

Reguladores de estados fosforilados de
MARCKS en neuroblastos y neuronas
retinianas en desarrollo

Andrea Toledo
PEDECIBA
2013

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
ÁREA BIOLOGÍA

TESIS PRESENTADA PARA ACCEDER AL
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Reguladores de estados fosforilados de MARCKS en neuroblastos y neuronas retinianas
en desarrollo”

Mag. Andrea Toledo

Laboratorio de Cultivo de Tejidos
Sección Biología Celular
Departamento de Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Director:
Prof. Dra. Cristina Arruti

Tribunal:
Presidente: **Dr. Raúl Russo**
Vocales: **Prof. Agda. Dra. Patricia Cassina**
Dr. José Badano

Montevideo, Uruguay
Mayo de 2013

A Mamá y Maruja

Agradecimientos:

Quisiera expresar mi enorme gratitud a todos quienes directa o indirectamente colaboraron conmigo para la realización de este trabajo:

- A Cristina Arruti por abrirme las puertas del laboratorio y guiarme durante este trabajo.
- A Raúl Russo, Patricia Cassina y José Badano por acceder a formar parte del tribunal de esta tesis y realizar importantes comentarios para mejorarla.
- A Flavio Zolessi, quien con gran paciencia responde mis preguntas diariamente.
- A la Dra. Lilián Perdomo de PRODHIN sin cuya generosa colaboración este trabajo no hubiese podido seguir adelante.
- A los compañeros de la Secciones Virología, en particular a Mabel Berois, Andrea Blanc y Lorena Tomé por su contribución en la realización de parte de este trabajo.
- A los compañeros de la Sección Bioquímica por su buena disposición permanente.
- A Eduardo Mizraji por su generosa colaboración a lo largo de esta tesis.
- A Alicia de María que a pesar de los kilómetros, siempre estuvo presente ayudando en todo lo que le fue posible.
- A las Unidades de Unidad de Proteómica y Bioquímica Analítica, Proteínas Recombinantes, Biología Celular, y al Laboratorio de Genética Molecular Humana del Instituto Pasteur de Montevideo por sus innumerables aportes a este trabajo.
- Al laboratorio de Biología Celular del IIBCE a cargo de la Mónica Brauer por su contribución en este trabajo y sus importantes críticas durante la elaboración del mismo.
- A mis compañeros de la Sección Biología Celular: Grace, Nibia, Nicolás, Marieta y Jime, por apoyarme siempre.
- A los compañeros del Laboratorio de Neurociencias: Francesco, Lucía, Natalia y Gabriela.
- A mis compañeros de Laboratorio de Cultivo de Tejidos: Daniel, Gonzalo, Maite y Lulu. Gracias por prestarme la oreja, la mano o la cabeza siempre que lo necesité.
- A Soledad Astrada por su asistencia y paciencia en la adquisición de imágenes en de microscopía confocal.
- A Gricel por hacer mucho más fácil el trabajo de estos últimos meses.
- A Gabriel Santoro, por su tiempo para la impresión de las imágenes del trabajo.

- A los amigos que por suerte siempre están; Ale, Andrés, Ceci, María, Oli, Vero, Sole, Santi, Flor, Nuria, Patricia y Natalia.
- A mis excelentes compañeras de ruta que me apoyaron, alentaron y alimentaron en durante buena parte de esta tesis, Solita, Pau y Chloe.
- Al hallazgo más importante de este doctorado, Dario.
- A mi FAMILIA a quienes estoy profunda y eternamente agradecida por el apoyo incondicional y el aliento de todos los días, cuando las cosas van bien y cuando no tanto....

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de PEDECIBA, ANII y CSIC.

INDICE

- Resumen	1
- Abreviaturas	3
-Introducción	4
- MARCKS	4
- Estructura	5
- Estructura secundaria: MARCKS es una proteína naturalmente desplegada	8
- Emplazamiento subcelular	11
- Rol funcional	12
- Fosforilaciones “convencionales” de MARCKS	16
- Otras fosforilaciones de la proteína	17
- S25p-MARCKS en la diferenciación neuronal en la retina	18
- Hipótesis	23
- Objetivos	23
- Materiales y Métodos	25
- 1) Animales	25
- 2) Anticuerpos	25
- 3) Reactivos	26
- 4) Cuantificación de proteínas	26
- 5) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
- 6) Western-blot	27
- 7) Criomicrotomía	28
- 8) Cultivos primarios de células de la retina neural	28
- 9) Cultivos primarios de fibroblastos de embriones de pollo	29
- 10) Tratamientos farmacológicos con inhibidores de quinasas y fosfatasas	29
-11) Tratamientos con forbol 12-acetato, 13.miristato (PMA) sobre cultivos y retinas aisladas ---	29

- 12) Inmunodetección <i>in situ</i>	30
- 13) Purificación de anticuerpo monoclonal 3C3	31
- 14) Preparación de columna de proteína A-Sefarosa 4B	31
- 15) Purificación de inmunoglobulinas de ratón	31
- 16) Acoplamiento del anticuerpo monoclonal 3C3 y de inmunoglobulinas de ratón a Sefarosa-4B	32
- 17) Inmunoprecipitación	32
- 18) Medidas de densidad óptica de las bandas de Western-blot	33
- 19) Purificación de colágeno I a partir de colas de rata	33
- 20) Análisis estadísticos	33
 - Resultados	
 -Capítulo I: Identificación de la quinasa responsable de la fosforilación de la serina 25 de MARCKS durante	
la diferenciación neuronal	34
- 1.1) Búsqueda de secuencias consenso de fosforilación en torno al sitio de la S25 de MARCKS en vertebrados	34
- 1.2) Inhibición de la actividad de Cdks	36
- 1.3) Localización de S25p-MARCKS y Cdk5 durante el desarrollo del ojo en embriones de Pollo	40
- 1.4) Efectos de la inhibición de la actividad de Cdk5 mediante tratamientos con roscovitina sobre el crecimiento neurítico	45
- Discusión	49
- La serina 25 de MARCKS es fosforilada por Cdk5 en neuroblastos retinianos	49
- S25p-MARCKS y Cdk5 se localizan en neuroblastos postmitóticos en la retina	51
- La inhibición de la actividad de Cdk5 en neuroblastos de la retina provoca retracción neurítica sin alterar la organización del citoesqueleto	54

- Capítulo II: ¿Componentes de la matriz extracelular y/o factores de crecimiento son promotores de la fosforilación en S25? Búsqueda de interactores moleculares de MARCKS	56
- 2.1) Aparición y etapas iniciales de la fosforilación de MARCKS en serina 25 en neuroblastos retinianos: efectos de la laminina	56
- 2.2) Distribución de S25p-MARCKS en neuroblastos diferenciados sobre distintos sustratos ...	63
- 2.3) Aparición de la fosforilación en S25 de MARCKS en neuroblastos retinianos cultivados en presencia de factores de crecimiento	66
- 2.4) Distribución de S25p-MARCKS y moléculas vinculadas a la adhesión celular en retinas de embriones de pollo	68
- 2.5) Localización subcelular de cadherinas, NCAM y S25p-MARCKS en neuroblastos cultivados sobre distintos sustratos y en microdominios de membrana plasmática	72
- 2.6) Identificación de interactores moleculares	79
- Discusión	84
- Los elementos de la MEC como promotores de la fosforilación de MARCKS en la S25	84
- Rol de los factores de crecimiento en la fosforilación de la S25 de MARCKS	85
- La fosforilación en S25 de MARCKS no propicia su interacción con proteínas de adhesión intercelular	87
- Búsqueda de interacciones directas o indirectas de MARCKS con posible rol fisiológico	89
- Capítulo III: Relación entre las fosforilaciones clásicas de MARCKS en el ED y la fosforilación en S25	
- 3.1) Presencia y localización de MARCKS fosforilada en el DE durante el desarrollo del sistema nervioso	93
- 3.2) Evaluación de los niveles de fosforilación de MARCKS en el dominio efector durante el desarrollo del sistema nervioso mediante SDS-PAGE	99
- 3.3) Localización de algunas variantes de PKC durante el desarrollo de la retina neural	101
- 3.4) Estimulación de la fosforilación de MARCKS en el DE por PKC en retinas aisladas	104
- 3.5) Distribución de MARCKS y sus variantes fosforiladas en neuroblastos aislados, tratados con PMA	108
- 3.6) Evolución de las fosforilaciones en el ED y en la serina 25 de MARCKS al suprimir la estimulación con PMA	112
- 3.7) Comparación de los efectos de la citocalasina D y PMA sobre los estados fosforilados en	

el ED y en la S25.....	115
- 3.8) Efectos de la inhibición de proteínas fosfatasa clásicas sobre la desfosforilación de S25p-MARCKS inducida por los tratamientos con PMA	116
- Discusión:	121
- Fosforilación de MARCKS durante el desarrollo normal de la retina neural	121
- Exclusión molecular de las fosforilaciones clásicas y no clásicas de MARCKS	122
- La activación de PKC en la retina neural provoca la desfosforilación de la S25 de MARCKS ---	123
- Identificación de la fosfatasa que desfosforila a MARCKS en la S25	124
- Capítulo IV: Modificaciones en la localización de MARCKS y reorganización del citoesqueleto de actina, consecuentes a la activación de PKC en fibroblastos y glía de Müller	127
- 4.1) Efecto de la estimulación de PKC con PMA en el citoesqueleto de actina en fibroblastos y células de Müller en cultivo	127
- 4.2) Relocalización de MARCKS como consecuencia de su fosforilación por PKC	132
- 4.3) Reversión de la fosforilación en el DE de MARCKS luego de suprimir la estimulación con PMA	139
- 4.4) Comparación de los efectos de la citocalasina D y PMA sobre la citoarquitectura de fibroblastos y células de Müller	139
- 4.5) Localización de pED-MARCKS en fibroblastos y células de Müller en mitosis	142
- Discusión:	146
- La estimulación de PKC promueve la reorganización de los microfilamentos en fibroblastos y células de Müller	146
- La fosforilación de MARCKS en el DE promueve su translocación al citoplasma y su asociación parcial con lisosomas y vesículas de membrana	148
- La integridad del citoesqueleto de actina no determina el emplazamiento subcelular de	

MARCKS.....	149
- ¿Un nuevo rol fisiológico de MARCKS durante la mitosis?	151
- Apéndice I	153
- Apéndice II	155
- ii.1 Construcción del vector herpético	156
- ii.2 Generación de partículas virales	157
- ii.3 Transducción de cultivos neuronales	158
- ii.4 Transducción de una línea celular de glioma	158
- ii. 5 Consideraciones finales	159
- Conclusiones generales y perspectivas	163
- Bibliografía	168

RESUMEN

MARCKS (Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate) es una proteína naturalmente desplegada que regula la migración celular, la adhesión al sustrato, endocitosis y exocitosis. Tiene diversos roles en el sistema nervioso embrionario y adulto entre los que se pueden citar el cierre del tubo neural, la laminación de la corteza cerebral y la retina, la migración de progenitores, el crecimiento neurítico, el desarrollo de espinas dendríticas y la liberación de neurotransmisores. Esta proteína es blanco de fosforilaciones por PKC (proteína quinasa C) en una región denominada dominio efector (ED) y es capaz de interactuar con CaCAM (calcio calmodulina), los fosfolípidos ácidos de membrana y los filamentos de actina, modulando la dinámica del citoesqueleto en diversos procesos celulares. A pesar de ser ubicua, en los ratones *knock-out* para MARCKS solo se han encontrado defectos importantes durante el desarrollo del sistema nervioso. Sin embargo, aún no se conoce cómo se regula la funcionalidad de MARCKS, en particular en el sistema nervioso. Previamente nuestro grupo de trabajo describió la existencia de una variante fosforilada en la serina 25 de MARCKS (S25p-MARCKS) que solo aparece durante la diferenciación neuronal y es regulada durante el desarrollo. Esta es, hasta donde conocemos, la única modificación postraduccional tejida específica descrita hasta el momento.

En este trabajo determinamos que la quinasa responsable de esta fosforilación en la S25 de MARCKS en neuroblastos retinianos es Cdk5, una quinasa dependiente de ciclina, que a diferencia de los otros miembros de su familia, es activa en células postmitóticas tales como las neuronas. En la retina neural en desarrollo, MARCKS y Cdk5 se localizan en los mismos territorios y regiones subcelulares, si bien no encontramos colocalización a nivel de los parches de membrana en los que se distribuyen. Es conocido, también por trabajos nuestros, que la fosforilación decae cuando las células de la retina son disgregadas. Aquí demostramos que la fosforilación es estimulada cuando neuroblastos de la retina recientemente disgregados son cultivados sobre laminina, lo que sugiere la activación de alguna cascada de señalización dependiente del sustrato. Sin embargo, cuando los neuroblastos cultivados en sustratos tales como laminina, colágeno, concanavalina A o poliornitina alcanzan un mayor grado de diferenciación *in vitro*, no encontramos cambios en el nivel de fosforilación ni en la distribución de S25p-MARCKS. También IGF-1, pero no NGF, promueve un incremento en la fosforilación de la S25 al inicio de la diferenciación *in vitro*. Esta estimulación solamente tiene lugar en etapas iniciales del cultivo celular y no cuando las neuronas han alcanzado un mayor estado de diferenciación. Además determinamos que esta variante fosforilada de MARCKS es capaz de interactuar con CaCAM, actina, drebrina, espectrina y tenascina, si bien nuevos estudios son necesarios para confirmar dichas interacciones y determinar su relevancia fisiológica.

Se ha determinado, por muchos grupos de investigación, que MARCKS es blanco de varias quinasas entre las que se encuentran PKC, MAPK, Rho y Cdks. Las distintas fosforilaciones pueden coexistir en la molécula, lo que otorga una gran diversidad en cuanto a las posibilidades de regulación. Una de las novedades aportadas en este trabajo es que la fosforilación de MARCKS por PKC muestra una exclusión espacial y molecular con la fosforilación en la S25. Aquí presentamos datos que sugieren que este fenómeno sería consecuencia de la activación de PKC, quien determina la fosforilación en el ED de MARCKS y además promueve la activación de la fosfatasa responsable de desfosforilar el residuo de S25. En los neuroblastos retinianos encontramos, a través de experimentos farmacológicos, que mientras que el ED es desfosforilado tanto por PP1, PP2A y PP2B, la S25 solo lo es por PP2A.

Paralelamente evidenciamos en células de la glía de Müller, y en fibroblastos embrionarios, la translocación de MARCKS al citosol, y su asociación parcial con sistemas internos de membrana, consecuentes a la estimulación de PKC. La activación de esta quinasa promueve además profundas remodelaciones en el citoesqueleto de actina, en particular un desensamblaje de los cables de actina y su re-ensamblaje en estructuras altamente dinámicas periféricas, de las que llamativamente MARCKS se encuentra prácticamente excluida.

El conjunto de resultados presentados aquí refuerza la idea de que MARCKS se encuentra en una posición nodal de las vías de señalización intracelular, pudiendo participar y además integrar señales provenientes de diferentes cascadas las que median, en la mayoría de los casos, fosforilaciones de la proteína. Nuestros resultados muestran que la fosforilación de la S25 a cargo de Cdk5 puede ser estimulada por diferentes cascadas de señalización, activadas en la célula a partir de factores de crecimiento o de elementos de la matriz celular. A su vez, demostramos que existe un diálogo entre esta fosforilación y las que tienen lugar en el ED de MARCKS a cargo de PKC. La regulación de los distintos estados fosforilados de esta proteína puede modular directamente eventos celulares como la modificación de estructuras de actina que participan en distintos procesos, o indirectamente a través de la unión con interactores que, a su vez, participen en otros procesos críticos en la diferenciación neuronal.

ABREVIATURAS

Acm 3C3: anticuerpo monoclonal 3C3 que reconoce una región aminoterminal de MARCKS cuando ésta se encuentra fosforilada en la serina 25

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BCA: ácido bicinconínico

BSA: seroalbúmina bovina

CaCAM: calmodulina unida a calcio

Cdk5: quinasa 5 dependiente de ciclina

CMFG: solución buffer salina con glucosa, sin calcio ni magnesio

CNBr: bromuro de cianógeno

DAG: diacilglicerol

DMEM: medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetil sulfóxido

DO: densidad óptica

ED: dominio efector de MARCKS

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EGTA: ácido etilen-glicol-bis (β -aminoetil-eter) tetracético

FAK: quinasa de los contactos focales

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GSK-3 β : quinasa de la glucógeno sintasa

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IGF-1: factor de crecimiento similar a insulina

IgG: inmunoglobulina tipo G

PI₃K: quinasa 3 de fosfatidil inositol

MALDI-TOF: "Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight"

MAP: proteína asociada a microtúbulos

MAPK: quinasa activada por mitógenos

MARCKS: proteína miristilada, rica en alanina, sustrato de PKC

MCt: anticuerpo policlonal de conejo que reconoce el extremo carboxiloterminale de MARCKS

MRP: proteína relacionada con MARCKS

NCAM: molécula de adhesión celular neuronal

NGF: Factor de crecimiento nervioso

PBS: solución salina isotónica con fosfato

PFA: paraformaldehído

PIP₂: fosfatidinositol (4,5) bisfosfato

PKC: proteína quinasa C

PLC: fosfolipasa C

PLD: fosfolipasa D

PMA: forbol 12-miristato, 13-acetato

PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro

PP: fosfatasa de proteínas

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

SFB: suero fetal bovino

TRITC: isotiocianato de tetrametil rodamina

WASP: proteína del síndrome Wiscott-Aldrich

INTRODUCCIÓN

La diferenciación neuronal es un proceso complejo en el que un progenitor indiferenciado es transformado en una célula con las características estructurales y funcionales propias de una neurona adulta. Durante este proceso los progenitores sufren profundos cambios en la organización celular. Uno de los eventos más conspicuos en la diferenciación neuronal tiene lugar cuando los progenitores extienden dos tipos de prolongaciones, las dendritas y un único axón. Estos eventos implican la remodelación del citoesqueleto, el cual aporta un andamio rígido y a la vez dinámico que le permite a la célula adaptarse a distintas condiciones fisiológicas. La regulación fina del citoesqueleto está a cargo de un numeroso grupo de proteínas que participan en diversas cascadas de señalización. De particular interés es la regulación de la dinámica de actina en el intrincado proceso de diferenciación neuronal y ha sido objeto de intenso estudio en los últimos años. MARCKS (Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate) es una de estas proteínas capaces de regular el citoesqueleto de actina. Es una proteína ubicua pero especialmente abundante en el sistema nervioso, en donde juega un papel determinante durante su desarrollo. Hasta el presente, no se ha logrado determinar completamente el conjunto de todos los roles de MARCKS durante los procesos de diferenciación e histogénesis de componentes neurales. Su actividad, localización, e interacción con actina es susceptible de ser regulada por diversas fosforilaciones. Una de estas fosforilaciones (S25p), es particularmente llamativa ya que tiene lugar durante la diferenciación neural, está ausente en otros tejidos y es regulada durante el desarrollo. Desconocemos sin embargo cuál es su rol fisiológico particular. Comprender en mayor detalle algunas de las características o propiedades de MARCKS y sus variantes fosforiladas puede aportar bases sólidas para la dilucidación de su función durante el desarrollo del sistema nervioso. A continuación expondremos algunos antecedentes importantes respecto a la proteína MARCKS, y a su variante fosforilada en la S25, con especial interés en el sistema nervioso.

MARCKS

MARCKS fue identificada por primera vez en 1982 como una proteína de 87kDa fosforilada en sinaptosomas de rata ante la estimulación con calcio (Wu et al., 1982). No fue hasta 1989 que su gen fue clonado en bovinos y la proteína identificada y denominada como la conocemos actualmente (Graff et al., 1989a; Stumpo et al., 1989). MARCKS no posee actividad enzimática, pero puede modular la actividad de distintas moléculas al interactuar con éstas, afectando su conformación, su localización en la membrana o impidiendo su interacción con otras moléculas (Mosevitsky, 2005). Está presente en distintos tejidos, siendo particularmente abundante en el tejido

nervioso (0,2% de las proteínas totales), especialmente en neuronas y oligodendrocitos (Albert et al., 1987; Ouimet et al., 1990; Bhat et al., 1995). Es una proteína ácida, anfifílica y miristilada, estable al calor, que contiene niveles inusualmente altos de alanina y ácido glutámico, los cuales le confieren una carga neta negativa a pH neutro (Graff et al., 1989b; Stumpo et al., 1989). Esta composición aminoacídica anómala, en donde el 85% de los residuos pertenecen a solamente 6 tipos diferentes de aminoácidos, le otorgan su carga neta negativa, una alta hidrofiliidad y determinan que MARCKS interactúe mal con el SDS (dodecil sulfato de sodio) por lo que su migración electroforética es anómala; su movilidad relativa en SDS-PAGE varía entre 70-75kDa (dependiendo de la concentración de acrilamida) mientras que su masa molecular real es de 27,1kDa en el pollo (Graff et al., 1989a).

Estructura

En su secuencia aminoacídica pueden encontrarse tres regiones altamente conservadas: la región aminoterminal MH1, la región MH2 ubicada en la mitad aminoterminal y el llamado dominio efector (ED) (figura 1). En la región aminoterminal, el primer residuo aminoacídico, la glicina, es miristilada postraduccionalmente por la enzima N-miristoiltransferasa CoA (Aderem et al., 1988a, 1988b; Rosen et al., 1989). Esta miristilación no tiene lugar en todas las moléculas de MARCKS ya que existen moléculas no miristiladas en el cerebro, posiblemente además contribuya a producir esta población la actividad de enzimas demiristilasas. La miristilación no jugaría un rol preponderante en la determinación de la estructura secundaria ni su interacción con otras proteínas (Manenti et al., 1994). En la mitad aminoterminal de MARCKS también se localiza una secuencia de 25 aminoácidos, muy conservada en distintas especies, denominada MH2. La función de este dominio conservado de la proteína no se conoce hasta el momento. De manera interesante, se ha demostrado que el receptor del factor de crecimiento similar a manosa 6 fosfato/glucosa II, presenta una secuencia con alta homología al dominio MH2 y es responsable de su internalización a lisosomas (Ramsden, 2000).

```

1  MGAQFSK TAA KGEAAA EKPG EAVAA SPSKA NGQENGHVKV NGDASPAAAE AGKEEVQANG
61  SAPAEETGKE EAASSE PASE KEAAEAESTE PASPAEGEAS PKTEEGATPS SSSETPKKKK
121 KRFSFKKSFK LSGFSFKKNK KEAGEGAESE GSGAAAAAEG KEEAAAAAPE AAGGEEGKAA
181 AEEASAAAAG SREAAKEEAG DSQEAKSDEA APEKATGEEA PAAEEQQQQQ QQEKAEEEAG
241 AAATSEAGSG EQEAAPAEPE AAARQEAPSE SSPEGPAEPA E

```

Figura 1: Secuencia aminoacídica de MARCKS de pollo (incluyendo la metionina) donde se marcan: en lila el dominio aminoterminal MH1 que contiene la señal de miristilación, en verde el dominio MH2 y en naranja el ED. La flecha negra indica el sitio de empalme del único intrón del gen. Los dos hexapéptidos subrayados en el ED, marcan secuencias de interacción con la actina. En negrita se señalan las serinas fosforilables por PKC del ED. Se resalta la secuencia de internalización a lisosomas en rojo.

