resulta de la imposibilidad de los organismos de remover completamente los desechos celulares, como pueden ser macromoléculas y organelos dañados. Usualmente, los tamaños mitocondriales varían más en células envejecidas, comparados con células jóvenes,

presentando una alta proporción de mitocondrias agigantadas y desorganizadas estructuralmente. Se teoriza sobre la posibilidad de que la fisión se vea impedida debido a daño oxidativo en las proteínas y el DNA mitocondrial. Las mitocondrias y los lisosomas parecerían ser de los organelos celulares que más sufren alteraciones debido a los efectos del envejecimiento celular, donde los lisosomas, responsables de la degradación mitocondrial acumulan un polímero que no puede ser degradado, autofluorescente llamado lipofuscina o pigmento de la edad (Brunk & Terman, 2002).

Las mitocondrias envejecidas, con sus tamaños aumentados debido a problemas en los mecanismos de fisión, generan un desafío a la maquinaria lisosomal responsable de la mitofagia. La imposibilidad de la degradación de estos grandes organelos, llevaría a la acumulación de las mismas durante el resto de la vida de las células postmitóticas.

En especial, las células con bajo nivel de división mitótica, acumulan agregados proteicos a lo largo de su vida. En estas condiciones los acúmulos de lipofuscina son importantes (König et al., 2017).

Tomando estos datos en cuenta, junto con el previo conocimiento de los grandes niveles de agregación de PMP22 en los animales del genotipo mutante, la gran cantidad de mitocondrias con tamaños aumentados halladas en los nervios de los animales TrJ, podría deberse a un envejecimiento celular de las fibras debido al acúmulo de productos de desecho (como los agregados de PMP22), imposibilitando la degradación mitocondrial y llevando al acúmulo de las mismas.

A su vez, las mitocondrias senescentes, no sólo son deficientes en la producción de ATP, sino que generan grandes cantidades de superóxido y peróxido de hidrógeno, lo que contribuiría al estrés oxidativo de las células postmitóticas (Brunk & Terman, 2002) y en particular a las fibras nerviosas TrJ.

La presencia de vesículas en las fibras nerviosas también fue estudiada mediante MET. Si bien no se encontraron diferencias significativas en la presencia de vesículas

en animales de dos meses de edad de ambos genotipos, en los animales TrJ fueron visualizadas inclusiones citoplasmáticas como agregosomas, estructuras descritas como acúmulos de proteína y chaperonas entre otros componentes. Estas estructuras son características en nervios de animales con PMP22 mutada, ya que los problemas de plegamiento de esta proteína debido a su alta hidrofobicidad se ven incrementados a causa de los problemas de plegamiento debidos a la mutación.

En paralelo a los análisis comparativos entre animales TrJ y WT de dos meses, los nervios un animal TrJ de un año fueron procesados para la obtención de imágenes en MET. En este ejemplar la presencia de vesículas estaba significativamente incrementada con respecto a las imágenes de nervios en animales de dos meses, pudiendo indicar un mayor tráfico o una degradación lisosomal incrementada en las fibras de animales a edades mayores.

Dentro de los objetivos del trabajo estaba buscar la presencia de ribosomas en los nervios analizados, pero no se logró obtener una resolución suficiente para resolver las estructuras ribosomales. Sin embargo ensayos en los que se caracteriza la actividad de la maquinaria de síntesis proteica, permitieron evaluar funcionalmente la actividad ribosomal.

Caracterización funcional de la maquinaria traduccional

Mediante la utilización del kit Click-it, las proteínas neo-sintetizadas fueron marcadas con un marcador fluorescente durante un lapso temporal idéntico para nervios TrJ y WT, que luego fue observado por microscopía confocal y la señal fluorescente cuantificada utilizando el programa Fiji.

Mediante este ensayo se encontró una mayor cantidad de proteínas neo-sintetizadas a igual tiempo de incubación con el kit, en nervios TrJ que en nervios WT. A su vez, estas proteínas neo-sintetizadas se ven principalmente localizadas en la región axonal, y en menor medida en la región correspondiente a la CS (Fig. 9 y 10).