La región conservada, sobre la cual se ha centrado la mayor parte de la investigación de esta proteína, es el dominio efector, ED o PSD (Phosphorylation Site Domain). Este dominio de 25 aminoácidos posee 4 serinas susceptibles de ser fosforiladas por PKC (Thelen et al., 1991). En el pollo, en humano y bovinos, las cuatro serinas pueden ser fosforiladas, mientras que en ratones solo la primera, segunda y cuarta (S152, 156 y 163) son fosforilables por PKC clásicas (α , β , γ), noveles (δ , θ , ϵ y η) o atípicas (λ , y ζ) (Taniguchi et al., 1994; Herget et al., 1995; Uberall et al., 1997; Michaut et al., 2005). Se ha determinado que el ED además puede interactuar con calmodulina de manera Ca^{++} dependiente, y dicha interacción es inhibida por la fosforilación de PKC y viceversa (Graff et al., 1989a; Chakravarthy et al., 1995) (figura 2). De esta manera MARCKS es capaz de modular la cantidad de CaCAM libre en el citosol, actuando como secuestrador de dicha molécula; de hecho es uno de los sustratos con mayor afinidad por CaCAM conocidos en la célula (Hartwig et al., 1992; MacNicol y Schulman, 1992; Qin et al., 1996). MARCKS también fue caracterizada por su capacidad de unirse y entrecruzar filamentos de actina (Hartwig et al., 1992). Al menos dos hexapéptidos idénticos localizados en el ED además de los aminoácidos catiónicos, son responsables de interactuar y entrecruzar los filamentos de actina (Yarmola et al., 2001) (figura 1). Dicha capacidad de entrecruzamiento es inhibida a su vez por la fosforilación por PKC o por la interacción con CaCAM. No obstante, MARCKS es capaz de interactuar pero no entrecruzar filamentos de actina en estas condiciones (Aderem, 1992; Taniguchi y Manenti, 1993). Esto se debe a que la fosforilación del ED provocaría un cambio conformacional de esta región particular de la proteína, tornándola más compacta e inhibiendo la interacción de los hexapéptidos con la actina (Yarmola et al., 2001). Todas estas interacciones descritas tienen lugar en la misma región, el ED, por tanto son mutuamente excluyentes.

Por muchos años los análisis bioquímicos y estructurales de interacción entre MARCKS y diferentes ligandos fueron realizados utilizando únicamente el ED, en el entendido de que una proteína sin estructura secundaria regular, no tendría efectos de regulación de regiones alejadas del ED sobre su actividad. Sin embargo, se ha demostrado que la proteína entera recombinante no tiene la misma afinidad de interacción con actina, CaCAM o fosfolípidos ácidos de membrana, que el ED aislado (Tapp et al., 2005). De hecho, estos autores demostraron que modificaciones postraduccionales de la proteína tales como las miristilaciones y proteólisis, y eventualmente fosforilaciones fuera del ED, podrían modular la interacción del ED con ligandos, dado que regulan su accesibilidad, probablemente al impedir interacciones intra-cadena de la proteína (Tapp et al., 2005). Considerando estas evidencias, resulta imprescindible ampliar nuestro conocimiento de los estados fosforilados de MARCKS y su regulación, para acceder a un mayor conocimiento de la funcionalidad de la proteína en células.

MARCKS tiene una asociación dinámica con la membrana plasmática. Esta interacción depende tanto de la inserción del residuo aminoterminal de ácido mirístico, como de la interacción de los aminoácidos básicos del ED con los fosfolípidos con carga negativa de la membrana plasmática (figura 2). Ninguna de dichas interacciones es suficiente por sí misma para determinar la interacción con la membrana (Kim et al., 1998). La fosforilación por PKC y la asociación con CaCAM promueven la disociación de MARCKS de la membrana, por neutralización de las cargas positivas que interactúan con los fosfolípidos ácidos de la membrana plasmática (Swierczynski y Blackshear, 1995). Esta disociación de la membrana es revertida ante el descenso de Ca^{++} en la célula o por la actividad de las fosfatasas PP1, PP2A y PP2B que remueven los fosfatos presentes en el ED (Clarke et al., 1993; Seki et al., 1995; Chen y Rotenberg, 2010). Esta dinámica de asociación y disociación con la membrana se conoce como “switch” electrostático (Taniguchi y Manenti, 1993; Swierczynski y Blackshear, 1995, 1996).

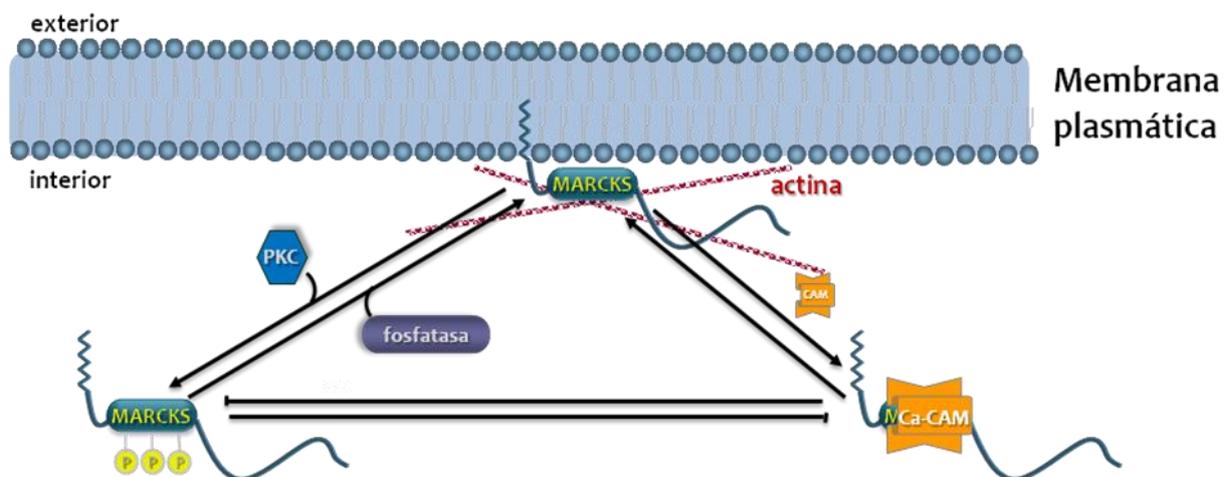


Figura 2: Esquema representando las principales interacciones y cascadas de señalización intracelular de MARCKS y algunas de sus regulaciones. MARCKS se encuentra asociado a la cara interna de la membrana plasmática a través de la inserción de un ácido mirístico y a la interacción de los aminoácidos básicos de su ED con los fosfolípidos ácidos de la membrana. El ED puede interactuar y entrecruzar filamentos de actina. Este dominio también puede ser fosforilado por PKC e interactuar con CaCAM, ambos eventos ocurren de manera excluyente.

MARCKS puede ser clivada por proteasas generando un fragmento de 40kDa que contiene el ED. La proporción de este producto de clivaje respecto a la proteína intacta varía dependiendo del tejido y puede alcanzar valores muy elevados. Por ejemplo, el fragmento representa un 10% de la proteína intacta en cerebro bovino, 50% en el bazo e hígado y el 80% en el riñón (Manenti et al., 1997). La alta proporción que alcanza en algunos tejidos hace sospechar que el fragmento clivado podría presentar algún papel fisiológico aún no identificado en la célula. La cisteína proteasa responsable de esta clivaje es la proteasa lisosomal catepsina B, capaz de clivar a MARCKS en al

menos un sitio en el extremo amino cercano al ED y también dentro del ED. La fosforilación del ED por PKC protege de dicho clivaje (Spizz y Blackshear, 1997). ¿Cómo puede una proteasa lisosomal clivar a MARCKS que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática? Existen varios mecanismos por los cuales proteínas intracelulares pueden ser destinadas a su degradación por el lisosoma. El primero de ellos es su englobamiento en vesículas de membrana derivadas de diferentes compartimientos, formando autofagosomas que luego se fusionaran con los lisosomas para degradar su contenido. El otro mecanismo, es la entrada selectiva de proteínas al lisosoma a través de su interacción con una proteína Hsp y con el receptor lisosomal LAMP2. Para poder interactuar con este receptor la proteína debe presentar la secuencia aminoacídica KEE(L,V)Q (figura 1). Esta secuencia se encuentra presente en la mitad aminoterminal de todas las secuencias de MARCKS conocidas en diferentes especies hasta el momento. Aun no se ha determinado con certeza si esta secuencia efectivamente media la introducción de MARCKS en los lisosomas *in vivo* (Spizz y Blackshear, 1997). Más recientemente se ha encontrado un posible papel fisiológico de este clivaje. La estimulación de cultivos de células del hipocampo con NMDA provoca la pérdida de las espinas dendríticas por un mecanismo mediado por el clivaje de MARCKS por la catepsina B (Graber et al., 2004). En estas células MARCKS es clivada por catepsinas presentes fuera de los lisosomas y podría constituir un mecanismo existente en otros tipos celulares. *In vitro*, se ha demostrado que los fragmentos producto del clivaje de MARCKS por calpaina tienen una mayor capacidad de entrecruzar filamentos de actina, lo que sugiere que tal vez otros clivajes proteolíticos de MARCKS que tienen lugar en la célula puedan tener un rol fisiológico similar (Tapp et al., 2005).

Estructura secundaria: MARCKS es una proteína naturalmente desplegada

Los estudios por difracción circular indican que MARCKS es una proteína que carece de estructura secundaria definida, es decir que pertenece a la familia de proteínas naturalmente desplegadas o “random-coil” (Arbuzova et al., 2002). Dado que ha sido imposible su cristalización y que la proteína entera es muy grande para poder ser analizada por equipos de NMR de la época, el conocimiento acerca de su estructura se obtuvo de estudios parciales de péptidos de distintas regiones de la proteína (Ramsden, 2000). Este grupo de proteínas naturalmente desplegadas comprende una enorme fracción del proteoma de eucariotas. Alrededor del 75% de las moléculas de señalización en mamíferos contienen largas porciones en su secuencia nativamente desplegadas y aproximadamente el 25% de su proteoma está constituido por proteínas naturalmente desplegadas (Uversky, 2010). Estudios genómicos indican que la porción del genoma que codifica para proteínas intrínsecamente desplegadas aumenta con la complejidad de los organismos (Le Gall et al., 2007). Estas proteínas presentan funcionalidad existiendo como estructuras altamente dinámicas que sufren rápidos cambios conformacionales, en

contra de la noción clásica de que las proteínas requieren una estructura globular bien definida para ser funcionales (Johnson et al., 2012). De esta manera, las proteínas naturalmente desplegadas existen no como una estructura única, sino como un ensamble conformacional cuyos miembros se interconvierten de manera estocástica a lo largo del tiempo (Dunker y Gough, 2011; Uversky y Dunker, 2012).

El término “proteína naturalmente o intrínsecamente desplegada” se utiliza para referirse a proteínas que en su estado purificado, a pH neutro han demostrado no tener, ya sea experimentalmente o por predicciones, estructura secundaria ordenada (Fink, 2005). En este sentido se clasifican en dos grupos: aquellas que son completamente desplegadas, como es el caso de MARCKS, y aquellas que tienen dominios extensos desordenados (>30-40 residuos).

Por mucho tiempo se cuestionó la relevancia fisiológica de estas proteínas, enfrentando el debate sobre si constituían elementos patológicos o se encontraban dentro de la fisiología normal de las células. De hecho estas proteínas son más maleables, lo cual les otorga ventajas en cuanto a sus posibilidades de regulación e interacción con diversos ligandos, en comparación con las proteínas con estructura secundaria definida (Fink, 2005). Presentan grandes interfaces moleculares lo cual les permite tener numerosos ligandos, pero con tamaños génicos y proteicos pequeños, lo que además constituye una ventaja evolutiva. Por ejemplo, el dominio carboxilo terminal de p53, el cual presenta una estructura naturalmente desplegada, es capaz de interactuar con al menos 45 proteínas diferentes, participando en distintas funciones en cada caso (Hsu et al., 2012). Se ha vinculado a estas proteínas con procesos que no implican actividad catalítica de su parte, pero sí el reconocimiento de moléculas como otras proteínas, ácidos nucleicos, grupos hemo, lípidos de membrana, iones metálicos, etc., participando de funciones como la regulación del ciclo celular, control transcripcional y traduccional, desarrollo embrionario, ensamblaje de complejos multiproteicos y endocitosis, entre otros (Vucetic et al., 2003; Uversky y Dunker, 2012).

Como fuera descrito para MARCKS, las proteínas naturalmente desplegadas se caracterizan por poseer una combinación única de baja hidrofobicidad general (baja fuerza inductora de la compactación de la proteína), y alta carga neta (fuerte repulsión electrostática), lo cual determina su conformación extendida (Ramsden, 2000; Arbuzova et al., 2002; Uversky y Dunker, 2012). Típicamente las regiones desordenadas de las proteínas se identifican por su baja complejidad de secuencia, alta flexibilidad y sesgo en la composición de aminoácidos: alto contenido de aminoácidos como ácido glutámico, lisina, arginina, glutamina, serina y prolina, y bajo contenido en isoleucina, leucina, valina, triptófano, fenilalanina, cisteína, tirosina y asparagina (hay solamente una valina y una asparagina en MARCKS de pollo) (Romero et al., 2004). Estas características compartidas permiten la identificación de dominios desordenados mediante el uso de programas informáticos de predicción de desorden.

Como puede verse en la figura 3, la aplicación uno de estos programas (PREDICTOR-FIT) (Xue et al., 2010), permite predecir que MARCKS presenta una estructura totalmente desplegada, con sitios como el ED con menos desorden (en torno al aminoácido 120), pero sin alcanzar valores propios de proteínas con estructura secundaria ordenada como por ejemplo la actina (figura 3B).

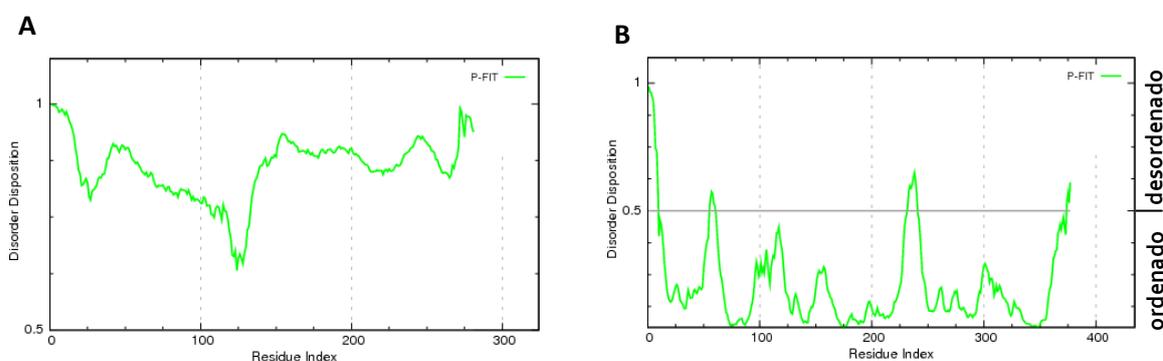


Figura 3: Gráficos de predicción de desorden utilizando el programa PONDR-FIT (Predictor of Natural Disorder Regions) (Xue et al., 2010) para MARCKS (A) y actina (B) de pollo (*Gallus gallus*). En el eje de las x se grafican las posiciones de los aminoácidos de cada proteína (Residue index) y en el de las y la probabilidad de desorden (Disorder disposition) siendo los valores comprendidos entre 0-0,5 indicadores de estructura ordenada y entre 0,5-1 de desorden. Obsérvese que el eje de las y en la gráfica A comienza en el valor de 0,5, es decir que todo el campo corresponde a la estructura desordenada.

Otra característica de estas proteínas es su resistencia a la precipitación por ácido perclórico o tricloroacético, además son resistentes a la agregación por temperatura, las cuales constituyen características muy útiles para su purificación (Uversky, 2010; Uversky y Dunker, 2010). Los cambios conformacionales provocados en estas proteínas por altas temperaturas son completamente reversibles. En cambio, las proteínas con estructura secundaria regular, sufren cambios estructurales frente a temperatura y pH extremos por la protonación de aminoácidos cargados negativamente, lo que determina su desplegamiento y desnaturalización de manera irreversible. De hecho, los cambios de temperatura o pH pueden inducir en las proteínas naturalmente desplegadas un plegamiento parcial ya que disminuyen la repulsión electrostática de los residuos de aminoácidos cargados (Uversky, 2002).

Se postula que es un evento común que las proteínas naturalmente desplegadas presenten algún tipo de plegamiento luego de unirse al interactivo correcto, incluso en algunos casos el desorden es utilizado para prevenir el ensamblaje espontáneo en lugares o momentos inapropiados. De hecho, se ha postulado que el ED de MARCKS adoptaría un estructura tipo α -helice, como lo muestra la figura 3, aunque los resultados de difracción circular son aun contradictorios (Porumb et al., 1997; Yamauchi et al., 2003).

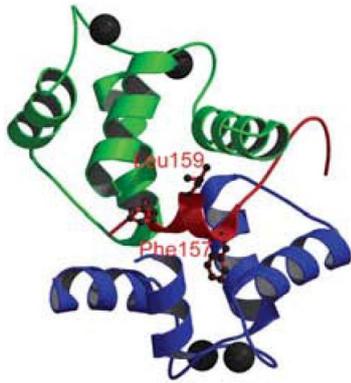


Figura 4: Estructura 3D de una porción de la secuencia aminoacídica de MARCKS unida a CaCAM. En verde y azul se muestra la estructura de la calmodulina y las esferas negras marcan la unión de los iones Ca^{++} . La porción de MARCKS unida a CaCAM se muestra en rojo con los aminoácidos con residuos hidrofóbicos señalados con diagramas de círculos y líneas (Leu 159 y Phe 157 del DE). Puede observarse la conformación en hélice del dominio de MARCKS que interactúa con CaCAM. Tomado de Yamauchi et al., 2003.

Por otro lado, la fosforilación reversible de proteínas constituye un mecanismo importantísimo para la regulación de la actividad proteica en células eucariotas. La composición aminoacídica y la complejidad de secuencia, hidrofobicidad, carga, entre otros atributos de las regiones adyacentes a los sitios de fosforilación, son extremadamente similares a las características de las regiones intrínsecamente desordenadas de algunas proteínas. Por ello se ha propuesto que los sitios de fosforilación de las proteínas se localizan en regiones intrínsecamente desordenadas de las mismas (Vucetic et al., 2007).

Estas proteínas han sido relacionadas con un número importante de patologías humanas como enfermedades cardíacas, autoinmunes, neurodegenerativas, amiloidosis, etc, lo cual la ha tornado un blanco recurrente en el desarrollo de terapias (Uversky y Dunker, 2012).

Emplazamiento subcelular

MARCKS tiene una distribución principalmente periférica en aposición a la membrana plasmática, aunque también se encuentra una fracción de la proteína en el citosol de la célula frente a distintas situaciones fisiológicas (Arbuzova et al., 2002; Scarlett y Blackshear, 2003). Una fracción importante del pool de proteínas MARCKS de la célula se encuentra desmiristolada, lo cual obliga a la proteína a translocarse en el citosol. La proporción de proteína demiristolada varía dependiendo del tipo celular (Aderem et al., 1988b; Graff et al., 1989a; Taniguchi y Manenti, 1993). Estudios de inmunolocalización y microscopía electrónica demostraron que MARCKS se localiza en puntos subplasmalemales, donde los filamentos de actina contactan con la membrana plasmática (Thelen et al., 1991). También se localiza en los sinaptosomas y es fosforilada cuando se produce la despolarización de los mismos (Wu et al., 1982). Cuando MARCKS es fosforilada en células como consecuencia de la estimulación de

PKC con ésteres de forbol, transloca de manera reversible hacia el citoplasma (Rosen et al., 1989; Thelen et al., 1991), y además se asocia con lisosomas en fibroblastos embrionarios de ratón (Allen y Aderem, 1995a). También se ha demostrado la fosforilación de MARCKS y su translocación a los fagosomas en macrófagos donde permanecen asociados a éste hasta que se fusiona con un lisosoma (Allen y Aderem, 1995b).

Rol funcional

Entre las primeras evidencias que indicaban la relevancia de MARCKS en el sistema nervioso, se encontraba su alto nivel de expresión en el cerebro y la médula espinal en adultos (12 μ M en cerebro bovino), y su presencia en altos niveles en el sistema nervioso embrionario. En el cerebro, el ARNm de MARCKS está enriquecido en la corteza piriforme y entorinal del complejo de la amígdala, el núcleo talámico intralaminar, el hipotálamo, el hipocampo, el núcleo del tracto solitario, núcleo ambiguo y varios núcleos catecolaminérgicos y serotoninérgicos (Ouimet et al., 1990). En el cerebro de monos adultos la cantidad de MARCKS es mucho menor que durante el período embrionario, y se concentra específicamente en regiones con alta plasticidad, como las áreas de asociación del neocórtex, el hipocampo y el cerebelo (Higo et al., 2002, 2003, 2004). Sin embargo, no fue hasta la generación de ratones *knock-out* para MARCKS que se demostró su real importancia en el proceso de desarrollo del sistema nervioso (Stumpo et al., 1995). Los ratones homocigotas mutantes presentaron una diversidad de fenotipos que iban desde una alta tasa de muerte prenatal y perinatal (75% de los ratones murieron), anencefalia (ausencia de estructuras cerebrales, hueso y piel del cráneo) y onfalocelo (protrusión de órganos fuera de la cavidad abdominal) hasta una curvatura anómala en el eje céfalo-caudal de los animales. La ausencia de estructuras craneanas ha sido relacionada con defectos en la neurulación, es decir la transformación de la placa neural plana en una estructura curva, el surco neural, y la posterior fusión de sus pliegues y cierre del tubo, lo que da origen al tubo neural, quien, en última instancia dará lugar al cerebro y la médula espinal. Por su lado, el análisis histológico de los cerebros de los ratones mutantes mostró que existe una reducción del tamaño del cerebro, un incremento del volumen ventricular, así como defectos en las comisuras intercerebrales. Además estos ratones mostraron defectos en la laminación de la corteza cerebral y la retina. En la retina se encontró ausencia de la capa transitoria de Chievitz (Stumpo et al., 1995). Los ratones heterocigotas por su parte, si bien no presentan deficiencias anatómicas ostensibles, tienen defectos en el aprendizaje espacial (McNamara et al., 1998).

Los defectos provocados por la delección del gen de MARCKS son revertidos en ratones transgénicos que expresan la variante humana completa de MARCKS. Por su parte el rescate con la variante completa de MARCKS humana pero no miristilable, la cual presenta menos afinidad por la membrana plasmática, no revierte la muerte

perinatal (75%) pero sí la mayoría de los defectos del desarrollo del sistema nervioso (25% de los animales sobreviven y no tienen defectos) (Swierczynski y Blackshear, 1996). Sorpresivamente, la variante no miristilable y seudofosforilada (mutación de las cuatro serinas del ED por ácido aspártico) que presenta una afinidad muy reducida por la membrana plasmática, revierte todos los defectos de los ratones *knock-out* aunque no aumenta la sobrevivencia de los mismos. Además en estos ratones aparece un nuevo defecto, la presencia de retina ectópica en el cuerpo vítreo del ojo (Kim et al., 1998). Por otra parte, la complementación de los ratones *knock-out*, con una variante de MARCKS no fosforilable (serinas del ED sustituidas por asparaginas) revierte todos los defectos del desarrollo del sistema nervioso aunque no mejora la sobrevivencia de los ratones (Scarlett y Blackshear, 2003). Estos resultados están indicando que a pesar de ser conocida como el principal sustrato de PKC, la fosforilación de MARCKS en el ED no sería necesaria para algunas de las funciones que cumple MARCKS en el sistema nervioso. Sin embargo, hasta ese momento no era claro el mecanismo por el cual MARCKS ejercía estos efectos durante el desarrollo del sistema nervioso. Más recientemente, el mismo grupo demostró que los ratones *knock-out* presentaban un andamiaje aberrante de glía radial, con una localización anómala de determinantes de la polaridad neuronal tales como el complejo α PKC ζ , PAR3, CDC42, β -catenina, prominina, N-cadherina y la miosina IIB (Weimer et al., 2009). Resultó interesante que estos defectos fueron revertidos por la expresión de una variante de MARCKS no fosforilable en el ED, sugiriendo que la fosforilación por PKC es prescindible en esta función de MARCKS, pero no fue revertida por la variante mutante carente de la miristilación, fundamental para la correcta inserción de MARCKS en la membrana (Weimer et al., 2009).

Si bien hasta ahora solo mencionamos la vinculación de MARCKS con fenómenos tempranos del desarrollo nervioso como la proliferación y migración de progenitores, también se demostró su participación durante la diferenciación neuronal y al crecimiento neurítico. Las neuronas presentan las morfologías más variadas y complejas entre los diferentes tipos celulares de los metazoarios. La adquisición de esta morfología durante la diferenciación neuronal se caracteriza por la extensión de neuritas. Estos eventos de cambio de la forma celular y crecimiento neurítico son fundamentales para el correcto funcionamiento de las neuronas. Igualmente importante es la habilidad de modular la morfología en respuesta a cambios en el ambiente celular, estímulos y presiones a los que es sometida la célula (Lecuit y Lenne, 2007). El citoesqueleto es primordial en todas estas funciones, aportando un andamio rígido y a la vez dinámico que le permite a la célula adaptarse a los requerimientos fisiológicos. En particular, la regulación del citoesqueleto de actina está relacionada con algunas de estas actividades celulares básicas como la migración, los contactos célula-célula y célula-sustrato, exo y endocitosis, cambios de forma celular entre otros, todos vinculados con el complejo proceso de diferenciación neuronal y crecimiento neurítico. Los filamentos en el interior de la célula se organizan en estructuras de mayor jerarquía tales como haces, redes o estructuras contráctiles, gracias a interacciones entre filamentos mediadas por una gran

familia de proteínas. La regulación fina de la organización en estas estructuras de mayor complejidad que el filamento, es crítica para el crecimiento y navegación del cono de crecimiento axónico durante el desarrollo del sistema nervioso, fenómeno que subyace a la formación de conexiones sinápticas (Wiederkehr et al., 1997). La sobreexpresión de MARCKS, en neuronas en cultivo, no afecta el número de axones pero aumenta la cantidad y el largo de las dendritas. En la misma línea celular, la sobreexpresión de MARCKS en donde las cuatro serinas fosforilables por PKC fueron sustituidas por asparagina (no fosforilable), también provocó un incremento en la arborización dendrítica, ya que esta variante promueve la asociación estrecha de MARCKS con la membrana. A la inversa, la inhibición de su expresión con shARN o la expresión de una variante no fosforilable o hiperfosforilada, disminuye significativamente el número de dendritas (Hartwig et al., 1992; Swierczynski y Blackshear, 1996; Li et al., 2008). En células de la línea SH-SY5Y la estimulación con IGF-1 promueve el crecimiento neurítico a través de una vía que involucra la translocación de MARCKS a la membrana plasmática, su interacción con PIP₂ y la concentración de actina en el lamelipodio que inicia el crecimiento neurítico (Shiraishi et al., 2006; Yamaguchi et al., 2009). Estos resultados aportan nuevas evidencias acerca de la estrecha vinculación entre MARCKS y el crecimiento neurítico, probablemente a través de su capacidad de regulación del citoesqueleto de actina mediado por PIP₂, como se verá más adelante. Por otro lado, luego de iniciado el crecimiento neurítico, es importante su crecimiento por las vías o caminos correctos y el establecimiento de contactos con los blancos adecuados. En este fenómeno de guía de crecimiento axónico, MARCKS también participa en la respuesta de los conos de crecimiento axónico a señales repulsivas como la semaforina 3A. La translocación de MARCKS de la membrana, consecuente a su fosforilación en el ED por PKC, es necesaria para la separación del cono de crecimiento axónico del sustrato y la reestructuración del citoesqueleto de actina en la respuesta de repulsión (Gatlin et al., 2006). En neuronas en donde ya se ha establecido el árbol dendrítico, un elemento muy importante en el desarrollo tiene lugar a continuación y concierne al crecimiento de las espinas dendríticas, regiones privilegiadas de contacto sináptico. La inhibición de la expresión de MARCKS mediante ARNi determina un descenso en la densidad, así como en el largo y ancho de las espinas dendríticas (Calabrese y Halpain, 2005). Asimismo, la expresión de MARCKS salvaje o de una variante no fosforilable en el ED determina una reducción del número de espinas dendríticas, así como un aumento en el largo y reducción de su ancho (Calabrese y Halpain, 2005).

Hasta el momento se cree que todas las funciones de MARCKS en el sistema nervioso, tanto en el desarrollo temprano como en los procesos de diferenciación y plasticidad, están vinculados a su capacidad de regular la dinámica de actina. De hecho, los defectos en la neurulación producto de la delección del gen *marcs* pueden ser comparables al resultado de tratar embriones con citocalasina D, en los cuales la elevación de la placa neural o el plegamiento en la línea media no se ven afectados, pero sí la formación de las bisagras laterales y la fusión de los pliegues neurales (Schoenwolf et al., 1988). Estos resultados indicarían que MARCKS es necesaria para los

cambios de forma celular que deben tener lugar en la placa neural durante la neurulación, cambios en los cuales es crítica la dinámica del citoesqueleto de actina. MARCKS exhibe una acumulación transitoria en la región apical de la placa neural durante el proceso de cierre de la misma. Cuando los pliegues neurales se elevan MARCKS sufre una translocación al borde apical de ectodermo neural, concentrándose en la zona del cinturón apical de actina (Zolessi y Arruti, 2001a).

Como mencionáramos en la sección anterior, la regulación de la dinámica de actina a cargo de MARCKS tiene lugar tanto a través de su capacidad de unir y entrecruzar actina filamentosa directamente, así como también a través del secuestro del segundo mensajero lipídico PIP₂. La interacción del ED de MARCKS con los fosfolípidos ácidos de la membrana como el PIP₂ tiene lugar principalmente mediante fuerzas atractivas de Coulomb y en menor medida mediante repulsiones electrostáticas de Born entre los residuos básicos de la proteína y los lípidos con bajo punto dieléctrico. Además existen interacciones hidrofóbicas de los residuos de fenilalanina del ED con la membrana (Yang y Glaser, 1996). Esta interacción se rompe en respuesta a la asociación de MARCKS con CaCAM o a su fosforilación por PKC. En este sentido, se ha propuesto a MARCKS como uno de los principales factores secuestradores de PIP₂ y por tanto promotores del ensamblaje de actina a nivel de la membrana. PIP₂ constituye entre el 1-5% de los lípidos de membrana y la regulación de su función se da por modulación del acceso de componentes celulares a este lípido. Esto tiene lugar tanto a través de la síntesis local como por secuestro reversible del mismo (Arbuzova et al., 2002). Una liberación rápida de PIP₂ por la translocación de MARCKS al citosol, determina un pico de los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG), e inositol-trifosfato IP₃, al hidrolizarse el PIP₂ por la fosfolipasa C (PLC) (Yang y Glaser, 1996). Por otro lado, la interacción de MARCKS con PIP₂ impide el acceso de la quinasa de fosfatidil inositol IP₃K, la cual convierte a PIP₂ en PIP₃, capaz de reclutar a Akt y modular de esta manera la migración e invasión celular, angiogénesis y proliferación (Jarboe et al., 2012). Además se ha propuesto una hipótesis alternativa basándose en la actividad sinérgica de MARCKS y PIP₂ en cuanto a la regulación de la actina. MARCKS se une a la actina y genera puentes cruzados de la misma, propiciando además su interacción con la membrana. Por otro lado, la interacción de MARCKS con PIP₂ tendría aumentaría la concentración local de este lípido de manera que ejerza un rol inhibitorio sobre proteínas como la gelsolina, villina, profilina y cofilina, factores que promueven la despolimerización de actina y su remodelación. De esta manera tanto MARCKS como PIP₂ estarían actuando como estabilizadores del citoesqueleto a nivel cortical (Mosevitsky, 2005). Estas evidencias indican entonces que el rol fisiológico de MARCKS en relación a la modulación de la dinámica de actina, es multifacético y complejo, y probablemente responda a características fisiológicas propias del tipo celular.

A nivel celular, la función de MARCKS no es regulada mayormente por su nivel de expresión como otras proteínas, sino por modificaciones postraduccionales tales como miristilación y fosforilación. De aquí nuestro interés en profundizar en el conocimiento de las fosforilaciones que tienen lugar en esta proteína durante el proceso de desarrollo del sistema nervioso.

Fosforilaciones “convencionales” de MARCKS

Como se menciona más arriba, tres de las cuatro serinas del ED de MARCKS pueden ser fosforiladas por PKC. La activación de PKC representa uno de los ejemplos más conocidos de señales extracelulares que son transducidas a través de componentes de la membrana plasmática para alterar el metabolismo o la dinámica celular. Las proteínas quinasa C constituyen una familia de quinasas de al menos 11 miembros, agrupados en tres sub-familias: PKC clásicas (α , β 1, β 2, γ) las cuales son reguladas por Ca^{++} , diacilglicerol y fosfolípidos, PKC noveles (ϵ , θ , η) que son calcio independientes y PKC atípicas (ν , ι / λ , ζ) independientes del diacilglicerol y esteres de forbol (Fujise et al., 1994). Diferentes cascadas de señales determinan la activación de la PLC la cual genera DAG e IP_3 , este último moviliza los depósitos de calcio de la célula, que entre otras cosas, activan a PKC. Se ha determinado que las PKC convencionales y noveles pero no las atípicas son capaces de fosforilar a MARCKS en el ED (Uberall et al., 1997). Sin embargo, más recientemente se evidenció que además de PKC también Rho-quinasa puede fosforilar al menos una serina del ED (Tatsumi et al., 2005). MARCKS es fosforilada *in vitro* e *in vivo* en neuronas en la serina 159 (en la secuencia de humanos) por RhoA/ROCK al ser activada esta vía por PKC, un sitio conocido por ser blanco de PKC (Nagumo et al., 2001; Ikenoya et al., 2002; Tanabe et al., 2006). Por tanto este sitio es fosforilado tanto directa como indirectamente por PKC. El efecto de estas fosforilaciones en el ED de MARCKS es bien conocido. La fosforilación de una o más serinas del ED determina la translocación de MARCKS al citosol de la célula, y también impide la interacción de dicho dominio con CaCAM y con los filamentos de actina (Arbuzova et al., 2002). Sin embargo, se ha demostrado que lejos de ser las únicas fosforilaciones capaces de modular la actividad de MARCKS, existen otras, menos conocidas, que tienen lugar a lo largo de toda la cadena de MARCKS y no en el ED.

Otras fosforilaciones de la proteína

Taniguchi y cols. encontraron que existen al menos siete serinas fosforilables en MARCKS aislada a partir de cerebro bovino, seis de las cuales -localizadas en el extremo amino-, están seguidas de una prolina, lo cual las convierte en un blanco predilecto de quinasas dirigidas por prolina tales como MAPK y Cdk (figura 5) (Taniguchi et al., 1994). Es interesante destacar que la mitad amino-terminal de la proteína está más conservada entre distintas especies que la mitad carboxilo-terminal. Utilizando la proteína purificada a partir de cerebro de rata se demostró que MARCKS puede ser fosforilada *in vitro* por TPKII (Cdk5) y cdc2 (Cdk1), y que dichas fosforilaciones favorecen la interacción de MARCKS con CaCAM (Yamamoto et al., 1995). Poco tiempo después, Manenti y cols encontraron que MARCKS es fosforilada por Cdk1, 2 y 4 *in vitro* (Manenti et al., 1999). Resulta de particular interés el hecho de que una de estas quinasas, Cdk5, cumple un rol fundamental, al igual que MARCKS, durante el desarrollo del sistema nervioso. A diferencia de las otras moléculas de la familia de las quinasas dependientes de ciclina, Cdk5 no tiene ningún papel en la progresión del ciclo celular, sino que bloquea el ciclo celular en las neuronas postmitóticas (Laloti et al., 2010). Cdk5 participa en los procesos de migración neuronal, desarrollo y actividad sináptica, y también se la ha relacionado con la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas. En particular se la ha implicado en procesos de regulación del citoesqueleto, crecimiento neurítico, guía del crecimiento axónico y transporte de membrana (Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008). Por tanto es importante explorar los posibles roles *in vivo* de la/s fosforilaciones de MARCKS producidas por Cdk5, durante el desarrollo del sistema nervioso.

Además de las fosforilaciones antes mencionadas, en neuronas del hipocampo, la estimulación con glutamato promueve la fosforilación transitoria de MARCKS por PKC y una fosforilación más sostenida en el tiempo por MAPK. Esta fosforilación es capaz de modular la interacción de MARCKS con actina, si bien no modifica su interacción con CaCAM (Ohmitsu et al., 1999). Esta constituye unas de las pocas evidencias existentes en el presente acerca de cómo una modificación postraduccional fuera del ED repercute en sus propiedades fisiológicas de esta proteína.

Por otro lado el dominio carboxilo terminal de la proteína es la región que presenta menor conservación en su secuencia. Sin embargo los últimos 15 aminoácidos presentan un mayor grado de conservación y poseen al menos dos serinas seguidas de prolina que se han encontrado fosforiladas en tejidos de rata (figura 5) (Yamauchi et al., 1998). Es sorprendente cómo una proteína relativamente pequeña como MARCKS presenta al menos 10 serinas a lo largo de toda su secuencia capaces de ser fosforiladas, individualmente o combinadas, resultando en múltiples posibilidades de regulación postraduccional.

Gallus gallus

```
1 MGAQFSKTAA KGEAAAEKPG EAVAASPSKA NGQENGHVKV NGDASPAAAE AGKEEVQANG
61 SAPAEETGKE EAASSEPAE KEAAEAESTE PASPAEGEASSPKTEEGATTPS SSSETPKKKK
121 KRFSFKKSFKLSGFSFKKNKEFAGEGAESE GSGAAAAAEG KEEAAAAAPE AAGGEEGKAA
181 AEEASAAAAG SREAAKEEAG DSQEAKSDEA APEKATGEEA PAAEEQQQQQ QQEKAAEEAG
241 AAATSEAGSG EQEAAPAEFP AAARQEAPSE SSPEGPAEPA E
```

Bos taurus

```
1 MGAQFSKTAA KGEATAERPG EAAVASSPSK ANGQENGHVK VNGDASPAAA EPGAKEELQA
61 NGSAPAADKE EPAAAGSGAA SPAAAEKDEP AAAAPDAGASSFVEKEAPVEG EAAEPGSPTA
121 AEGEAASAAS STSSPKAEDG ATPSPSNETP KKKKKRFSFK KSFKLSGFSF KKNKKEAGEG
181 GEAEAGAAS AEGGKDEASG GAAAAAGEAG AAPGEPTAAP GEEAAAGEEG AAGGDPQEAQ
241 PEEAAVAPEK PPASEEAKAV EEPKAEKA EEAGVSAAGC EAPSAAGPGV PPEQEAAAPAE
301 EAAAPASSA CAAPSQEAQP ECSPEAPPAAE AAE
```

Mus musculus

```
1 MGAQFSKTAA KGEATAERPG EAAVASSPSK ANGQENGHVK VNGDASPAAA EPGAKEELQA
61 NGSAPAADKE EPASGSAATP AAEKDEAAA ATEPGAGAAD KEAAEAEPAE PSSPAAEAEG
121 ASASSTSSPK AEDGAASPS SETPKKKKKR FSFKKSFKLS GFSFKKSKKE SGEGAEAEGA
181 TAEGAKDEAA AAAGGEGAAA PGEQAGGAGA EGAAGGEPRE AEAEPEQPE QPEQPAAEEP
241 QAEEQSEAAG EKAEEPAPGA TAGDASSAAG PEQEAPAATD EAAASAAPAA SPEPQPECSP
301 EAPPAPTAE
```

Figura 5: Secuencias proteicas de MARCKS en pollo, vaca y ratón. En ellas se indica en naranja el dominio efector de alta homología entre las especies presentadas, en verde las serinas seguidas de prolina y en celeste las treoninas identificadas como posibles blancos de fosforilaciones por quinasas dirigidas por prolina (Taniguchi et al., 1994; Yamauchi et al., 1998; Manenti et al., 1999).

S25p-MARCKS en la diferenciación neuronal en la retina

La búsqueda de marcadores de diferenciación en la retina neural permitió la generación de un panel de anticuerpos monoclonales en nuestro laboratorio, obtenidos a partir de la inmunización de ratones con retina embrionaria de pollo (Zolessi, 1997). Uno de estos anticuerpos, 3C3 resultó sumamente interesante ya que identificó un antígeno exclusivo de neuroblastos en diferenciación y neuronas jóvenes en la retina (Zolessi et al., 1998; Zolessi y Arruti, 2001b). Utilizando espectrometría de masa MALDI-TOF se identificó que la proteína reconocida por dicho anticuerpo es MARCKS (Zolessi et al., 1999; Zolessi et al., 2004). El anticuerpo presenta la particularidad de reconocer exclusivamente a la proteína cuando esta se encuentra fosforilada en la serina 25, tal como fue demostrado muy tempranamente con péptidos sintéticos fosforilados y no fosforilados, así como con los ensayos de desfosforilación de MARCKS con fosfatasa alcalina sobre nitrocelulosa (Zolessi y Arruti, 2001). La

localización de esta variante fosforilada presenta variaciones que se acompañan con los principales eventos de neurogénesis en la retina, lo que sugiere su participación en este proceso histogénético (Zolessi y Arruti, 2001, 2004). Con el objetivo de enfatizar la distribución particular de esta variante fosforilada durante la diferenciación neuronal en la retina, mencionaremos a continuación los principales eventos que tienen lugar en la histogénesis de la retina.

Históricamente la retina ha sido considerada un órgano muy importante para el estudio del sistema nervioso en vertebrados. En particular la retina embrionaria de pollo ha sido utilizada en diversos estudios dada su extrema versatilidad (Snow y Robson, 1994). Una vez finalizada su histogénesis la retina estará constituida por siete tipos principales de células, seis neuronales y uno glial. Una de las características más llamativas de la retina es su organización en capas bien distinguibles, en las que se encuentran cuerpos celulares en unas, y proyecciones dendríticas y axónicas de las células en otras. Desde el interior del ojo hacia afuera encontramos: 1) membrana limitante interna (membrana basal), 2) la capa de fibras del nervio óptico que contiene los axones de proyección de las células ganglionares, 3) la capa de células ganglionares, donde se localizan los somas de las células ganglionares, 4) la capa plexiforme interna en donde encontramos las dendritas de las células ganglionares y los axones de las neuronas bipolares así como las dendritas de las neuronas amacrinas, 5) la capa nuclear interna, donde se localizan los cuerpos de las neuronas bipolares, amacrinas y horizontales, 6) la capa plexiforme externa, donde se encuentran las dendritas de las neuronas bipolares y las prolongaciones de las células horizontales y fotorreceptores, 7) la capa nuclear externa en donde se localizan los cuerpos de las células fotorreceptores: conos y bastones, y 8) la capa de fotorreceptores, donde están los segmentos internos y externos de estas células (figura 6) (Weiss, 1988).