Esta localización diferencial podría ser debida tanto a una mayor síntesis proteica en la región axonal con respecto a la de la CS, o a que las proteínas sintetizadas en la glía son transportadas luego a la región axonal, donde finalmente las encontramos localizadas. Sin embargo, la idea de que una mayor síntesis axonal ocurre se ve soportada por la distribución ribosomal a lo largo de la fibra hallada en trabajos anteriores realizados por el equipo de trabajo del laboratorio, en el que esta tesina se enmarca (Tesis de Maestría de Carlos Romeo).

La idea de que la síntesis proteica está incrementada en las fibras TrJ con respecto a las WT, soporta la idea de una mayor necesidad de mitocondrias debido a requerimientos energéticos incrementados en los nervios del genotipo mutante.

Caracterización Bioquímica de componentes axoplásmicos y de CS

Para evaluar la calidad del fraccionamiento mediante el protocolo de extrusión del axoplasma que es detallado en materiales y métodos, se realizó la detección de las proteínas en cada fracción con el anticuerpo contra neurofilamento 68. Gracias a esta prueba se puede ver que la separación no es completamente eficiente, ya que no se encuentran ninguna banda de reconocimiento en la fracción axoplásmica, mientras que si se encuentra en la fracción mielínica. Esto indica que si bien parte de las proteínas axoplásmicas fueron purificadas (como se ve en la figura 11B), no se logran obtener todos los componentes del axoplasma en esta fracción.

A pesar de esto, anti-PMP22 reconoce de una banda mayoritaria en la fracción axoplásmica en relación a las restantes fracciones. Si bien era esperado que la banda reconocida por el anti-PMP22 se encontrara cerca de los 22 kDa, ninguna banda se visualiza a esta altura. Al teñir el gel transferido y las membranas, puede verse que la transferencia no fue del todo eficiente y muchas proteínas de bajo peso molecular quedan en el gel y no son transferidas. Otra razón para no encontrar a PMP22 en bajos pesos moleculares podrían ser problemas de degradación de la muestra.

El reconocimiento de una banda de 55 kDa, como la que se observa en la Figura 11B, se muestra en la hoja de información que el anticuerpo de PMP22 incluye.

Esta banda podría tratarse tanto de dímeros de la proteína consigo misma, como con otros componentes, lo que no sería sorprendente vistas las interacciones de PMP22 en la membrana. Esta banda se ve muy incrementada en los nervios TrJ para todas las fracciones, indicando mayores niveles esta proteína o complejo reconocido principalmente en la Fax.

El revelado con el anticuerpo policlonal anti-Rib (Figura 11C) reveló una serie de bandas de de distintos pesos moleculares tanto en la fracción total como en la fracción mielínica, pero no se observan bandas en la fracción axoplásmica. Es presumible que la falta de reconocimiento por anti-Rib en el axoplasma sea debido a los problemas en la separación de los componentes en esta fracción y no a la ausencia de ribosomas en el axón, ya que en trabajos anteriores realizados en este laboratorio se vio una presencia incrementada de ribosomas en el axón mediante microscopía confocal.

Análisis por qPCR del ADN mitocondrial

El análisis de las cantidades relativas de ADN mitocondrial realizado durante este trabajo utilizando la técnica de qPCR tal como es descrita por Zhang et al. 2009 (basados en la premisa de que hay igual cantidad del gen nuclear utilizado como referencia en ambos genotipos), lanzó como resultados una cantidad de ADN mitocondrial respecto al ADN nuclear incrementada cerca de dos veces para la purificación de ADN a partir de nervios de animales TrJ con respecto al ADN purificado a partir de nervios ciáticos WT. Si bien este resultado parecería ser coherente con el conteo de mitocondrias en nervios realizados por MET, el tratamiento estadístico mostró que las diferencias encontradas no eran significativas.

Haciendo un análisis más profundo del set de datos se encontró que las diferencias en la relación ADNmitocondrial/ADNnuclear no eran debidas a una mayor cantidad de ADN mitocondrial, sino a diferencias en la relación ADNmitocondrial/ADNnuclear generadas por un incremento en el ADN nuclear -si bien la misma cantidad de ADN

fue utilizada en cada ensayo y esta diferencia sería contradictoria con la premisa de partida.