La formación de la retina comienza cuando las paredes laterales del diencefalo protruyen lateralmente en etapas tempranas del desarrollo, formando primero las vesículas ópticas. Estas entran en contacto con el ectodermo suprayacente que luego constituirá la placoda cristalínea. La subsecuente invaginación de las vesículas ópticas dará lugar a la copa óptica en la cual dos capas paralelas del neuroepitelio son fácilmente distinguibles y darán lugar al epitelio pigmentario prospectivo (capa externa) y la retina neural (capa interna) (Mey y Thanos, 2000).

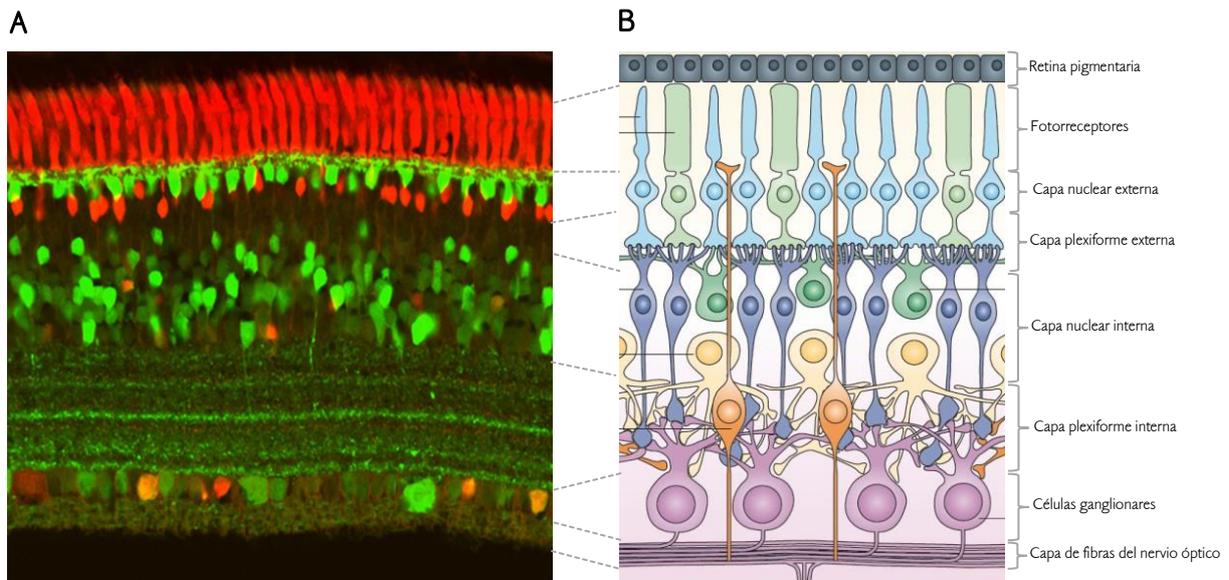


Figura 6: Histología de la retina de un embrión de pollo. **(A)** Criosección de retina de embrión de pollo adulto donde se marcan con sondas fluorescentes distintos tipos celulares. Foto tomada de www.retinalmicroscopy.com, Dr. Nicolás Cuenca, Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante, España. **(B)** Esquema de la estructura retiniana de vertebrado. Desde adentro hacia afuera se distinguen la capa de fibras del nervio óptico, capa de células ganglionares (en violeta), capa plexiforme interna, capa nuclear interna (glía de Müller en naranja, bipolares en azul, amacrinas en rosado, horizontales en verde), capa plexiforme externa, capa nuclear externa (conos en verde, bastones en celeste), fotorreceptores y epitelio pigmentario de la retina. Tomado con modificaciones de Tanaka y Ferretti, 2009.

El desarrollo de la retina en los vertebrados es un proceso conservado y sigue un orden temporal establecido. La capa interna de la copa óptica, está constituida por células neuroepiteliales en activa proliferación y dada la asincronía de sus divisiones generan un epitelio pseudoestratificado. La posición de los cuerpos celulares de los progenitores varía dependiendo de la etapa del ciclo celular en la que se encuentren, mientras que en fase S se localizan cerca del borde vítreo del neuroepitelio, durante la mitosis se localizan cerca del borde ventricular, que limita con la retina pigmentaria. Luego de experimentar varias divisiones, las células progenitoras culminan su proliferación, y se diferencian en neuronas o glía. Luego de sufrir la mitosis terminal, los cuerpos celulares migran hacia el borde vítreo donde comienzan su diferenciación, no necesariamente de manera inmediata a su nacimiento (Mey y Thanos, 2000). Estudios clásicos con marcadores radiactivos como la timidina-³H y autoradiografía permitieron identificar que existe un curso temporal específico de generación de los diferentes tipos celulares retinianos (figura 7). En particular en las aves, en la región central de la retina, las primeras neuronas en nacer y comenzar a diferenciarse son las células ganglionares, seguidas por las células amacrinas, horizontales, fotorreceptores, glía de Müller y bipolares (Prada et al., 1991). Los momentos del nacimiento de estos tipos celulares se solapan, sin existir un estadio que se caracterice por el nacimiento de un único tipo celular (Mey y Thanos, 2000). En el E8 ya han nacido la mayor parte de las neuronas, si bien no todas han comenzado su

diferenciación. El desarrollo procede de manera centrífuga iniciándose en la región fúndica y extendiéndose hacia la región anterior del ojo (Mey y Thanos, 2000) .

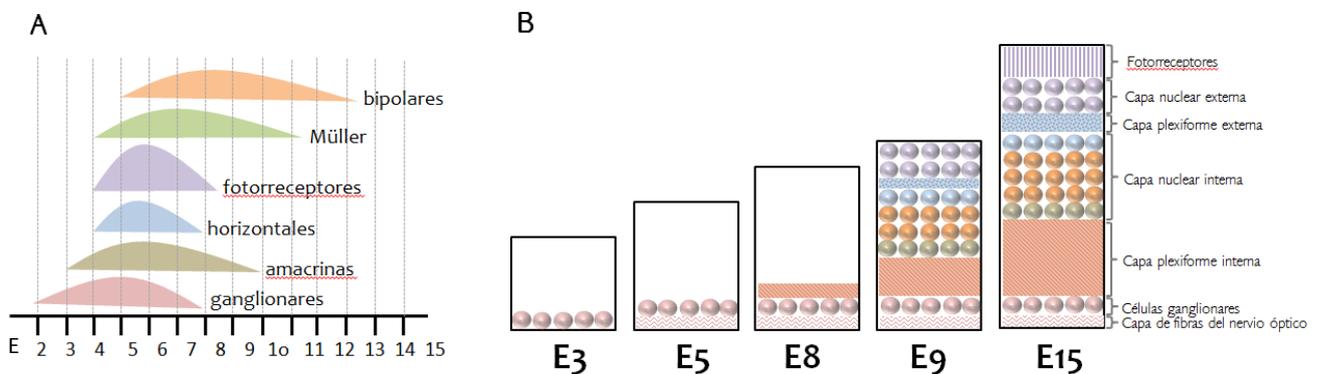


Figura 7: Nacimiento de los distintos tipos celulares en la retina de pollo y formación de estratos. **(A)** En el eje de las x se detallan los días de desarrollo de un embrión de pollo (desde E2 a E14). Las curvas en color indican los períodos de tiempo en los cuales tiene lugar el nacimiento de los distintos tipos celulares en la retina. Tomado y modificado de Prada et al., 1991. **(B)** Aparición de los distintos estratos de la retina del embrión de pollo desde E3 a E15. En E3 aparecen las primeras células ganglionares en el borde vítreo de la región fúndica de la retina. En E5 aparece la capa de fibras del nervio óptico (FNO). En E8 aparece la capa plexiforme interna (PI). En E9 ya son visibles las capas nuclear interna (NE), plexiforme externa (PE) y algunos fotorreceptores cuyos somas constituyen la capa nuclear externa (NE). En E15 se han desarrollado los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (F). Tomado y modificado de Arruti y Zolessi, 1999.

En este proceso histogénético MARCKS se encuentra presente en grandes cantidades, no solamente en el tejido retiniano, sino también en otros tejidos. A pesar de la ubicuidad de la proteína, la fosforilación de la S25 solo tiene lugar en las neuronas que han nacido y comienzan el proceso diferenciación en E4, comenzando en el borde vítreo de la región fúndica de la retina, y extendiéndose hacia la periferia y las capas más externas del neuroepitelio. Más adelante, cuando comienzan a desarrollarse la capa de fibras del nervio óptico y la plexiforme interna (E8), la fosforilación de MARCKS en la S25 se localiza también en estas capas y sigue ausente de las células neuroepiteliales, aún activas en su ciclo celular (Zolessi y Arruti, 2001, 2004).

En retinas de embriones de E12 es abundante en todas las capas, especialmente en la capa de fibras del nervio óptico y capa de fotorreceptores. Sin embargo, luego de la eclosión, cuando la retina es funcional, existen enormes cambios en la presencia de esta variante fosforilada, en particular hay un descenso general en la fosforilación y solamente se conserva en las células ganglionares y en la capa plexiforme interna, al tiempo que los fotorreceptores aparecen completamente negativos (Zolessi et al., 1999). Estos cambios en el patrón de

fosforilación de la proteína, que se acompañan con los principales eventos de neurogénesis en la retina, sugieren su participación en este proceso histogénico. Su persistencia en ciertas áreas de la retina podría estar relacionada con ciertas funciones neuronales así como con los fenómenos de plasticidad neuronal (Zolessi y Arruti, 2004). Sin embargo, desconocemos hasta el momento el efecto que tiene la fosforilación en la S25 sobre la funcionalidad de la proteína. Hemos determinado que a diferencia de las fosforilaciones en el ED, esta fosforilación no impide la interacción de la proteína con los filamentos de actina (Toledo y Arruti, 2009). Tal como la proteína total, esta variante fosforilada se localiza en parches periféricos en el soma y las neuritas de neuroblastos retinianos en cultivo, extendiéndose hasta los filopodios más delgados (Zolessi y Arruti, 2001b). Evidenciamos además que no se altera su asociación con microdominios de membrana resistentes al colesterol, o balsas lipídicas, sitios privilegiados para su rol como secuestrador del segundo mensajero lipídico PIP₂ (Toledo y Arruti, 2009).

De esta manera, las evidencias existentes hasta el momento y expuestas más arriba, indican que esta particular fosforilación es hasta donde conocemos, la única modificación postraduccional tejida específica de MARCKS. La misma no afecta el emplazamiento subcelular de la proteína ni su interacción con uno de sus principales interactores, la actina. Así como ocurre con otras fosforilaciones no convencionales (fuera del ED) no se conoce la función de esta fosforilación en la fisiología de la proteína o cómo es su interacción con otras fosforilaciones. Para abordar este problema, fue que decidimos plantear la siguiente hipótesis de trabajo, que pusimos a prueba mediante una serie de objetivos que enumeramos a continuación.

Antecedentes básicos e hipótesis de trabajo

La funcionalidad de MARCKS durante el desarrollo del sistema nervioso está regulada por modificaciones post-traduccionales. Entre ellas existen múltiples fosforilaciones y desfosforilaciones que tienen lugar en diferentes residuos. En particular, la fosforilación/desfosforilación de la serina 25 de MARCKS está relacionada con el desarrollo del proceso histogénico de la retina, tal como se ha comunicado en publicaciones de nuestro laboratorio.

MARCKS es una proteína susceptible de ser fosforilada en muchos residuos (serinas y treoninas) por PKC y otras quinasas. Se conoce también que varias serina-treonina fosfatasas actúan sobre los diferentes sitios fosforilados. Esta proteína, si bien es naturalmente desplegada, exhibe consecuencias de acciones intra-cadena. Recordemos los efectos del ácido mirístico sobre el ED (Tapp et al., 2005) y los de la actina filamentosa unida al ED sobre el estado de la serina 25 cuando la actina es removida del sitio de unión en el ED (Toledo y Arruti, 2009) [ver ese artículo al final de la Introducción].

Proponemos que la regulación de la fosforilación/desfosforilación en la serina 25 podría depender de alteraciones en la estructura de la propia cadena de MARCKS, o de modulaciones de las actividades quinasa y fosfatasa provocadas por activaciones de vías de señalización o ser consecuencia de ambos mecanismos.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis, para analizar la hipótesis expuesta, fue el de develar algunas características y posibles consecuencias de relevancia biológica de esta fosforilación no clásica de MARCKS que tiene lugar en la S25, a través de la exploración de posibles reguladores.

Para alcanzarlo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Identificar la quinasa responsable de la fosforilación de MARCKS en la S25 durante el desarrollo neuronal.
- Evidenciar la existencia de posibles cambios en la localización o en el nivel de fosforilación de la forma fosforilada en S25 en relación a distintas moléculas de la matriz extracelular y/o a factores tróficos.
- Determinar si la fosforilación modula la capacidad de MARCKS de interactuar con diferentes moléculas de relevancia en el proceso de diferenciación neuronal.

- Analizar la relación entre la fosforilación en serina 25 de MARCKS y las fosforilaciones clásicas en el dominio efector a cargo de PKC.
- Analizar los efectos de las fosforilaciones clásicas de MARCKS sobre la morfología celular y la organización del citoesqueleto en neuronas, así como también en otros tipos celulares que no presenten fosforilación en la S25.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Animales

Se utilizaron huevos embrionados de gallina generosamente donados por PRODHIN. Estos fueron mantenidos en incubadora a 37° C en atmósfera húmeda hasta el momento de su uso. El estadio de desarrollo fue determinado de acuerdo a la tabla de estadios normales del desarrollo del embrión de pollo de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1992).

2) Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

Anticuerpo	Reactividad	Origen	Procedencia	Dilución
Acm 3C3	Anti-S25p-MARCKS	Monoclonal de ratón	Zolessi et al., 1999	1/20 <i>in situ</i> y 1/5 WB
MCt	Anti-MARCKS total	Policlonal de conejo	Aigner y Caroni, 2003	1/2000 <i>in situ</i> y 1/10000 WB
Martin D202-D87	Anti-MARCKS total	Policlonal de conejo	Dr. P. Blackshear	1/2000 <i>in situ</i> y 1/10.000 WB
Polo 52	Anti-MARCKS total	Policlonal de conejo	Polo Tecnológico de Pando	1/2000 <i>in situ</i> y 1/10.000 WB
Anti-NCAM	Anti-NCAM	Policlonal de conejo	Dr. J.P. Thiery	1/2000 <i>in situ</i> y 1/5000 WB
Anti-espectrina	Anti-espectrina	Policlonal de conejo	Sigma, St. Louis, MO, USA	1/100 <i>in situ</i> y 1/400 WB
Anti-tubulina	Anti-tubulina	Monoclonal humano	Avrameas et al., 1981	1/300 <i>in situ</i> y 1/200 WB
C8	Anti-Cdk5	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1/15 <i>in situ</i> y 1/400 WB
Cl6	Anti-PKC β	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1/50 <i>in situ</i> y 1/500 WB.
Anti- PKC ζ	Anti- PKC ζ	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1/50 <i>in situ</i> y 1/500 WB.
Anti-actina	Anti-actina	Policlonal de conejo	Sigma, St. Louis, MO, USA	1/2000 <i>in situ</i> y 1/2000 WB
pED-MARCKS	Anti- pED-MARCKS	Policlonal de conejo	Sigma, St. Louis, MO, USA	1/100 <i>in situ</i> y 1/1000 WB
Anti-cadherina	Anti-pan Cadherina	Policlonal de conejo	Sigma, St. Louis, MO, USA	1/400 <i>in situ</i> y 1/1000 WB
Anti-calmodulina	Anti-calmodulina	Monoclonal de conejo	Epitomics, Abcam, Cambridge, MA, USA	1/1000 WB
1H8	anti-GSK-3 β	Monoclonal de ratón	Virogen, MA, USA	1/750 WB
Anti-pGSK-3 β	anti-fosfo-GSK-3 β Ser9	Policlonal de conejo	Cell Signaling, MA, USA	1/750 WB
Anti- γ -tubulina	anti- γ -tubulina	Monoclonal de ratón	Sigma, St. Louis, MO, USA	1/500 <i>in situ</i>

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

- anti IgG de ratón conjugado a FITC (Sigma, St. Louis, MO, USA). Dilución 1/200.
- anti IgG de conejo conjugado a FITC (Sigma, St. Louis, MO, USA). Dilución 1/200.
- anti IgG de ratón conjugado a Cy-3 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Dilución 1/2000.
- anti IgG de ratón conjugado a Alexa 546 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Dilución 1/2000.
- anti IgG de conejo conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Dilución 1/2000.
- anti IgG de conejo conjugado a Alexa 546 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Dilución 1/2000.
- anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa del rábano (Cell Signaling, MA, USA). Dilución 1/1000.
- anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa del rábano (Sigma, St. Louis, MO, USA). Dilución 1/16.000.
- anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa del rábano (Sigma, St. Louis, MO, USA). Dilución 1/10.000.
- anti IgG de humano conjugado a peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO, USA). Dilución 1/5000.

3) Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Suero fetal bovino (SFB) (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA); poli-L-lisina, poli-L-ornitina, citocalasina D, BCA (ácido bicinonónico), faloidina conjugada a TRITC, CNBr, sefarosa 4B, sefarosa-proteína G, PMA (phorbol 12-miristato, 13-acetato), roscovitina, olomucina, ácido okadaico, ciclosporina A (Sigma, St. Louis, MO, USA) calculina, FK-506 (Cell Signaling, MA, USA), tautomycetina (Tocris, USA), nitrocelulosa, kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, IL, USA) y ECL Prime Western blotting detection reagent (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia), Hoechst 33342, DiOC₆, DiOC₁₈, DND-99 Lysotraker, Slow Fade Gold (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA).

4) Cuantificación de proteínas (Smith et al., 1985)

La cuantificación de proteínas purificadas (MARCKS o anticuerpos) fue realizada utilizando la reacción con el ácido bicinonónico (BCA). Para ello, 10 µl de las muestras fueron incubadas con 1 ml de una solución preparada a partir de 50 ml de BCA y 1 ml de sulfato de cobre. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C antes de medir la absorbancia a 562 nm (UV Visible Recording Spectrophotometer UV-160A, Shimadzu, Kyoto, Japan). Como estándares se utilizaron soluciones de concentración creciente de BSA desde 0 mg/ml a 2 mg/ml.

5) *Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)* (Laemmli, 1970)

Las muestras para electroforesis fueron diluidas en buffer de muestra 4X (SDS 8%, glicerol 50%, β -mercaptoetanol 20% y cristales de bromofenol en Tris 0.25 M, pH 8,8). Las muestras se incubaron a 100 °C durante 3 minutos antes de cargarse en el gel. Se utilizaron geles discontinuos de poliacrilamida (gel de concentración 3% y gel de separación 10%), de 0.75 o 1 mm de espesor. El buffer de electroforesis contuvo Tris 50 mM pH 8.6, glicina 380 mM y SDS al 0.1%. Se realizó una precorrida de 25 minutos a 80 V antes de cargar las muestras, la migración en el gel de concentración fue de aproximadamente 30 minutos a 100 V y en el de separación de 2 a 3 horas a 120-140 V.

6) *Western-blot* (Towbin et al., 1979)

Al finalizar la corrida electroforética el gel fue incubado en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, etanol al 20%) durante 5 minutos. Luego se armó un sándwich con dos rejillas de plástico, dos esponjas, dos hojas de papel de filtro (Whatmann 3M) y una membrana de nitrocelulosa previamente incubada en el mismo buffer por 10 minutos. El sándwich fue colocado en una cuba de transferencia, cubriéndolo completamente con buffer. La transferencia se realizó durante 16 horas a 100 mA o durante 2 horas a 200 mA a 8°C. Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue teñida 10 minutos con Rojo Ponceau S al 0.2% en ácido acético al 3%, y posteriormente decolorada con varios lavados con PBS, en agitación. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó mediante una incubación con leche descremada (Conaprole, Uruguay) al 5% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario diluido en PBS con Tween al 1% (PBS-T), se realizó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado de 10 minutos con PBS-T, y a continuación se incubó con el anticuerpo secundario diluido en PBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. Para retirar el exceso de anticuerpo secundario se realizó un lavado de 10 minutos en agitación con PBS-T, seguido de dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS.

Para el revelado de la peroxidasa empleamos el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate o Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent y placas radiográficas sensibles al verde CP-G (AGFA o Agfa-Gevaert, Argentina).

Para realizar la inmunodetección de otros antígenos sobre la misma membrana de nitrocelulosa, se bloqueó la señal de la peroxidasa utilizada en la primera inmunodetección mediante una incubación en una solución de azida de sodio al 0.2% en PBS durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Luego se

realizó la inmunodetección con los nuevos anticuerpos primario y secundario, sin necesidad de bloquear nuevamente los sitios inespecíficos.

7) Criomicrotomía

Las muestras fueron fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante tiempos variables dependiendo de la naturaleza de la pieza (desde 1 hora hasta 16 horas (ON) en la heladera). Se removió el fijador y se realizaron tres lavados de PBS de 30 minutos cada uno. La crioprotección se realizó incubando la pieza ON en la heladera, en soluciones de sacarosa al 5% y al 20% en PBS. Las piezas fueron incluidas en moldes de aluminio conteniendo OCT (Jung, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Los cortes fueron realizados en un crióstato Cryocut E (Reichert-Jung, Cambridge Instruments, Alemania) y levantados en portaobjetos de vidrio con una película de gelatina crómica al 1%. Estos fueron conservados a -20°C, envueltos individualmente en papel de aluminio, hasta el momento de su utilización.

8) Cultivos primarios de células de la retina neural

Utilizamos cultivos de células de la retina neural de embriones de pollo de 8 días de desarrollo, a partir de los cuales se desarrollan principalmente neuronas de tipo multipolares, bajas cantidades de fotorreceptores y glía de Müller (Adler y Hatlee, 1989). Para los mismos, se extrajo el embrión en forma aséptica, se retiraron los tejidos circundantes al ojo, se extrajo el ojo y se colocó en una solución tamponada glucosada sin calcio ni magnesio (CMFG). Allí se realizó la disección cortando con una tijera alrededor de la córnea para extraerla junto con el cristalino y cuerpo vítreo. Se separó la retina neural y se incubó en una solución de tripsina 0.05%, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.002% en CMFG, en agitación orbital (100 rpm) durante 15 minutos. A continuación se inhibió la actividad de la enzima agregando Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) con alta concentración de glucosa y piruvato (PAA, Alemania), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA) al 10%. Las retinas fueron disgregadas mediante pipeteo suave con pipeta Pasteur con la punta redondeada a la llama, colocadas en un tubo con 8 ml de DMEM con SFB 10% y se dejaron decantar durante 8 minutos de manera que los trozos de retina más grandes sedimentaran. Las células de la parte superior del tubo fueron sembradas directamente en placas de Petri de 35 o 60 mm, o conteniendo laminillas de vidrio con distintos sustratos. Las laminillas de vidrio fueron previamente limpiadas con tolueno y luego alcohol absoluto, durante 24 horas cada uno. Luego fueron secadas y esterilizadas por calor seco (3 horas a 140°C). Los sustratos

fueron colocados sobre las laminillas e incubados en estufa a 37°C ON (poliornitina, concanavalina A), o 2 horas (laminina). El colágeno I fue incubado a temperatura ambiente, en la campana de flujo laminar horizontal, expuesto a la luz ultravioleta durante 30 minutos a 1 hora. El exceso de sustrato fue removido mediante dos lavados con PBS estéril. Las células se sembraron y cultivaron en estufa a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

9) Cultivos primarios de fibroblastos de embriones de pollo

Para los cultivos de fibroblastos, se utilizaron embriones de 8 días. Se extrajeron los embriones en forma aséptica, se sacrificaron rápidamente por decapitación y con pinzas se removió la piel del pterilo de la región dorsal. Este tejido se incubó en una solución de tripsina al 0.05%, EDTA al 0.002% en CMFG, en agitación orbital (100 rpm) durante 15 minutos. A continuación se inhibió la actividad de la enzima agregando DMEM con alta glucosa y piruvato, suplementado con SFB, al 10%. Las células fueron disgregadas mediante pipeteo suave con pipeta Pasteur con la punta redondeada a la llama y sembradas en placas de Petri de 35 o 60 mm conteniendo laminillas de vidrio con distintos sustratos. Las células se cultivaron en estufa a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

10) Tratamientos farmacológicos con inhibidores de quinasas y fosfatasas

Los tratamientos farmacológicos con inhibidores de quinasas (roscovitina, olomucina y LiCl) o de fosfatasas (ácido okadaico, caliculina, tautomycetina, ciclosporina A, FK-506) fueron realizados en DMEM sin suero fetal bovino, durante los intervalos de tiempo indicados en cada figura. Para ello las células fueron cultivadas durante 3 días en DMEM con SFB al 10%, luego removimos cuidadosamente el medio y lo sustituimos por medio sin suero para realizar un lavado de 2 minutos. Removimos el medio de lavado y agregamos las drogas en medio de cultivo sin suero. Posteriormente las células fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4% o lavadas con PBS y posteriormente lisadas en buffer de muestra para electroforesis.

11) Tratamientos con forbol 12-acetato, 13-miristato (PMA) sobre cultivos y retinas aisladas

Se realizaron tratamientos con PMA 30 nM, 300 nM y 3 μM durante períodos de tiempo variable según se indica en cada figura. Para ello, se retiró el medio de cultivo de las células y lo sustituimos por medio de cultivo DMEM sin suero, en donde adicionamos la droga o DMSO para los no tratados. Los tratamientos fueron realizados en

estufa a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Posteriormente las células fueron fijadas en paraformaldehído (PFA al 4%) o lisadas en buffer de muestra para electroforesis.

Se realizaron tratamientos con PMA sobre retinas enteras aisladas de embriones de pollo de 8 días de desarrollo, de manera similar al procedimiento seguido con las células disociadas. Luego del tratamiento las retinas fueron lisadas en buffer Tris 10mM, SDS 2% o fijadas con una solución al 4% de PFA en PBS para su procesamiento para criomicrotomía.

12) Inmunodetección in situ

La inmunodetección se realizó sobre cultivos de células de la retina neural y fibroblastos de embriones de 8 días de desarrollo, o sobre cortes a congelación de ojos y retinas aisladas de embriones de pollo. Para el caso de los cultivos celulares, luego de sacar el medio de cultivo se realizó un lavado con PBS y se fijaron con una solución al 4% de PFA en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se permeabilizaron las células mediante una incubación de 3 minutos en una solución de Tritón X-100 al 0.05% en baño de hielo. En el caso de los cortes a congelación, removimos el OCT mediante tres lavados de PBS de 5 minutos cada uno. A partir de aquí el procedimiento es el mismo tanto para los cultivos celulares como para cortes a congelación. Se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de BSA al 1% y suero de cabra al 10% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda. A continuación se realizó la incubación con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo, durante 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Los filamentos de actina se marcaron con falodina-TRITC incubándola junto con los anticuerpos secundarios. Luego de realizarse 3 lavados de PBS de 5 minutos cada uno se incubó con una solución de Hoechst 33342 0.1 µg/ml en PBS o yoduro de propidio 2 µg/ml o verde metilo al 2x10⁻⁴ %, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último se realizaron 3 lavados de PBS de 5 minutos cada uno y se montó sobre un portaobjeto utilizando glicerol al 75% en PBS o Slow Fade Gold.

La observación de los preparados se realizó en un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot FXA y fueron fotografiados con una cámara digital Nikon D70 o en un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5. Las imágenes fueron procesadas con Adobe Photoshop 7 y Fiji Image J (Schindelin et al., 2012).

13) Purificación de anticuerpo monoclonal 3C3

El Acn 3C3 fue purificado a partir de sobrenadante de hibridoma, mediante una columna de afinidad de sefarosa-proteína G. Para ello se realizó, en primer lugar, un lavado del lecho de la columna (5 ml) con 20 ml de PBS filtrado con filtro de 0.22 μm , luego con 15 ml de una solución glicina-HCl 0.1 M pH 2.7, y posteriormente otro lavado con PBS hasta que el pH de salida estuviese entre 7.2 y 7.4. A continuación se realizó el pasaje del sobrenadante de hibridoma tamponado con Tris-HCl 50 mM pH 8, conteniendo NaN_3 al 0.02%, previamente filtrado en filtro Millipore de 0.22 μm , manteniendo un flujo aproximado de 0.75 ml/min, a 4°C. Posteriormente la columna fue lavada con PBS hasta que la DO_{280} del PBS de salida fuese menor a 0.05 unidades de absorbancia. La elución del anticuerpo se realizó pasando 20 ml de glicina-HCl 0.1M pH 2.7, recogiendo fracciones de 1 ml en tubos conteniendo 50 μl de Tris-HCl 2 M pH 11. La concentración de proteínas en cada fracción se midió por DO_{280} y se reunieron aquellas que superaban el valor de 0.1 unidades de absorbancia. Las fracciones reunidas fueron luego dializadas contra PBS durante 24 horas a 4°C, realizando varios cambios del buffer. La solución se conservó a 4°C con NaN_3 al 0.02%. En algunos casos, luego de diálisis contra dos litros de una solución de NH_4HCO_3 1 mM durante 24 horas, el anticuerpo fue liofilizado.

14) Preparación de columna de proteína A-Sefarosa 4B

La proteína A-Sefarosa 4B fue reconstituida en agua miliQ durante 2 horas. Luego se lavó dos veces con 10 ml de agua miliQ, y se centrifugó a baja velocidad para sedimentar la sefarosa para luego resuspenderla en buffer TE (Tris 20 mM pH 8, EDTA 1 mM) y azida de sodio al 0.1%. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados mediante una incubación en buffer TE con azida de sodio al 0.1%, y BSA al 1%, durante 16 horas a 4°C. Luego se realizó un lavado con el mismo buffer y posteriormente con TE. La columna fue almacenada en TE.

15) Purificación de inmunoglobulinas de ratón

Se purificaron inmunoglobulinas de ratón a partir de 1 ml de suero normal (hembra Balb/c de 6 meses), gentilmente cedido por la Dra. Silvia de Matteis del Instituto de Higiene. El suero fue diluido mediante la adición de un volumen igual de PBS. Posteriormente se agregó una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, de manera lenta y en agitación. Se agitó dos horas a temperatura ambiente y centrifugó durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. El sedimento se lavó dos veces con una solución al 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se resuspendió en 100 μl de PBS. Dializamos posteriormente contra PBS, durante 16 horas a 8°C. Las inmunoglobulinas presentes en la solución

dializada fueron purificadas con una columna de proteína A-sefarosa. Antes de pasar la solución por la columna se centrifugó durante 20 minutos a 15.000 rpm a 4°C para remover cualquier partícula. Luego de pasar la solución por la columna y realizar un lavado con PBS, las inmunoglobulinas fueron eluidas con una solución de glicina-HCl 0.2 M pH 3. Se recuperaron fracciones de 2 ml y se neutralizó el pH con buffer Tris 1 mM pH 8. Se tomaron medidas de DO₂₈₀ conociendo que 1 unidad de DO₂₈₀ equivale a 0.8 mg/ml de inmunoglobulina. Aquellas fracciones conteniendo un valor superior a 0.1 mg/ml de proteína fueron recolectadas y dializadas contra una solución 1 mM de NH₄HCO₃. La solución dializada fue posteriormente liofilizada.

16) Acoplamiento del anticuerpo monoclonal 3C3 y de inmunoglobulinas de ratón a Sefarosa-4B

Tanto el Acm 3C3 como las inmunoglobulinas de ratón purificadas fueron acoplados a Sefarosa-4B activada con CNBr. Para ello, se reconstituyó la Sefarosa-4B mediante varios lavados en una solución de HCl 1 mM (manteniendo una relación 200 ml HCl por gramo de gel). Posteriormente el gel se lavó con buffer de acoplamiento (NaHCO₃ 0.1 M pH 8.3; NaCl 0.5 M) y se incubó con el anticuerpo (5-10 mg/ml) en el mismo buffer de acoplamiento, durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Luego se bloquearon los sitios reactivos remanentes mediante una incubación de dos horas a temperatura ambiente, con una solución de glicina-NaOH 0.2 M pH 8. Por último, se lavó el exceso de proteína adsorbida mediante un lavado con buffer de acoplamiento, seguido de varios lavados en acetato de sodio 0.1 M pH 4, NaCl 0.5 M y nuevamente con solución de acoplamiento y PBS. La Sefarosa-anticuerpo se almacenó a 4°C en PBS con NaN₃ al 0.02%.

17) Inmunoprecipitación

Retinas o cerebros de embriones de 12 días de desarrollo fueron homogeneizados en buffer de lisis (NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 0.2%, NaF 5 mM, Na₃VO₄ 5 mM, aprotinina 0.001 mg/ml, benzamidina 0.16 mg/ml, PMSF 1 mM) en una relación tejido:buffer de 1:6 w/v, en hielo, en homogenizador Potter-Elvehjem. Luego de incubar los homogeneizados 15 minutos en hielo, realizamos una centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Un mililitro del sobrenadante fue incubado con 10 µl de Sefarosa-4B inactiva, en agitación durante 45 minutos a 4°C. Posteriormente se incubó con 40 µl de Sefarosa-Acm 3C3, resuspendida previamente en 100 µl de buffer de lisis sin Tritón X-100 durante 3 horas, a 4°C en agitación. Luego de cuatro lavados en buffer de lisis, el sedimento fue resuspendido en buffer de muestra de electroforesis 1x.

18) Medidas de densidad óptica de las bandas de Western-blot

Para cuantificar el grado de fosforilación de la S25 o el ED de MARCKS, realizamos Western-blots secuenciales con el Acm 3C3, anti-pED-MARCKS y MARCKS total. Medimos las DO de las bandas con el programa Fiji Image J, con el complemento de análisis de geles. Tres valores de DO de cada banda fueron promediados y luego normalizados contra los resultados de DO de MARCKS total. Otorgamos un valor de 100% de fosforilación a los controles de cada experimento y calculamos a partir de este los porcentajes de fosforilación en las distintas muestras, para cada experimento independiente.

19) Purificación de colágeno I a partir de colas de rata

Purificamos colágeno I a partir de colas de rata, para utilizarlo como sustrato para el cultivo de neuroblastos. Para ello, limpiamos con alcohol 70% las colas, removimos la piel y cortamos pequeños trozos de tendón. Estos fueron primero lavados en PBS y luego solubilizados en ácido acético 0,5 M (~3 g de tendones en 50 ml de ácido), en agitación durante 48 horas a 8°C. La solución resultante fue centrifugada a 25.000g durante 1 hora (protocolo tomado de Bard et al., 1973, con modificaciones) (Bard y Chapman, 1973). El sobrenadante libre de restos de tendón no solubilizado fue esterilizado por incubación con cloroformo en la campana de flujo laminar hasta la evaporación del cloroformo. El colágeno fue almacenado en la heladera hasta 2 meses.

20) Análisis estadísticos

Los valores de densidad óptica expresados como porcentaje de fosforilación, obtenidos en experimentos independientes fueron promediados y los valores se expresan como promedio \pm error estándar. El nivel de significación fue analizado con los test estadísticos no paramétricos Kruskal-Wallis y Wilcoxon-Mann Whitney ($*p \leq 0,05$), para lo cual se tomaron datos de 3 a 5 experimentos independientes (n), como se indica en cada figura.

CAPITULO I

Identificación de la quinasa responsable de la fosforilación de la serina 25 de MARCKS durante la diferenciación neuronal

El objetivo de este capítulo es la identificación de la o las quinasas responsables de fosforilar a MARCKS en la serina 25 durante el desarrollo de la retina neural. Para ello se realizó primero un análisis *in silico* de las secuencias de MARCKS de vertebrados, buscando regiones de homología en torno a la serina 25 para poder identificar secuencias consenso de fosforilación para alguna quinasa. Posteriormente realizamos experimentos inhibiendo quinasas en células aisladas de retina y estudiamos la localización de la quinasa identificada, así como de su sustrato S25p-MARCKS. En este Capítulo se presentan los resultados y la discusión de los mismos.

RESULTADOS

1.1) Búsqueda de secuencias consenso de fosforilación en torno al sitio de la S25 de MARCKS en vertebrados

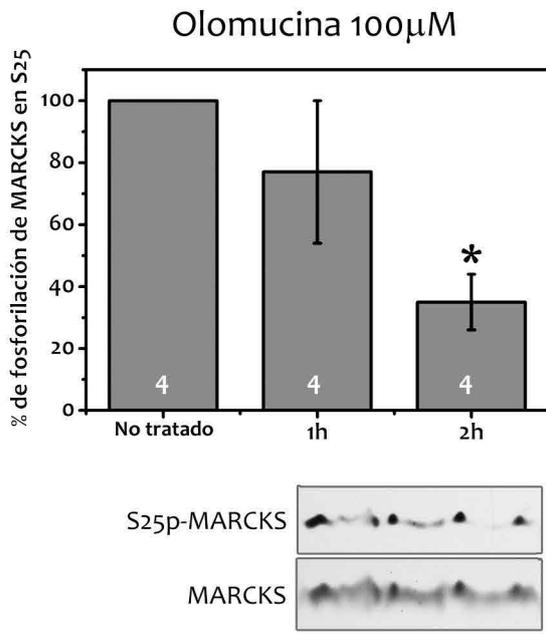
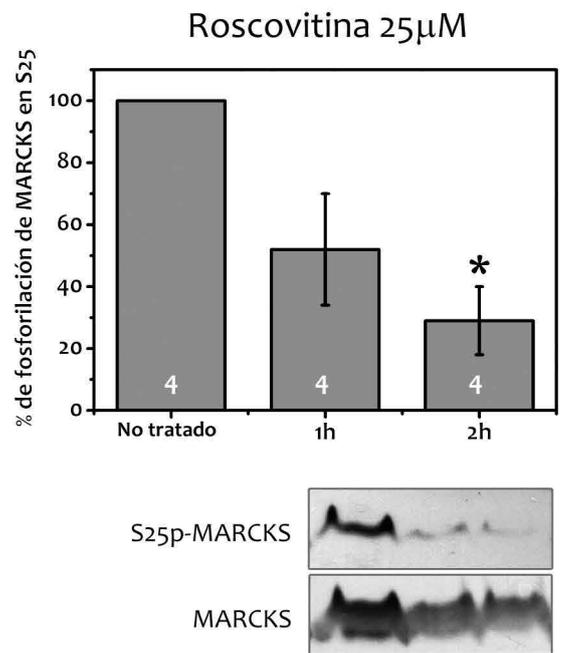
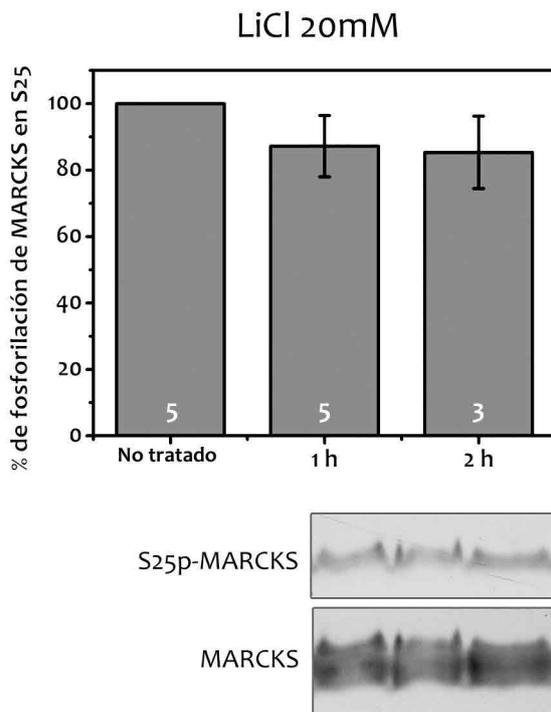
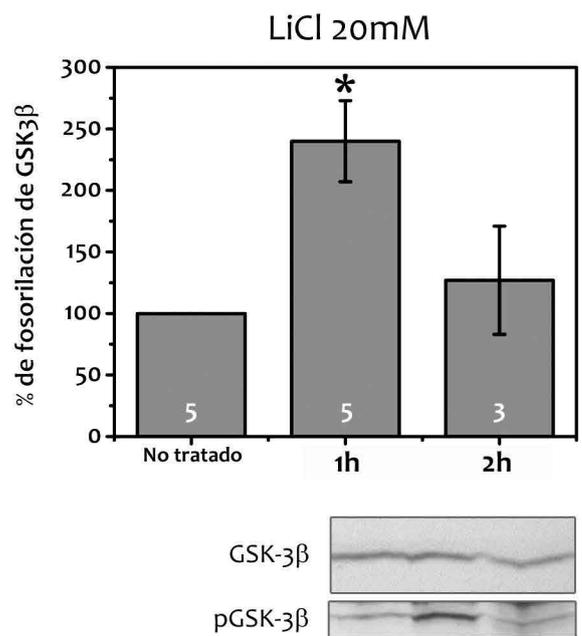
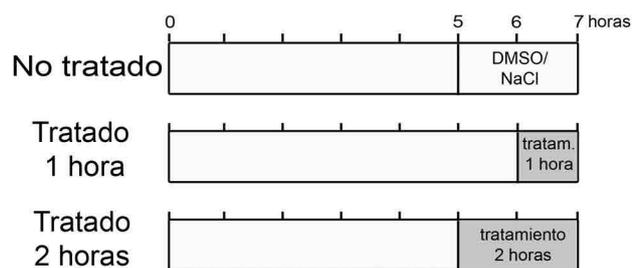
Como primera aproximación a la identificación de enzimas capaces de fosforilar a MARCKS en la S25, realizamos una búsqueda de sitios favoritos de quinasas en algunas de las secuencias aminoacídicas de MARCKS disponibles hasta el momento. Encontramos 20 secuencias anotadas, provenientes de aves, reptiles, mamíferos, anfibios y peces. El alineamiento, utilizando el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), mostró en un elevado número de especies de diferentes taxa, el carácter conservado de las tres regiones de homología que habían sido descritas para algunas especies (Figura 8): una en el dominio amino-terminal de la proteína conocida como MH1, correspondiente a la secuencia de miristilación (Aderem, 1992) (rectángulo violeta), otra región cercana a la anterior denominada MH2 donde ocurre el único evento de splicing de la proteína y donde se localiza la S25 (rectángulo verde); y otra en la región intermedia de la proteína denominada dominio efector (no mostrado). Confirmamos que en la región carboxilo terminal existe una enorme divergencia en su secuencia (no mostrado). Dentro del dominio MH2, la región que contiene la S25 tiene la secuencia “SPSK” (rectángulo negro sombreado), que coincide con la secuencia consenso de las quinasas dependientes de ciclina “Cdk” (S/T-P-X-K) (Nigg, 1993). Esta región mostró estar muy conservada, como fuera indicado anteriormente

1.2) Inhibición de la actividad de Cdks

Como mencionamos anteriormente, la secuencia identificada en los análisis *in silico* coincide con la secuencia blanco de quinasas dependientes de ciclina (Cdks): S/T-P-X-K/R (Nigg, 1993). Entre ellas, Cdk5 es la única quinasas conocida hasta el momento con actividad en neuroblastos postmitóticos (neuronas inmaduras) y cumple además un rol determinante durante el desarrollo del sistema nervioso (Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008; Lalioti et al., 2010). Diseñamos entonces, experimentos en los cuales utilizamos inhibidores de Cdks en tratamientos sobre células aisladas de la retina neural embrionaria y cultivadas *in vitro*. Dado que la fosforilación de MARCKS en la S25 parece tener una vida media prolongada (diversos resultados del laboratorio no mostrados aquí), seleccionamos una condición funcional de las células en la que los niveles de fosforilación fueran inicialmente bajos para interferir con la fosforilación *de novo*. Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la fosforilación de MARCKS en la S25 decae cuando las células de la retina neural de embriones de pollo de 8 días de desarrollo son disgregadas, y luego aumenta en función del tiempo de cultivo, alcanzando sus niveles máximos a partir de las 24 horas *in vitro* (Toledo y Arruti, 2009). Por tanto, disgregamos células de la retina, que se explantaron y cultivaron durante 7 horas. Durante la última hora o las últimas dos horas de cultivo fueron tratadas con distintos inhibidores de quinasas siguiendo el esquema que se presenta en la figura 9E. Cuantificamos la cantidad de MARCKS fosforilada en la S25 mediante análisis densitométricos de Western-blots utilizando el software ImageJ, y los valores obtenidos fueron normalizados contra la cantidad de MARCKS total en la muestra. Consideramos la cantidad de S25p-MARCKS presente en los cultivos no tratados con inhibidores como el 100%, y calculamos a partir de este valor el porcentaje para cada tratamiento.