Si bien con la información y los experimentos realizados durante este trabajo no contamos con suficiente información como para resolver a qué se deben los resultados obtenidos en el experimento de qPCR se puede teorizar que:

1. Las diferencias en CTs a nivel del gen utilizado como referencia (18S nuclear) podrían deberse a que el genoma de los animales TrJ no cuenta con la misma cantidad de repetidos para el gen del 18S nuclear, imposibilitando de esta forma la cuantificación del ADN mitocondrial relativa a este gen. De todos modos, esta posibilidad, teniendo en cuenta que la localización cromosómica de PMP22 y los genes del 18s rRNA es distinta, junto con el hecho de que los ratones de los distintos genotipos estudiados son hermanos es baja. Esta posibilidad sería plausible en el caso en que ambos genes estuvieran ligados y tanto la mutación de pmp22 como el número aumentado de copias en el 18s nuclear se presentaran en el mismo cromosoma en simultáneo.
2. Partiendo de la base de que mitocondrias funcionales tienen contenido equivalente de ADN la presencia, de un mayor número de mitocondrias en el genotipo TrJ supondría que de estas ser funcionales, se encontraría una mayor cantidad de ADN mitocondrial. Sin embargo la cantidad incrementada de mitocondrias en animales TrJ observada por MET no correlaciona con los datos hallados por el ensayo de qPCR como ha sido diseñado en el presente trabajo. De verificarse este hallazgo supondría que parte de las mitocondrias visualizadas no se encuentran en un estado funcional, sino en vías de la degradación y su genoma se encuentra degradado o incompleto.

Conclusiones

1. Los ratones TrJ parecen tener un mayor número de mitocondrias en la CS.
2. Los tamaños alcanzados por estas mitocondrias TrJ son mayores que los alcanzados por las mitocondrias presentes en WT.
3. Se observó un número notablemente mayor de vesículas en nervios de animales TrJ de un año comparado con los nervios de animales TrJ de dos meses.
4. Se encontraron diferencias significativas en la síntesis proteica, estando aumentada en los dominios axonales de la fibras nerviosas TrJ, siguiendo una distribución en la fibra, que correlaciona con la distribución de ribosomas en la misma.

Perspectivas de este trabajo:

1. Sería pertinente la realización de ensayos de viabilidad mitocondrial, a modo de confirmar la funcionalidad del mayor número de mitocondrias observadas en TrJ.
2. Repetir los experimentos de qPCR utilizando un gen de referencia que sea cuantitativamente equivalente en ambos genotipos (ej.: actina) y otro gen mitocondrial (ej.: citocromo b).
3. Realizar una observación de la variación temporal (desde animales jóvenes a animales de mayor edad) del número de vesículas para ambos genotipos por MET.
4. Realizar una observación de la variación temporal del número de ribosomas para ambos genotipos por MET.
5. Correlacionar en un mismo experimento traducción in-vitro mediante el uso de Click-it e inmuno microscopía confocal de ribosomas realizando un análisis cuantitativo de ambas señales.
6. Realizar ensayos que permitan confirmar la identidad de la banda reconocida por el anticuerpo anti-PMP22 que se ve cerca de los 55 kDA.

Referencias

Amici S.A., Dunn W. A., Notterpek L. Developmental abnormalities in the nerves of peripheral myelin protein 22-deficient mice. *J Neurosci Res.* 2, 238–249 (2007).

Armati P.J. The Biology of Schwann Cells. Development, Differentiation and Immunomodulation (2007). doi:10.1017/CBO9780511541605

Berciano J., Combarros O. Hereditary neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 5, 613-622 (2003).

Brancolini C., Marzinotto S., Edomi P., Agostoni E., Fiorentini C., Müller H. W., & Schneider C. Rho-dependent Regulation of Cell Spreading by the Tetraspan Membrane Protein Gas3/PMP22. *Molecular Biology of the Cell.* 7, 2441–2459 (1999).

Brancolini C., Edomi P., Marzinotto S., Schneider C. Exposure at the cell surface is required for gas3/PMP22 To regulate both cell death and cell spreading: implication for the Charcot-Marie-Tooth type 1A and Dejerine-Sottas diseases. *Mol Biol Cell.* 9, 2901-2914 (2000).