Los tratamientos con dos inhibidores de Cdks, roscovitina y olomucina (Vesel et al., 1994; Meijer et al., 1997), durante 1 hora no fueron suficientes para inducir una reducción en la fosforilación de S25, ya que los valores no resultaron estadísticamente significativos, aunque apreciamos una tendencia al descenso. Por otro lado, los tratamientos de 2 horas de duración provocaron una caída significativa de la cantidad de S25p-MARCKS respecto a MARCKS total (figura 9 A y B). Por otro lado, decidimos analizar los efectos de la inhibición de la enzima GSK-3 β (glucógeno sintasa quinasa), quinasa dirigida por prolina que comparte varios sustratos con Cdk5, si bien estos no poseen la misma secuencia blanco de fosforilación (Yu et al., 2009). La inhibición de la actividad de dicha enzima con LiCl no provocó cambios en el nivel de fosforilación de MARCKS en la S25 (figura 9C). La efectividad del tratamiento inhibitor del LiCl sobre la actividad de GSK-3 β fue evaluada por el nivel de su fosforilación en la serina 9, detectada con un anticuerpo específico para dicho fosfo-residuo. Efectivamente, los tratamientos con LiCl provocaron un incremento significativo en el nivel de fosforilación de GSK-3 β , lo cual indica su inhibición (Sutherland et al., 1993), pero dicha inhibición no tuvo efecto sobre la fosforilación en la S25 de

Figura 9: Descenso de la fosforilación en la S25 de MARCKS por inhibición de la actividad de Cdk5 en neuroblastos de la retina en cultivo. **(A-D)** Gráficos representando la fosforilación relativa de la S25 de MARCKS o la S9 de GSK-3 β como porcentaje del no tratado, luego de los tratamientos con olomucina, roscovitina o LiCl. Las células de la retina fueron cultivadas a baja densidad durante 7 horas, y tratadas durante la última hora o las últimas dos horas con Olomucina 100 μ M (A), Roscovitina 25 μ M (B), o LiCl 20 mM (C y D). Se muestran Western-blots representativos debajo de cada gráfico. Los valores graficados en C y D para la fosforilación en S25p-MARCKS y GSK-3 β fueron tomados de los mismos experimentos. Los cultivos no tratados fueron incubados con DMSO al 0.05 % (A y B) o NaCl 20 mM (C y D) por 1 o 2 horas. Los valores son presentados como la media \pm SEM, * p \leq 0.05. La significación estadística fue determinada utilizando los test no paramétricos Kruskal-Wallis y Wilcoxon-Man Whitney. Los números dentro de las barras indican la cantidad de experimentos independientes para cada situación. **(E)** Esquema indicando el curso temporal de los tratamientos.

A**B****C****D****E**

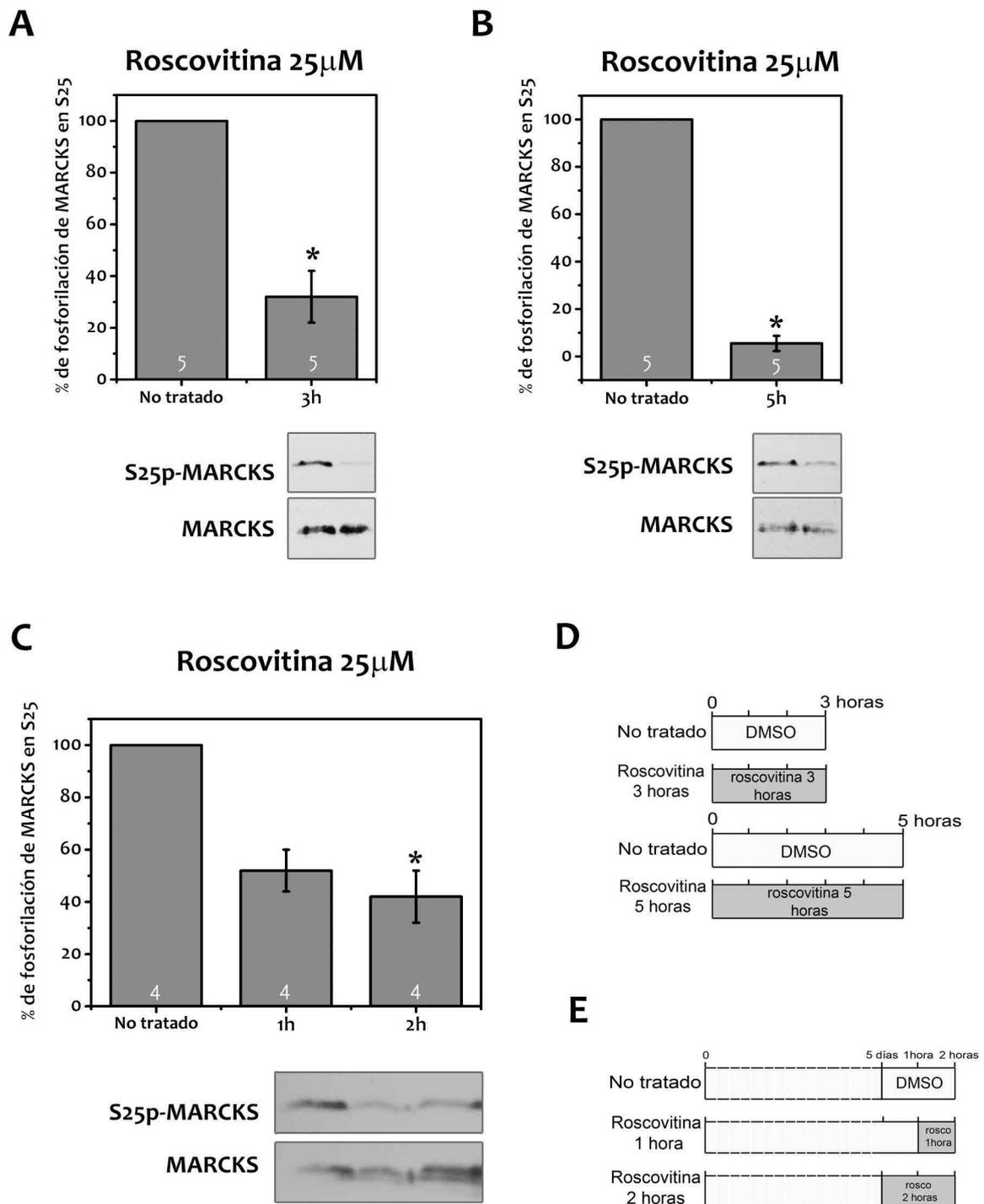


Figura 10: Inhibición de la fosforilación de la S25 de MARCKS por roscovitina, en células de la retina en diferentes estados funcionales. Células de la retina de E8 fueron cultivadas a baja densidad y tratadas con roscovitina siguiendo distintos protocolos. La fosforilación relativa se midió mediante Western-blot. Los cultivos no tratados fueron incubados con DMSO al 0.05%. Los resultados se expresan como media \pm SEM, * $p \leq 0.05$. Los números dentro de las barras indican el "n" (experimentos independientes) para cada situación experimental. La significancia estadística fue determinada aplicando los tests no paramétricos Kruskal-Wallis y Wilcoxon-Man Whitney. **(A, B)** Células de la retina embrionaria de E8 fueron cultivadas durante 3 (A) o 5 (B) horas y tratadas durante ese período con roscovitina 25 μ M. **(C)** Células de la retina embrionaria de E8 fueron cultivadas durante 5 días hasta alcanzar un importante desarrollo neurítico y tratadas durante la última hora o las últimas dos horas con Roscovitina 25 μ M. **(D, E)** Esquemas indicando el curso temporal de los tratamientos en A, B y C respectivamente.

MARCKS (figura 9 C y D).

En otras series de experimentos inhibimos Cdk5 utilizando roscovitina, al inicio de la refosforilación de la S25, tratando las células durante 3 y 5 horas desde su explantación. En este caso, la pérdida de la fosforilación en la S25 fue casi total, sin que esto afectara la viabilidad celular (figura 10 A y B). En cultivos de 3 días *in vitro*, los neuroblastos han alcanzado un estadio de mayor diferenciación, evidenciado por un importante crecimiento neurítico y los niveles de fosforilación en la S25 ya han alcanzado niveles estables. También aquí encontramos un descenso en la fosforilación de la S25 tratados con inhibidores durante 1 y 2 horas (figura 10 C). En ninguno de los experimentos realizados, se observó un nivel significativo de muerte celular (no mostrado).

En todos estos tratamientos farmacológicos encontramos que solamente el bloqueo de la actividad de Cdk5 promovió un descenso en la fosforilación de la S25, sugiriendo que Cdk5, única quinasa dependiente de ciclina que se encuentra activa en neuroblastos postmitóticos, sería la quinasa responsable de su fosforilación.

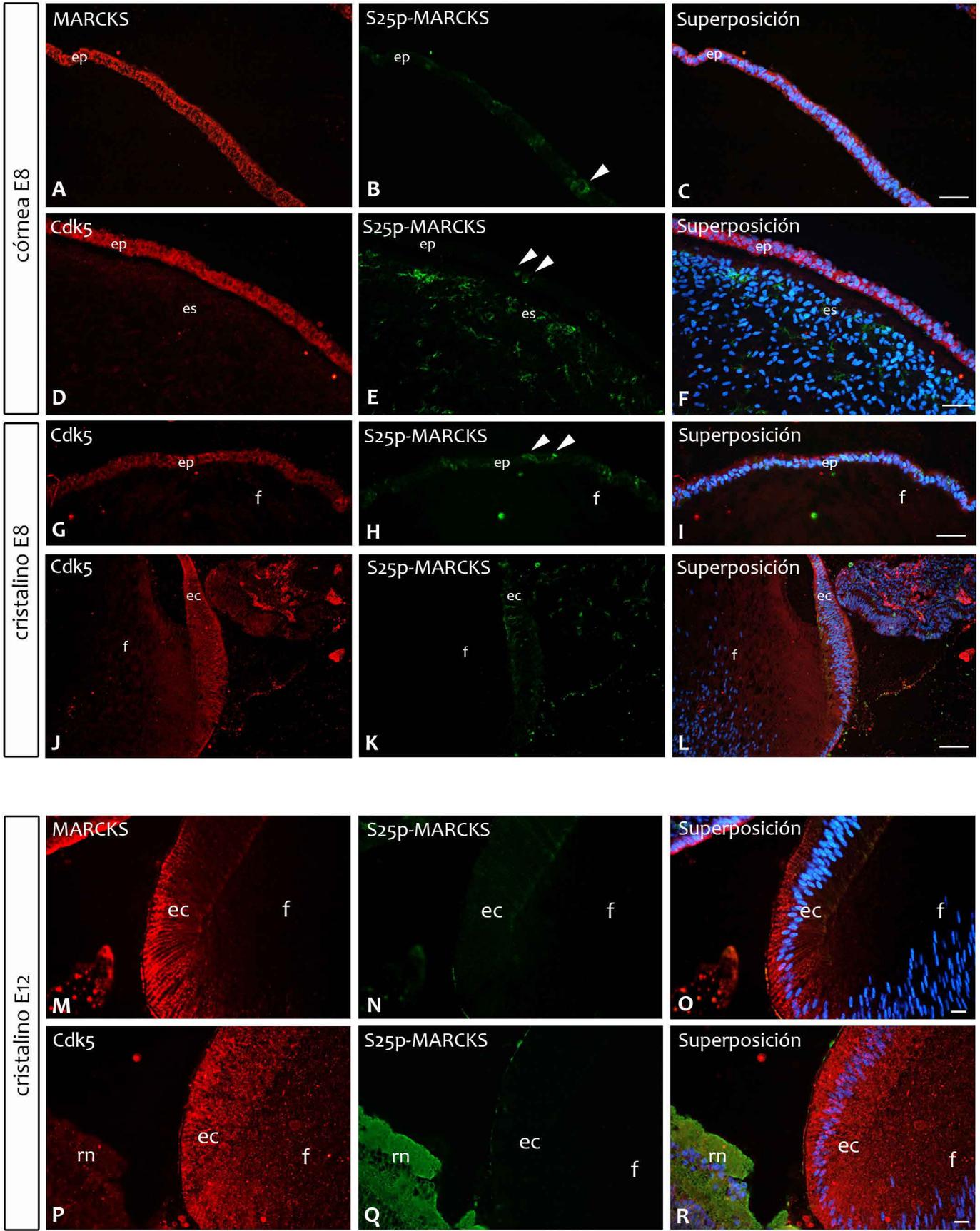
1.3) Localización de S25p-MARCKS y Cdk5 durante el desarrollo del ojo en embriones de pollo

A partir de los resultados expuestos en la parte anterior, y con el objetivo de encontrar más evidencias que sustenten nuestra hipótesis de que Cdk5 fosforila a MARCKS en la S25, decidimos determinar si S25p-MARCKS y Cdk5 mostraban codistribución a nivel tisular y subcelular. Determinamos entonces la localización de la proteína MARCKS total, de su variante fosforilada en la S25 y de la quinasa Cdk5, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), en criosecciones de ojos de embriones de pollo de distintos estadios del desarrollo, así como también en cultivos de células de la retina de embriones de 8 días de desarrollo.

En los cortes de ojos de embriones de E4, E8 y E12, MARCKS exhibió una distribución ubicua, estando presente tanto en tejidos oculares (neurales y no neurales), como en tejidos extraoculares, pero como ya fuera descrito, fue más abundante en el tejido neural (Zolessi, 2003). En ambos casos, la proteína se localiza en acúmulos discretos emplazados en la periferia de la célula (figura 11). Por otro lado, evidenciamos que la variante fosforilada en la S25 se encuentra únicamente en la retina neural, en neuroblastos postmitóticos, y se encuentra ausente de otros tejidos oculares como la córnea (epitelio y estroma) y el cristalino (epitelio y fibras), como también fuera descrito previamente (Zolessi et al., 2001) (figura 11). Por su parte, Cdk5 se localiza tanto en tejido neural como tejido no neural. Resulta interesante que en el ojo, particularmente en las regiones del epitelio de la córnea y el cristalino (epitelio y fibras), existe una muy alta concentración de Cdk5, y también de MARCKS, pero en cambio no se observa inmunoreactividad con el Acm3C3 (salvo en células mitóticas atribuible a una reacción inespecífica de este anticuerpo) (figura 11). Teniendo en cuenta estos resultados, el siguiente paso sería la identificación de la presencia de alguno de los activadores de Cdk5 (p35 o p39) en estos tejidos. Intentamos determinar también la localización en estos mismos tejidos del activador p35, para el que se encontró en aves una secuencia con alto grado de homología a la de mamíferos, pero lamentablemente los anticuerpos comerciales disponibles no demostraron ser confiables para inmunodetectar la variante de pollo de esta proteína.

Focalizándonos únicamente en la retina neural, donde encontramos grandes cantidades de S25p-MARCKS en neuronas en diferenciación, pudimos observar que si bien Cdk5 muestra una distribución considerablemente más extendida que S25p-MARCKS durante distintas etapas del desarrollo, la misma exhibe mayores concentraciones en neuronas en diferenciación (figura 12). En etapas tempranas de diferenciación de la retina (E4), S25p-MARCKS está presente en grandes cantidades solamente en neuronas en diferenciación en el borde vítreo de la retina (figura 12 A-C cabezas de flecha). A medida que se van generando las diferentes capas, en particular en E12 donde se alcanza el número de estratos propio de la retina adulta, la fosforilación en la S25 se va extendiendo hacia estas

Figura 11: Distribución de MARCKS, S25p-MARCKS y Cdk5 en el cristalino y la córnea de embriones de pollo de 8 y 12 días de desarrollo. Imágenes de epifluorescencia de inmunodetecciones sobre cortes transversales de ojo. **(A-C)** Inmunolocalización de MARCKS y S25p-MARCKS en secciones transversales del epitelio de la córnea de embriones de E8. Con cabeza de flecha se indica una célula mitótica que presenta señal inespecífica del anticuerpo 3C3. **(D-F)** Inmunolocalización de Cdk5 y S25p-MARCKS en el epitelio y el estroma corneano de un embrión de E8. **(G-L)** Inmunolocalización de Cdk5 y S25p-MARCKS en el cristalino de un embrión de E8. Imágenes de la región apical (G-I) y ecuatorial (J-L) del cristalino. **(M-O)** Inmunodetección de MARCKS y S25p-MARCKS en secciones transversales del cristalino de un embrión de E12. **(P-R)** Inmunodetección de Cdk5 y S25p-MARCKS en secciones transversales del cristalino de un embrión de E12. (ec: epitelio del cristalino, ep: epitelio de la córnea, es: estroma de la córnea, f: fibras del cristalino rn: retina neural). Los núcleos se marcan en azul con Hoeschst 33342. Barras: 50 μ m.



nuevas capas, siendo particularmente intensa su señal en las capas de fibras del nervio óptico, plexiformes interna y externa (Zolessi et al., 2001b). Cdk5, sin embargo, no mostro un enriquecimiento particular en las capas de fibras, excepto en la capa de fibras del nervio óptico, en donde se encontró la mayor concentración de esta proteína (figura 12 D-I). Tanto S25p-MARCKS, como Cdk5 se localizaron en parches de tamaño irregular, siendo los de S25p-MARCKS más periféricos a nivel celular, que los de Cdk5.

Estos resultados muestran claramente la colocalización a nivel tisular de ambas proteínas, si bien el territorio tisular de expresión de Cdk5 es mayor al ocupado por S25p-MARCKS y además a nivel subcelular de expresión de Cdk5 incluye regiones más citoplasmáticas que no contienen S25p-MARCKS.

Para profundizar en el análisis del emplazamiento subcelular de estas proteínas y buscar una posible existencia de codistribución entre las mismas, las inmunodetectamos en cultivos de neuroblastos de embriones de 8 días, sembrados a baja densidad sobre distintos sustratos (particularmente poliornitina y poliornitina-laminina), como se indica en cada figura. En estas células, evidenciamos claramente que tanto S25p-MARCKS como Cdk5 se localizan en acúmulos ("clusters") localizados en el soma, en las neuritas y conos de crecimiento. S25p-MARCKS se emplaza principalmente en la periferia de la célula, mientras que Cdk5 lo hace en acúmulos más centrales (Figura 13). En algunas células fue posible observar acúmulos de S25p-MARCKS tanto en neuritas como en el soma (por ejemplo en regiones de estrecha aposición celular) en los cuales si bien Cdk5 estaba ausente, se localizaba en regiones inmediatamente adyacentes a estos puntos (Figura 13 A-G). De la misma manera, Cdk5 se encuentra altamente concentrada en la región perinuclear, en la zona típicamente ocupada por el aparato de Golgi. En esta región no se encuentra un enriquecimiento de S25p-MARCKS (Figura 13 H-O). A nivel de los conos de crecimiento, tanto en aquellos de pequeño como en los de gran tamaño, los parches de ambas proteínas se extienden tanto en los dominios centrales como en los periféricos, incluso extendiéndose hasta los extremos de los filopodios. En estas estructuras de escaso espesor, en donde la cantidad de citoplasma se encuentra restringida, encontramos algunos puntos de colocalización de ambas proteínas (figura 13 P-U, cabezas de flecha).

Por tanto podemos concluir que estas proteínas están presentes en la retina neural, en los mismos tipos celulares, en los mismos dominios celulares (cuerpos, prolongaciones y conos de crecimiento), pero no en los mismos acúmulos subcelulares.

Figura 12: Distribución de S25p-MARCKS y Cdk5 en el desarrollo de la retina neural. Imágenes de epifluorescencia de criosecciones transversales de ojos de embriones de pollo de 4 (A-C), 8 (D-F) y 19 (G-H) días de desarrollo, marcados con anticuerpos anti S25p-MARCKS (3C3) y anti Cdk5 (C8). Se muestra la región fúndica de la retina neural. cg: capa de células ganglionares, f: fotorreceptores, fno: capa de fibras del nervio óptico, ne: capa nuclear externa, ni: capa nuclear interna, pe: capa plexiforme externa, pi: capa plexiforme interna, rn: retina neural, rp: retina pigmentaria. Las cabezas de flecha indican neuronas en diferenciación en el borde vítreo de la retina de un embrión de E4. Barras: 50 μ m.