Brunk U. T. & Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur. J. Biochem.* 269, 1996–2002 (2002).

Chance P. F., Abbas N., Lench N.W., et al. Two autosomal domainant neuropathies result from reciprocal DNA duplication deletion of a region on chromosome 17. *Hum Mol Genet* 1994; 3:223-228.

Chouza C. Temas de neurología - Ciclipa. Facultad de Medicina, 2002.

D'Urso D., Ehrhardt P. & Müller H.W. Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J. Neurosci.* 19, 3396–3403 (1999).

Fedoroff S. & Richardson A. *Protocols for Neural Cell Culture*, tercera edición, Human Press, página IX (2001).

Giambonini-Brugnoli G., Buchstaller J., Sommer L., Suter U., Mantej N. Distinct disease mechanisms in peripheral neuropathies due to alters peripheral myelin protein 22 gene dosage of Pmp22 point mutation. *Neurobiol Dis.* 3, 656-668 (2005).

Greenfield S., Brostoff S., Eylar E.H., Morell P. Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J. Neurochem* 20, 1207–1216 (1973).

Hasse B., Bosse F., Hanenberg H. & Werner Müller H. Peripheral myelin protein 22 kDa and protein zero: Domain specific trans-interactions. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 370–378 (2004).

Hogan V., White K., Edgard J., McGill A., Karim S., McLaughlin M., Griffiths L., Turnbull D., Nichols P. Increased in mitochondrial density within axons and supporting cells in response to demyelination in the Plp 1 mouse model. *J Neurosci Res.* 2, 452-459 (2009). doi: 10.1002/jnr.21867.

Jessen K. R. & Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* 6, 671–82 (2005).

Katona I., Wu X., Feely S. M. E., Sottile S., Siskind C. E., Miller L. J., Shy M. E., Li J. et al. PMP22 expression in dermal nerve myelin from patients with CMT1A. *Brain* 132, 1734–1740 (2009).

König J., Otta C., Hugoa M., Junga T., Baulteab A. L., Gruneat T., Höhna A. Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. *Redox Biol.* 11, 673–681 (2017).

Kun A, Otero L, Sotelo-Silveira J, Sotelo J. *Journal of Neuroscience Research.* 10, 2087-2098 (2007).

Martin I., Nguyen T. D., Krell V., Greiner J. F. W., Müller J., Hauser S., and others. Generation of Schwann Cell-Derived Multipotent Neurospheres Isolated from Intact Sciatic Nerve. *Stem Cell Rev. Reports.* 8, 1178–1187 (2012).

Meyer zu Horste G., Prukop T., Nave K. A., Sereda M. W. Myelin disorders: causes and perspectives of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Mol Neurosci* 28, 77–88 (2006).

Mishra P. & Chan D. C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* 212, 379–387 (2016).

Mobley C., Myers K., Hadziselimovic,A., Ellis C., Sanders C. R. Congenital hypomyelinating neuropathy, a long term follow-up study in an affected family. Purification and initiation of structural characterization of human peripheral myelin protein 22 , an integral membrane protein linked to peripheral neuropathies . *Gene* 1–74 (2007).

Myers J. K., Mobley C. K. & Sanders C. R. NIH Public Access. October 47, 10620–10629 (2008).

Niemann A., Berger P., Suter U. Pathomechanisms of mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nueromolecular Med.* 8(1-2), 217-42 (2006).

Nisoli E., Clementi E., Moncada S., and Carruba M.O. Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1–15 (2004).

Notterpek L., Ryan M. C., Tobler a R. & Shooter E. M. PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol. Dis.* 6, 450–460 (1999).

Lambert E. H., Dyck P .J. Compound action potentials of human sural nerve biopsies. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.*, 25(4), 399-400 (1968).

Lee S., Amici S., Tavori H., Zeng W. M., Freeland S., Fazio S., Notterpek L. PMP22 Is Critical for Actin-Mediated Cellular Functions and for Establishing Lipid Rafts. 34, 16140–16152 (2014).

Li J., Parker B., Martyn C., Natarajan C. & Guo J. The PMP22 Gene and Its Related Diseases. *Mol. Neurobiol.* 22, 1–26 (2012).