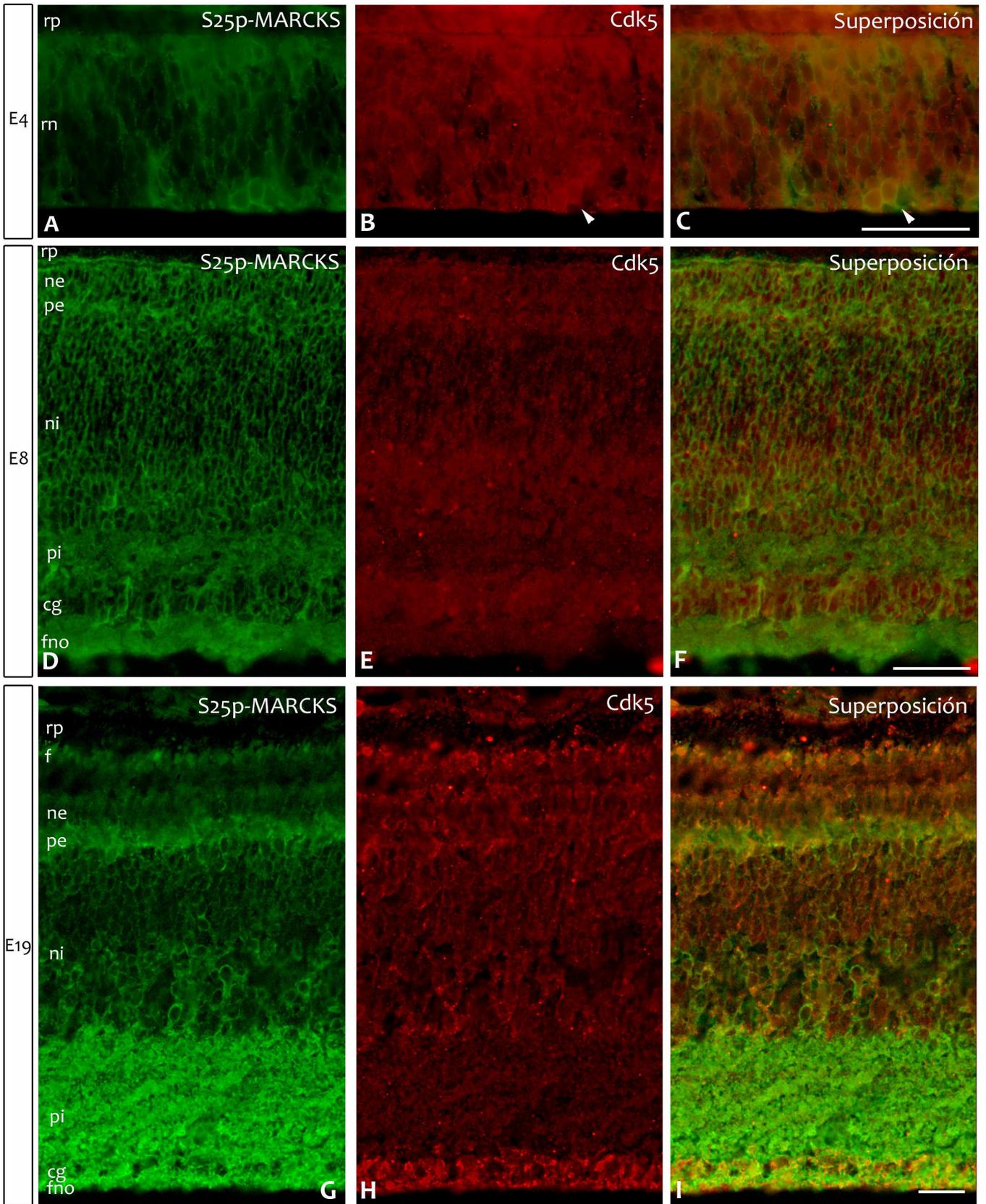
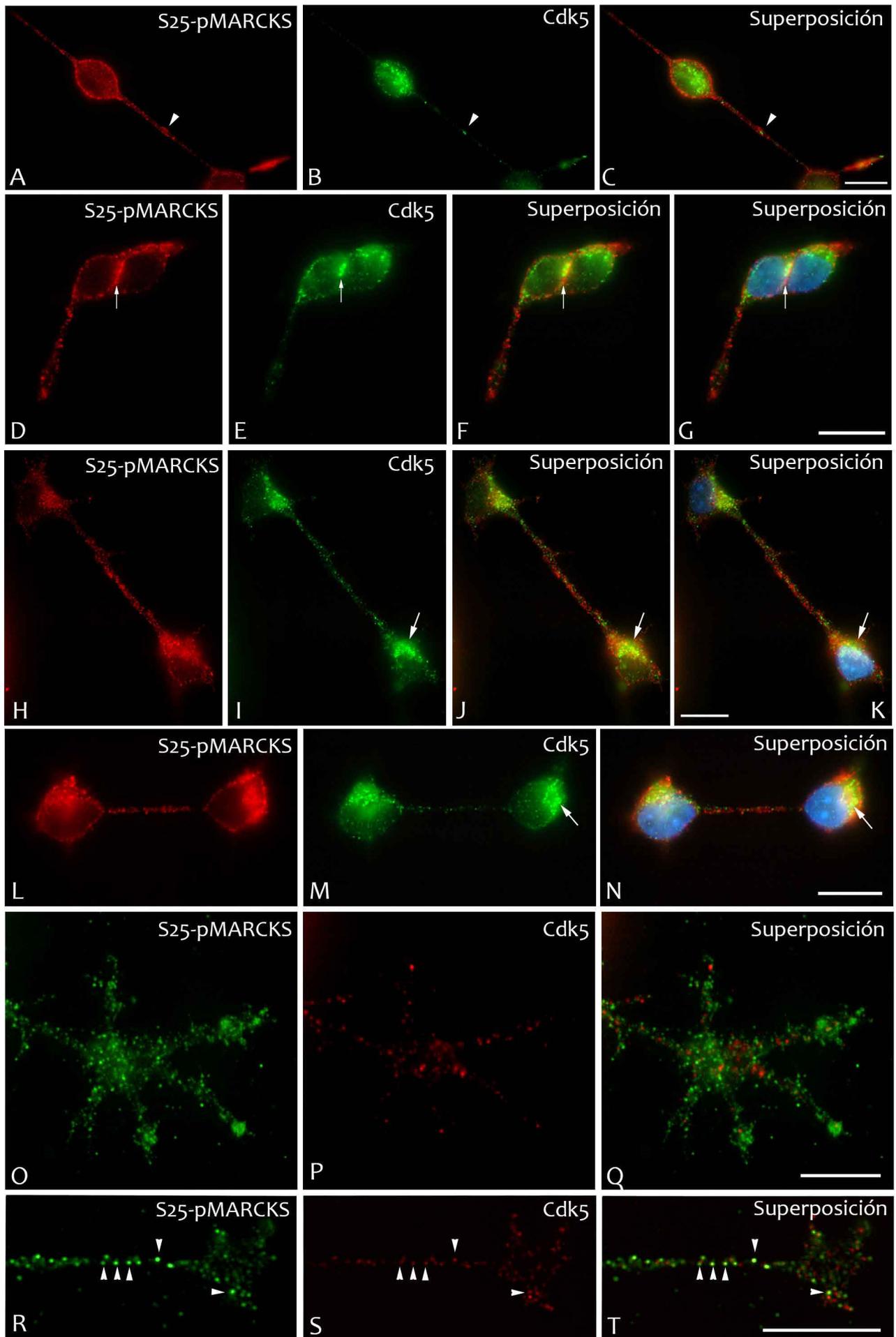


Figura 13: Emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS y Cdk5 en neuroblastos de la retina en cultivo. Células de la retina neural de embriones de pollo de E8 fueron cultivadas a baja densidad durante 3 *div* sobre poliornitina + laminina o poliornitina (O-Q) para luego realizar la inmunodetección de S25p-MARCKS y Cdk5. Los núcleos se marcan en azul con Hoeschst 33342. Imágenes de epifluorescencia de somas, neuritas y conos de crecimiento. (A-C) Las cabezas de flechas indican un acúmulo de Cdk5 a nivel del citoplasma de una neurita rodeado de acúmulos periféricos de S25p-MARCKS sin presentar puntos de codistribución. (D-G) Las flechas marcan el enriquecimiento de S25p-MARCKS a nivel del córtex celular en células en estrecha aposición, adyacente a un acúmulo de Cdk5. (H-N) Las flechas indican la acumulación citoplasmática de Cdk5, concentrada en una región perinuclear. (O-T) Imágenes de conos de crecimiento. Las cabezas de flecha marcan acúmulos con colocalización. Barras: 10 μm .



1.4) Efectos de la inhibición de la actividad de Cdk5 mediante tratamientos con roscovitina sobre el crecimiento neurítico

En las secciones previas determinamos que la inhibición de la actividad de Cdks en neuroblastos de la retina en cultivo, mediante tratamientos con inhibidores específicos como roscovitina u olomucina provocó un descenso en la fosforilación de la S25 de MARCKS, como evidenciáramos mediante Western-blot. Nos preguntamos entonces qué efectos tiene la inhibición de Cdk5 a nivel subcelular, tanto en cuanto a la fosforilación en la serina 25 como respecto a la organización del citoesqueleto en los neuroblastos en cultivo. Para contestar esta pregunta, realizamos cultivos de neuroblastos retinianos a los que tratamos con estos inhibidores de quinasas. Evaluamos mediante microscopía óptica de contraste de fase e IFI los efectos en la morfología celular, presencia y distribución de S25p-MARCKS y en la organización del citoesqueleto de actina y tubulina, así como de la proteína espectrina, estrechamente vinculada a la organización del citoesqueleto del córtex celular. En este punto debemos aclarar que estos resultados deben ser analizados a la luz de que estos inhibidores afectan la actividad de Cdk5 y por ende la fosforilación en *todos* sus sustratos, no solamente en MARCKS.

Realizamos cultivos de neuroblastos sobre poliornitina-laminina y los mantuvimos 3 *div*. Tratamos estos cultivos con roscovitina (25 μ M) durante 30 minutos, 1 o 2 horas, como describiéramos más arriba. Como primera aproximación observamos la ocurrencia de cambios a nivel de la adhesión celular, crecimiento neurítico, organización de colonias, etc. mediante contraste de fase (figura 14). En dichos cultivos constatamos que la roscovitina promueve un colapso de los conos de crecimiento y una retracción de las neuritas tanto en las células aisladas como en aquellas asociadas en colonias. En las imágenes de contraste de fase puede observarse que en los cultivos sin inhibidores la morfología de los conos de crecimiento, es variada encontrándose tanto conos con filopodios (figura 14 C-F), como con forma de clava (figura 14 A, E) e incluso colapsados. En los tratamientos de corta duración con roscovitina (1 a 30 minutos) no existe una modificación ostensible en la aparición de distintas estructuras de los conos de crecimiento (figura 14 G, H). No obstante, en tratamientos más prolongados, 1 y 2 horas, existe un pronunciado colapso de los conos de crecimiento y retracción neurítica. Fue muy difícil encontrar neuritas extendidas en estos cultivos, de las cuales se muestran algunas en la figura 14 G-L. Además se vio afectada la adhesión celular ya que encontramos un menor número de células aisladas asociadas al sustrato, aunque las asociadas a colonias parecieron soportar estos tratamientos, si bien presentaron una evidente desorganización, tal vez producto de deficiencias en la adhesión celular.

Por su parte, las IFI mostraron un descenso en la señal de S25p-MARCKS en concordancia con los resultados de Western-blot mostrados más arriba (figura 14 M-U). Como puede apreciarse en las proyecciones de máxima

intensidad de las imágenes confocales, el descenso fue más notorio en las células aisladas que permanecieron asociadas al sustrato que en las asociadas a colonias (figura 14 S-U). En estos tratamientos no observamos cambios evidentes en la cantidad u organización de la proteína MARCKS total (figura 14 M-U).

Como mencionáramos, varios blancos de Cdk5 están vinculados a la regulación de la organización del citoesqueleto celular, microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos (Laloti et al., 2010). Por tal motivo decidimos examinar si los tratamientos con roscovitina promueven cambios importantes en la organización del citoesqueleto además de los efectos antes mencionados sobre la fosforilación en la S25 de MARCKS. Realizamos con este fin IFI para detectar actina, tubulina y espectrina y las observamos mediante microscopia confocal. En muchos tipos celulares, la cantidad de actina soluble, es decir aquella que no forma parte de estructuras filamentosas, es casi tan alta como la que forma parte de los filamentos. Dado que utilizamos un anticuerpo que reconoce tanto F-actina como G-actina, convertimos las imágenes de microscopia confocal en LUTs (Look Up Tables) para poder distinguir con mayor facilidad la ocurrencia de sitios de acumulación de actina que podrían corresponder a estructuras filamentosas de diverso tipo. Comparando los cultivos no tratados y los tratados durante dos horas con roscovitina, no pudimos distinguir reordenamientos mayores de la actina en las células, aunque claramente sí los hubo sobre todo a nivel de las neuritas que se retrajeron, como se muestra en la figura 14. En estos mismos grupos celulares pudimos distinguir claramente la ocurrencia de una disminución de la fosforilación en la S25 de MARCKS, principalmente en las células localizadas en la periferia de la colonia en relación a las de localización central, y también una disminución en el número de prolongaciones neuríticas que proyectaba de cada grupo de células (figura 15 A). Tampoco encontramos eventos de reorganización del citoesqueleto microtubular o de la espectrina del citoesqueleto cortical, no al menos mediante la aproximación experimental y método de observación utilizados (figura 15 B y C). Sí, en cambio, logramos evidenciar mediante esta aproximación la reducción en la fosforilación en la S25.

Figura 14: Efectos de la inhibición de la actividad de Cdk5 sobre el crecimiento neurítico y la fosforilación en la S25 de MARCKS. Los cultivos de neuroblastos retinianos fueron mantenidos 3 *div* y tratados durante 30 minutos, 1 o 2 horas con Roscovitina 25 μM o DMSO al 0.1% en los controles. **(A-L)** Imágenes de microscopía de contraste de fases donde se observan prolongaciones neuríticas. **(M-U)** Imágenes de microscopía confocal de inmunodetecciones de S25p-MARCKS y MARCKS en colonias de neuroblastos y células aisladas tratadas con roscovitina y DMSO por 2 horas. Se muestran proyecciones de máxima intensidad correspondientes a todo el espesor de las colonias. m: glía de Müller. Barras: 20 μm .

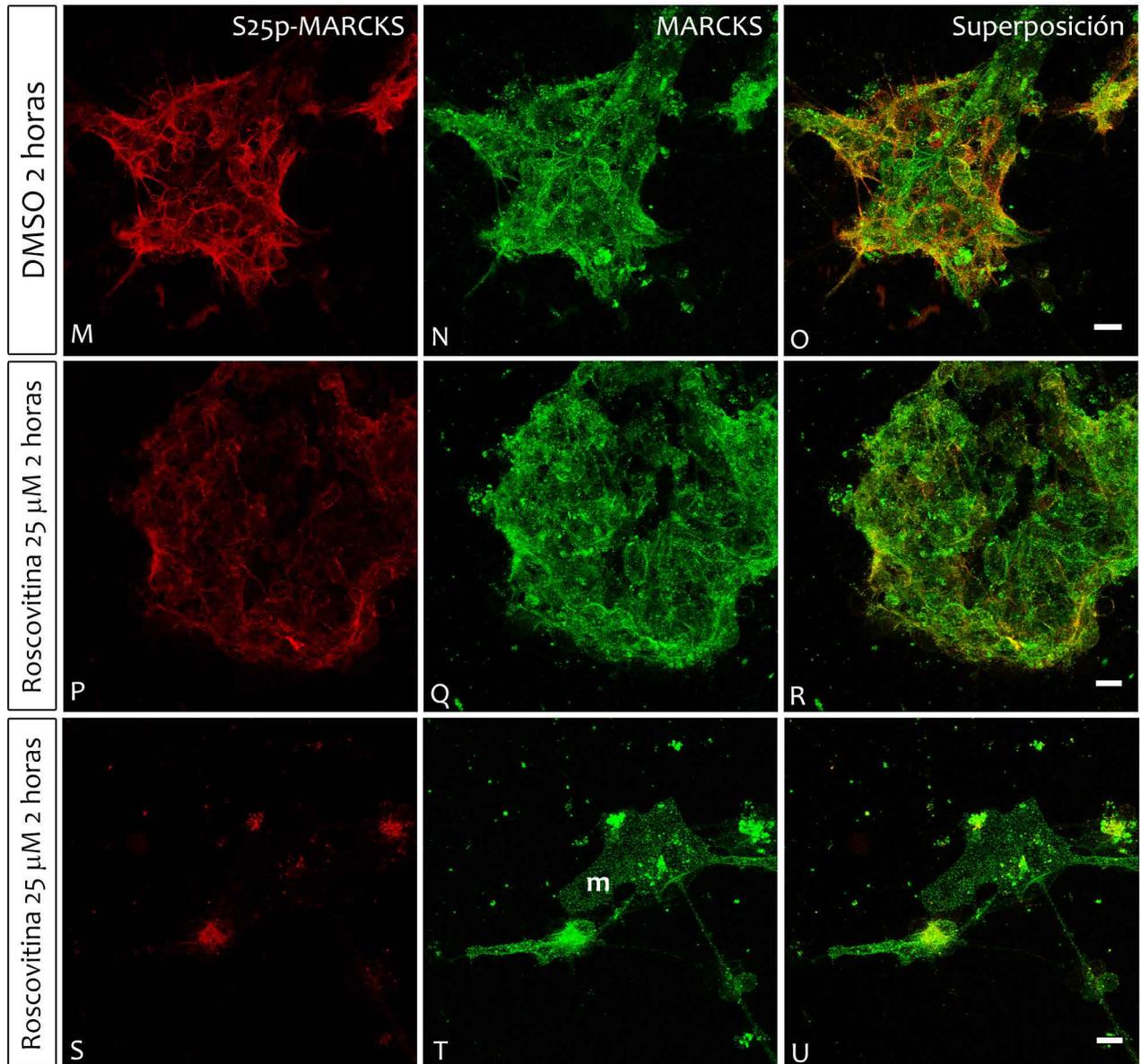
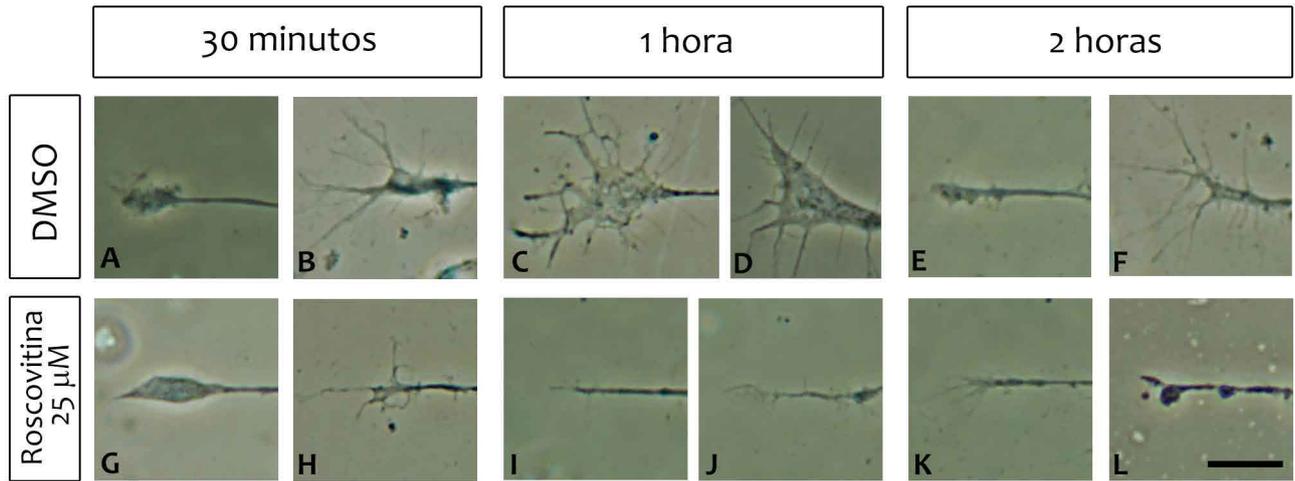
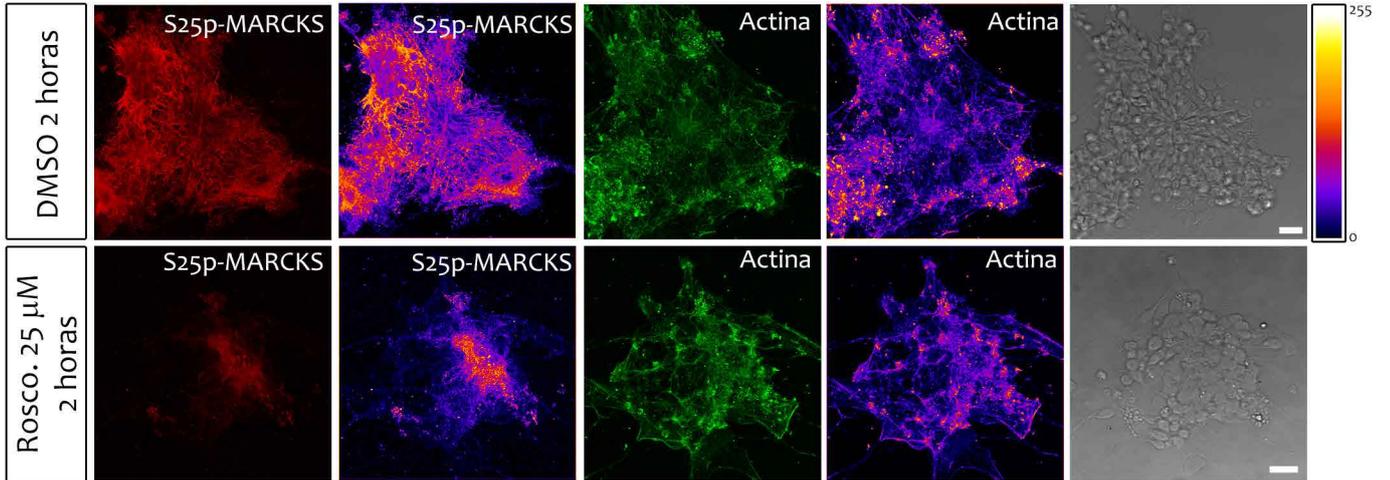
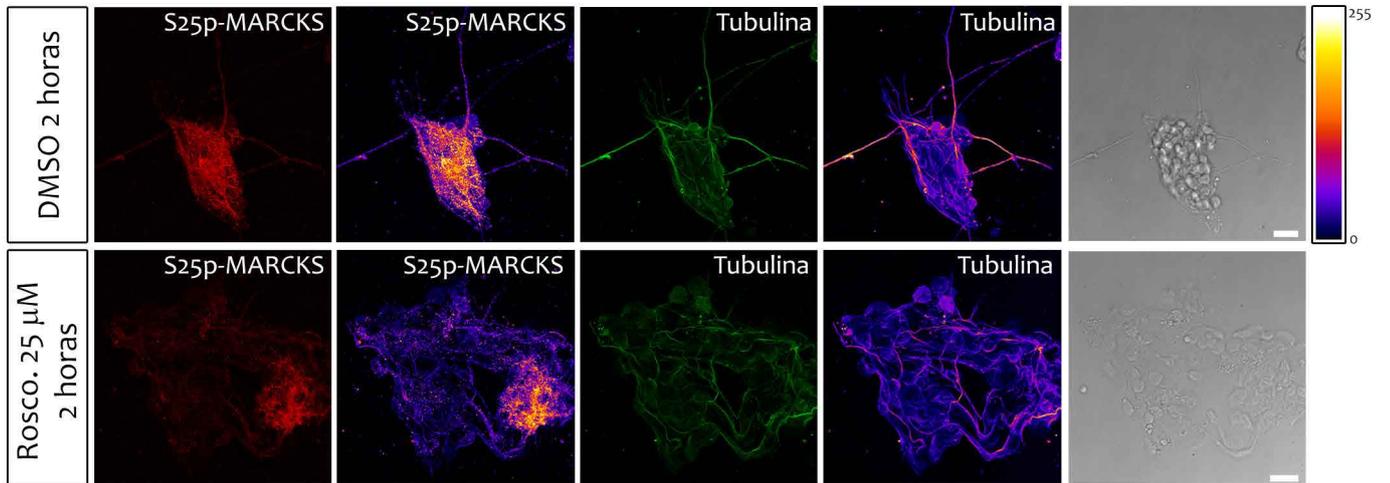
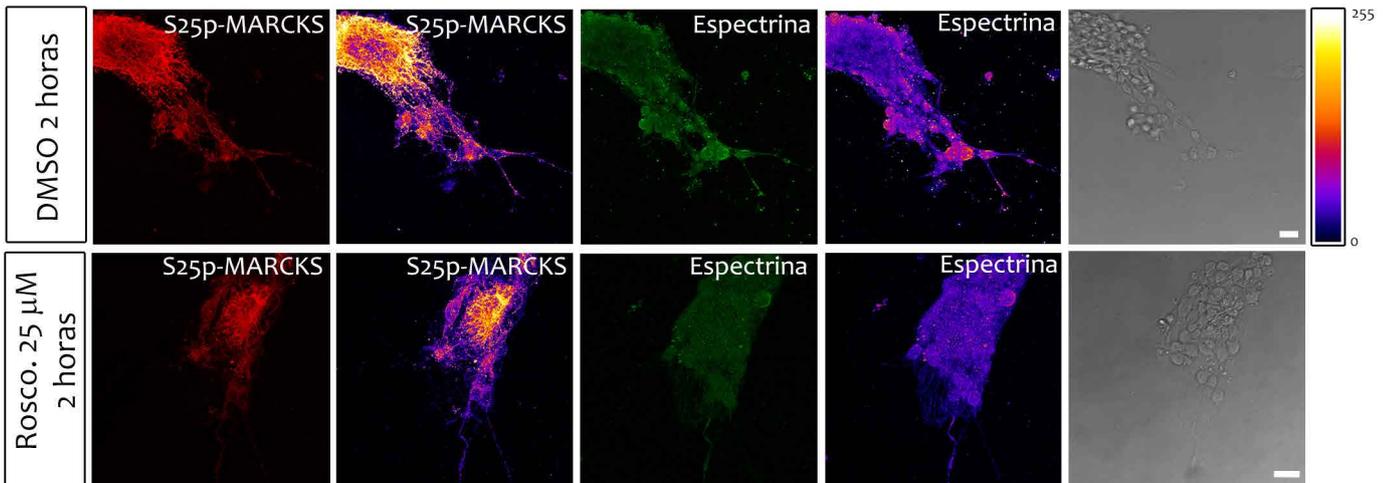