Pareek S., Suter U., Snipes G. J., Welcher A. A., Shooter E. M., Murphy R. A. Detection and processing of peripheral myelin protein PMP22 in cultured Schwann cells. *J. Biol. Chem.* 268, 10372–10379 (1993).

Pareek S., Notterpek L., Snipes G. J., Naef R., Sossin W., Laliberté J., Iacampo S., Suter U., Shooter E. M., Murphy R. A. Neurons promote the translocation of peripheral myelin protein 22 into myelin. *J Neurosci.* 20, 7754-7762 (1997).

Patel P. I. & Lupski J. R. Charcot-Marie-Tooth disease: a new paradigm for the mechanism of the inherited disease. *Trends Genet.* 4, 128-133 (1994).

Pfaffl M. W. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, editor. *The Real-Time PCR Encyclopedia A–Z of Quantitative PCR*. International University Line; La Jolla, CA. 87–112 (2004).

Pfaffl M. W. Relative quantification. Real-time PCR (2006). doi:10.4016/17251.01

Poliak S., Peles E. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci.* 12, 968-980 (2003).

Quintes S., Goebbels S., Saher G., Schwab M. H., Nave K. A. Neuron-glia signaling and the protection of axon function by Schwann cells. *J Peripher Nerv Syst.* 1, 10-16 (2010). doi: 10.1111/j.1529-8027.2010.00247.x.

Rangaraju S., Hankins D., Madorsky I., Madorsky E., Lee W.H., Carter C. S., Leeuwenburgh C., Notterpek L. Molecular architecture of myelinated peripheral nerves is supported by calorie restriction with aging. *Aging Cell.* 2, 178-191 (2008). doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00460.x. Epub 2009 Feb 23.

Ravera S., Nobbio L., Visigalli D., Bartolucci M., Calzia D., Florese F., Mancardi, G., Schenone A., Morelli A., Panfolio L. Oxidative phosphorylation in sciatic nerve myelin and its impairment in a model of dysmyelinating peripheral neuropathy. *J Neurochem.* 1, 82-92 (2013). doi: 10.1111/jnc.12253. Epub 2013 Apr 30.

Rishal I., Michaelevski I., Rozenbaum M., Shinder V., Medzihradszky K.F., Burlingame A. L., Fainzilber M. Axoplasm Isolation from Peripheral Nerve. *NIH Public Access.* 70, 126–133 (2011).

Rosso G., Cal K., Canclini L., Damián J.P., Ruiz P., Rodríguez H., Sotelo J.R., Vazquez C., Kun A. Early phenotypical diagnoses in Trembler-J mice model. *J Neurosci Methods.* 1, 14-19 (2010). doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.04.010.

Rosso G., Negreira C., Sotelo J. R. & Kun A. Myelinating and demyelinating phenotype of Trembler-J mouse (a model of Charcot-Marie-Tooth human disease) analyzed by

atomic force microscopy and confocal microscopy. *J. Mol. Recognit.* 25, 247–255 (2012).

Rosso G., Liashkovich I., Gess B., Young P., Kun A., Shahin V. Unravelling crucial biomechanical resilience of myelinated peripheral nerve fibres provided by the Schwann cell basal lamina and PMP22. *Sci. Rep.* 4, 7286 (2015).

Roux K. J., Amici S. A., Fletcher B. S., Notterpek L. Modulation of epithelial morphology, monolayer permeability, and cell migration by growth arrest specific 3/peripheral myelin protein 22. *Mol Biol Cell.* 16, 1142– 1151 (2005).

Russo M., Laurá M., Polke J. M., Davis M. B., Blake J., Brandner S., Hughes R. A., Houlden H., Bennett D. L., Lunn M. P., Reilly M. M. Variable phenotypes are associated with PMP22 missense mutations. *Neuromuscul. Disord.* 21, 106–114 (2011).

Salzer J. L., Brophy P. J. & Peles E. Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia* 56, 1532–1540 (2008).

Salzer J. L. Polarized Domains of Myelinated Axons. *October* 40, 297–318 (2003).

Saporta M. A., Katona L., Lewis R. A., Masse S., Shy M. E., Li J. Shortened internodal length of dermal myelinated nerve fibers in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain.* 1, 3263-3273 (2009). doi: 10.1093/brain/awp274.

Saporta A. S. D., Sottile S. L., Miller L. J., Feely S. M.E., Siskind C. E., Shy M. E. Charcot-marie-tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol.*, 69: 22–33 (2011). doi:10.1002/ana.22166

Scherer S. S. & Arroyo E. J. Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J Peripher Nerv Syst* 7, 1–12 (2002).

Sedzik J., Uyemura K., Tsukihara T. Towards crystallization of hydrophobic myelin glycoproteins: P0 and PASII/PMP22. *Protein Expr Purif.* 26, 368–377 (2002).

Sedzik J., Jastrzebski J. P., Ikenaka K. Sequence motifs of myelin membrane proteins: towards the molecular basis of diseases. *J Neurosci Res.* 91, 479–493 (2013).

Sherman D. L. & Brophy P. J. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 683–90 (2005).

Simons M. & Trotter J. Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 533–540 (2007).

Small J. R., Ghabriel M. N. & All G. The development of Schmidt-Lanterman incisures: an electron microscope study. *J Anat* 150, 277–286 (1987).

Snipes G. J., Suter U., Welcher A. A. & Shooter E. M. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J. Cell Biol.* 117, 225–238 (1992).

Suter U., Moskow J. J., Welcher A. A., Snipes G. J., Kosaras B., Sidman R. L., Buchberg A. M., Shooter E. M. A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4382–6 (1992).

Suter U. & Scherer S. S. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 714–726 (2003).

Taguchi K., Yoshinaka K., Yoshino K., Yonezawa K., Maekawa S. Biochemical and morphologic evidence of the interaction of oligodendrocyte membrane rafts with actin filaments. *J Neurosci Res.* 81, 218–225 (2005).

Tobler A. R., Ning Liu, Mueller L. & Shooter E. M. Differential aggregation of the Trembler and Trembler J mutants of peripheral myelin protein 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 483–488 (2001).

Trapp B. D., Andrews S. B., Wong A., O'Connell M., Griffin J. W. Colocalization of the myelin-associated glycoprotein and the microfilament components, F-actin and spectrin, in Schwann cells of myelinated nerve fibres. *J Neurocytol* 18, 47– 60. CrossRef Medline (1989)

Trapp B. D., Nave K. A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder. *Annu Rev Neurosci.* 31, 247-269 (2008).
doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313

Valentijn L. J., Baas F., Wolterman R. A., Hoogendijk J. E., van den Bosch N., Zorna I., Gabreels-Festen A., de Visser M., Bolhuis P. A. Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat. Genet.* 2, 288–291 (1992).

Vallat J. M., Sindou P., Preux P. M., Tabaraud F., Milor A. M., Couratier P., LeGuern E., Brice A. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann. Neurol.* 39, 813–817 (1996).

Vallat J. M. Dominantly inherited peripheral neuropathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 699–714 (2003).

Vallat J. M., Grid D., Magdelaine C., Sturtz F. & Tazir M. Autosomal recessive forms of Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 4, 413–419 (2004).

Verheijen M. H., Peviani M., Hendricusdottir R., Bell E. M., Lammens M., Smit A.B., Bendotti C., van Minnen J. Increased axonal ribosome numbers is an early event in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 1, e87255 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0087255.

Werner H. B., Kramer-Albers E. M., Strenzke N., Saher G., Tenzer S., Ohno-Iwashita Y., De Monasterio-Schrader P., Mobius W., Moser T., Griffiths I. R., Nave K.A. A critical role for the cholesterol-associated proteolipids PLP and M6B in myelination of the central nervous system. *Glia*. 62, 567–586 (2013).

Zhang H., Maguire D., Swarts S., Sun W., Yang S., Wang W., and others. Replication of murine mitochondrial DNA following irradiation. *645*, 43–48 (2009).

Zoltewicz S. J., Lee S., Chittoor V. G., Freeland S. M., Rangaraju S., Zacharias D. A., Notterpek L. The palmitoylation state of PMP22 modulates epithelial cell morphology and migration. *ASN Neuro*. 4, 409–421 (2012).