Figura 15: Efectos de la inhibición de la actividad de Cdk5 sobre la fosforilación en la S25 de MARCKS y la organización del citoesqueleto de neuroblastos en cultivo. Los cultivos de neuroblastos retinianos fueron mantenidos 3 *div* y tratados durante 2 horas con roscovitina 25 μM o DMSO al 0.1% en los controles. Se muestran proyecciones de máxima intensidad de IFI para S25p-MARCKS, actina, tubulina y espectrina y una imagen de campo claro de las colonias. Las proyecciones abarcan todo el espesor de las colonias celulares. A la derecha de cada inmunodetección se muestra el LUT para cada una de ellas (referencia de color a la derecha de cada fila de imágenes: 0 azul - 255 blanco). **(A)** Inmunodetección para S25p-MARCKS y actina. **(B)** Inmunodetección para S25p-MARCKS y tubulina. **(C)** Inmunodetección para S25p-MARCKS y espectrina. Barras: 20 μm .

A**B****C**

DISCUSION

MARCKS puede ser fosforilada por diversas quinasas, entre ellas PKC y quinasas dirigidas por prolina. Estas últimas son fosforilaciones no clásicas de la proteína de las cuales no se posee mucha información. La fosforilación de la S25 presenta una regulación que se acompasa con los principales eventos histogénicos en la retina. Para aproximarnos a su posible rol fisiológico, determinamos para empezar qué quinasas sería responsable de dicha fosforilación en neuroblastos retinianos.

- **La S25 de MARCKS puede ser fosforilada por Cdk5 en neuroblastos retinianos**

MARCKS ha sido previamente identificada como sustrato de quinasas dirigidas por prolina *in vivo* (Taniguchi et al., 1994). En particular, seis serinas seguidas de prolinas en el extremo aminoterminal de la proteína son fosforiladas por quinasas dirigidas por prolina. La serina 27 de MARCKS recombinante a partir de la secuencia humana es fosforilada *in vitro* por Cdk2, aunque no se aportaron evidencias *in vivo* al respecto (Manenti et al., 1999). La comparación de las secuencias de MARCKS en vertebrados comprendidas entre la serina 25 y el ácido glutámico 49 (en pollo) mostró un alto grado de conservación en esta zona denominada MH2 y cuyo rol fisiológico hasta el momento no ha sido develado. En esta región se encuentra el único sitio de splicing conocido en la proteína, lo cual podría explicar parcialmente el alto grado de conservación de dicha secuencia (Arbuzova et al., 2002). En particular en esta región detectamos la presencia de una secuencia consenso para fosforilación por quinasas dirigidas por prolina "VAASPSK", la cual se encontró como altamente conservada en las secuencias analizadas, exceptuando únicamente los genes duplicados que encontramos en algunas especies de teleosteos (datos no mostrados). En particular en pez cebra, se han descrito dos secuencias de MARCKS (a y b), de las cuales solamente MARCKSa presenta la secuencia "VAASPSK" mientras que MARCKSb no, por otra parte, esta última tiene mayor divergencia respecto a las secuencias de MARCKS encontradas en otros vertebrados (Prieto, 2012).

El alto grado de conservación encontrado en la región circundante a la S25 sugeriría que se trata de un sitio de relevancia fisiológica. Además de este residuo de serina, solamente otras dos serinas seguidas de prolina (S44 y S93 de pollo) y dos residuos de treonina seguidos de prolina (T108 y T115 en pollo), localizadas en la mitad aminoterminal presentaron alta conservación en todas las especies analizadas. Por otro lado, en mamíferos, al

menos dos serinas de la mitad aminoterminal se encuentran altamente conservadas, pudiendo tratarse también de blancos de quinasas dirigidas por prolina.

Solamente los tratamientos con los inhibidores específicos de Cdks (roscovitina y olomucina) fueron capaces de reducir la fosforilación en la S25 de MARCKS tanto en cultivos recientemente explantados como en cultivos de 3 *div*, sugiriendo que Cdk5 es capaz de fosforilar a MARCKS en neuroblastos retinianos. Este es el mismo sitio descrito por Manenti en humanos (S27) que fuera identificado fosforilado por cdk2 en ensayos *in vitro* (Manenti et al., 1999). No descartamos que otros sitios de la proteína MARCKS sean fosforilados por la misma quinasa ya que al menos diez sitios contienen la secuencia mínima (SP) de fosforilación por esta quinasa (no reconocidas por el Acm 3c3), si bien la secuencia blanco completa comprende SPSK, la cual solo se localiza en torno a la S25. Además, estudios *in vitro* han demostrado que la estequiometría de la fosforilación por Cdk5 es baja, sugiriendo que no son muchos los sitios fosforilados por dicha enzima (Yamamoto et al., 1995). Experimentos *in vitro* con MARCKS, Cdk5 y p35 purificadas, hasta el momento no realizados, podrían aportar información complementaria y concluyente a nuestros hallazgos. Asimismo, combinando estos experimentos con espectrometría de masa, podría llegar a identificarse si es posible la ocurrencia de fosforilaciones por Cdk5 distintas a la que tiene lugar en la S25. En la misma línea de razonamiento, se puede llegar a determinar si la fosforilación en la S25 necesita de una fosforilación previa en otro residuo para tener lugar. Se ha encontrado que la fosforilación por PKC en el ED facilita la fosforilación de la S27 en humanos (Manenti et al., 1999). Justamente en las células que estudiamos (neuroblastos retinianos), como veremos más adelante, se da el caso opuesto (Capítulo III). También podemos afirmar que no es necesaria la fosforilación en algún sitio por GSK-3 β para que tenga lugar la fosforilación en la S25, ya que al inhibir dicha enzima no encontramos una reducción de la fosforilación en la S25. Este efecto fue observado en Tau, donde la fosforilación por Cdk5 es necesaria para que tenga lugar la fosforilación por GSK-3 β (Li et al., 2006). Experimentos sobre células en donde se inhiba la actividad de Cdk5 con ARNi o una mutante dominante negativa, pueden aportar datos concluyente sobre si Cdk5 es la única quinasa que fosforila la S25, descartando así la posible ocurrencia de efectos de las drogas sobre otros miembros de la familia de las Cdks cuya actividad en neuronas postmitóticas no ha sido descrita hasta el momento.

En este sentido, es importante aclarar que como parte de los objetivos iniciales de esta tesis se encontraba la expresión proteínas MARCKS mutantes y realizar tratamientos con ARNi en neuroblastos retinianos en cultivo. Se intentaron varias aproximaciones experimentales entre ellas la transfección con Lipofectamina™, fosfato de calcio e incluso transducciones con partículas virales (como se describe en el Apéndice II de esta tesis). Lamentablemente ninguna de estas aproximaciones fue exitosa ya que se lograron niveles de transfección muy bajos y altos índices de mortalidad neuronal. Por consiguiente consideramos que deben explorarse otras

alternativas para la introducción de ADN en este tipo de células (por ejemplo electroporación) o bien intentar la expresión en líneas celulares de tipo neuronal (por ejemplo PC12 o SH-5YSY). En nuestro laboratorio se ha abordado el estudio de la funcionalidad de MARCKS mediante ensayos de pérdida de función por bloqueo de la traducción del ARNm microinyectando oligonucleótidos de morfolino antisentido de MARCKS en embriones de pez cebra. Esta estrategia permitió identificar diferencias en la funcionalidad de las dos variantes de MARCKS presentes en esta especie. Los morfantes de MARCKSa (variante que posee la secuencia “SPSK”) tienen un tamaño corporal menor, microencefalia, microftalmia y edema del pericardo. Por otro lado, los morfantes de MARCKSb presentaron una alteración más severa con un mayor retraso general del desarrollo, menor longitud del cuerpo, edema del tercer y cuarto ventrículo y malformaciones oculares como por ejemplo retraso en la laminación de la retina (Prieto, 2012). Una aproximación similar podría utilizarse para dilucidar algunas de las funciones de la fosforilación en la S25. Mediante morfolinós puede inhibirse la expresión de MARCKSa y puede intentarse rescatarse dicho fenotipo con variantes no fosforilables o hiperfosforiladas de MARCKS en la S25.

- **S25p-MARCKS y Cdk5 se localizan en neuroblastos postmitóticos en la retina**

Como mencionáramos, Cdk5 es una quinasa con una importante participación durante el desarrollo del sistema nervioso (Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008; Lalioti et al., 2010). La eliminación de su gen o el de p35 o p39 determina una desorganización de la corteza cerebral dada la imposibilidad de migración de los progenitores (Ohshima et al., 1996). En particular se han evidenciado deficiencias en la migración radial de las neuronas, así como defectos en la transición multipolar-bipolar que se da cuando la neurona ha alcanzado su destino (Ohshima et al., 2007). Un fenotipo o defectos similares se detectaron en los ratones *knock-out* para MARCKS, en particular en la proliferación de los progenitores y en la polaridad de la glia radial, fundamental para la orientación en la correcta migración de los precursores neuronales (Weimer et al., 2009). Estas evidencias indican claramente que tanto la actividad de MARCKS como la de Cdk5 son fundamentales en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso, en particular en la migración de precursores neuronales en la corteza cerebral y por consiguiente en su laminación. Sin embargo, no encontramos fosforilación en la S25 de MARCKS en las células del neuroepitelio de la retina, si bien están presentes tanto la quinasa como el sustrato. Un fenómeno similar encontramos en estadios más avanzados del desarrollo ocular, en donde tanto MARCKS como Cdk5 se encuentran presentes, y sin embargo no tiene lugar la fosforilación de la S25. Además, en el epitelio de la córnea y en el cristalino embrionario de pollo, demostramos la presencia de MARCKS y Cdk5 pero no de la forma fosforilada en la S25. Si bien inicialmente se había considerado que Cdk5 solo tenía actividad en neuronas, más recientemente se ha determinado que esta quinasa cumple funciones similares en células no neuronales (Tripathi y Zelenka, 2009). En

particular, se ha visto que participa en el fortalecimiento de las interacciones célula-sustrato y célula-célula, así como en la migración celular en la córnea y el cristalino (Zelenka, 2004; Tripathi y Zelenka, 2009; Arpitha et al., 2013). Podemos especular acerca de los posibles mecanismos que impidan la fosforilación de MARCKS por Cdk5 en estos tejidos en los cuales ambas están presentes. Entre ellos podemos citar la activación de Cdk5 por vías o cascadas de señalización que no promuevan la fosforilación de MARCKS. Son varias las vías de activación de Cdk5 y las cascadas de activaciones-inhibiciones que se desencadenan a partir de ella dependiendo del tipo neuronal y del momento en el desarrollo (Lalioi et al., 2010), por lo que puede ser factible que alguno/s de los miembros de la cascada de señalización que determinan la fosforilación en la S25, no se expresen o no estén activos en dichas células. En el mismo sentido, puede tratarse de la ausencia del activador correcto de Cdk5 para que tenga lugar la fosforilación en la S25 de MARCKS. La actividad de Cdk5 se determina en primer lugar de acuerdo al nivel de expresión de sus activadores las proteínas p35 y p39, que presentan un patrón de expresión temporal complementario, pero solo se localizan en el sistema nervioso, asociados a la membrana plasmática, mientras que Cdk5 no parece tener una localización particular sino que depende de su asociación a sus activadores y sustratos (Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008). p39 presenta un 57% de homología con p35 y posee un inserto de 32 aminoácidos en el dominio carboxilo terminal ausente en p35. El mismo se concentra en los lamelipodios y filopodios de conos de crecimiento axónico en asociación directa con la membrana plasmática y el citoesqueleto cortical de actina (Humbert et al., 2000). Existe un fragmento producto del clivaje proteolítico por calpaína de p35 que genera el segmento p25, que posee una mayor vida media que p35 y también puede activar a Cdk5, aunque se lo ha vinculado a procesos patológicos y no a la fisiología normal de la enzima (Patrick et al., 1998). Cabe preguntarse entonces cuál de estos complejos es responsable de fosforilar a MARCKS? En nuestros experimentos no pudimos determinar la colocalización de ninguno de estos activadores debido a impedimentos técnicos derivados de las características de los anticuerpos comerciales disponibles. Algunos análisis *in silico* utilizando las secuencias de p35 y p39 de mamíferos permitieron identificar solamente una secuencia con 81% de identidad en pollos correspondiente a p35, pero ninguna secuencia con similitud con p39, lo que indicaría que en pollos no se encuentra este último (Hahn et al., 2005). Sin dudas el uso de anticuerpos específicos contra p35, p25 y eventualmente p39, tanto en co-inmunoprecipitaciones como IFI podría dar información importante acerca de la identidad de este complejo. Además ensayos *in vitro* con el sustrato, la quinasa y sus activadores purificados pueden indicar si cualquier complejo es capaz de fosforilar a MARCKS o si existen diferencias entre ellos, por ejemplo en eficiencia o selectividad frente al sustrato. Por otro lado, no podemos descartar que durante las primeras etapas del desarrollo o en algunos tejidos determinados, MARCKS interactúe con alguna proteína, hasta el momento no identificada, que enmascare o proteja el sitio de fosforilación por Cdk5. Como indicáramos,

MARCKS es una proteína naturalmente desplegada lo que la hace particularmente plástica para interactuar con diversas moléculas, y puede constituir un sustento para esta hipótesis (Uversky y Dunker, 2010).

Dado que la presencia de S25p-MARCKS se evidencia en estadios del desarrollo posteriores al descrito en el párrafo anterior, cuando las neuronas alcanzan su destino definitivo, ya sea en la corteza cerebral o la retina, etc., centramos nuestros análisis justamente en esta ventana temporal. Los procesos ligados a la diferenciación neuronal, entre ellos el crecimiento neurítico, también están regulados tanto por MARCKS como por Cdk5 (Shiraishi et al., 2006; Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008). Es en estos estadios en donde evidenciamos que la inhibición farmacológica de Cdk5 promueve una reducción en la fosforilación en la S25. Asimismo, confirmamos que ambas proteínas se organizan en acúmulos de membrana localizados tanto en el soma, como en las dendritas y conos de crecimiento, como ya fuera descrito (Zolessi, 2003; Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008). Sin embargo, si bien se encuentran en las mismas regiones celulares, no colocalizan a nivel subcelular ya que los acúmulos de membrana de S25p-MARCKS se localizan de manera más periférica que los de Cdk5. Si bien los activadores de Cdk5 son proteínas de asociación a la membrana al igual que MARCKS dada la presencia de un ácido mirístico, la localización de Cdk5 es variable y depende tanto de la localización de sus activadores como de la de sus sustratos (Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008), por lo que podemos suponer que la interacción enzima-sustrato ocurre de manera rápida, probablemente en la periferia celular y por tanto existirían pocos eventos de colocalización evidenciables por IFI. Por tanto al encontrarlas en las mismas regiones celulares, aunque no exactamente en los mismos parches puede considerarse otra evidencia que apoya nuestra hipótesis.

Llamativamente, encontramos una importante acumulación de MARCKS en las zonas de contacto célula-célula en pequeños acúmulos de neuroblastos explantados, producto, posiblemente de una disgregación incompleta. En algunos casos, en la región adyacente encontramos una gran concentración de la enzima Cdk5 lo que podría explicar la intensa señal de la variante fosforilada en la S25. No obstante, y como hemos discutido hasta ahora, sería necesario además verificar la presencia de alguno de sus activadores. Además, nos resultó interesante que estos sitios de enriquecimiento de MARCKS y S25p-MARCKS resultaron resistentes a los tratamientos con los inhibidores de Cdk5. ¿Qué eventos pueden estar regulando la resistencia de los acúmulos de S25p-MARCKS en las células centrales de la colonia? Un posible mecanismo que explicaría este hallazgo es que tal vez la droga experimenta dificultades para acceder a las células más internas de la colonia. Dado que la misma está disuelta en DMSO, es probable que se vaya adsorbiendo a la superficie celular a medida que penetra en la colonia por lo que la concentración efectiva de droga que accede a las células del centro resulta menor que la que accede a las de la superficie. Por otro lado, la fosforilación de la S25 en estas células podría ser de alguna manera más estable o con menor tasa de recambio en cuanto a que se limita la accesibilidad de fosfatasa a la región del córtex celular en

donde se encuentra MARCKS y que se encuentra altamente organizada por la presencia de uniones intercelulares. Resulta interesante que un hallazgo similar tuvo lugar en células de la córnea, en donde Cdk5 se acumula en las uniones intercelulares, en las zonas enriquecidas con E-Cadherina. En estas células no neurales, Cdk5 es fundamental para el mantenimiento de las uniones inter-celulares, fenómeno que también podría tener lugar en algunos tipos neuronales como las neuronas retinianas (Arpitha et al., 2013).

A nivel tisular, en particular en la retina neural en desarrollo, encontramos que Cdk5 presenta una distribución más amplia que S25p-MARCKS, particularmente, no encontramos capas en las que estuviese presente S25p-MARCKS pero no Cdk5. Llamativamente la capa de fibras de nervio óptico presentó altas concentraciones de ambas. En embriones de pollo de 6 días de desarrollo se ha demostrado que existe un enriquecimiento de Cdk5 y también su activador p35 en la capa de fibras del nervio óptico y ambas proteínas tienen un pico de expresión en la etapa de mayor crecimiento neurítico de la retina (Hahn et al., 2005). Los axones de las células ganglionares presentes en esta capa deben navegar grandes distancias, abandonar el ojo y proyectar hacia sus blancos en centros superiores como el tectum óptico (proyección retino-tectal). Para hacerlo, estos axones deben seguir señales presentes en el ambiente que guían (atraen o repelen) su migración. En general los sustratos de Cdk5 están relacionados con la remodelación de la morfología y la motilidad celular, la mayoría de los cuales forman parte del citoesqueleto o pertenecen a vías de señalización que median su regulación. Entre ellos podemos destacar los neurofilamentos, MAP1B, MAP2, Rac, PAK, p27, WAVE, β -catenina, nudel, Tau, DARPP-32, etc. (Smith et al., 2001; Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008). Cdk5 ha sido implicada en la respuesta de estos axones retinianos de pollo, frente a la repulsión inducida por la ephrina A-5 y por la semaforina 3A (Sasaki et al., 2002; Cheng et al., 2003). En ambos casos tiene lugar una fosforilación activadora en la tirosina 15 de Cdk5. ¿Pero cómo media Cdk5 la respuesta de repulsión? A través de varias vías Cdk5 puede modular el citoesqueleto, principal responsable de las respuestas de repulsión o atracción axónico. Frente a una señal repulsiva como ephA-5 o Sema3A, Cdk5 se activa e inhibe la vía Rho-Rac, quien por su parte regula la actividad de efectores como LIM-kinasa o cofilina, reguladores de la dinámica de actina (Nikolic et al., 1998; Cheng et al., 2003). Tal vez otro de los efectores de la vía de activación de Cdk5 en lo referente a la regulación del citoesqueleto de actina sea MARCKS, quien ya ha sido vinculada a la respuesta frente a la Sema3A en axones del ganglio de la raíz dorsal (Gatlin et al., 2006).

- **La inhibición de la actividad de Cdk5 en neuroblastos de la retina provoca retracción neurítica**

Por último, quisimos evidenciar si la inhibición de la actividad de Cdk5 tiene efectos a nivel de la morfología celular o el crecimiento neurítico en neuroblastos en cultivo. Las evidencias acumuladas hasta el momento indican

claramente que Cdk5 participa en la reorganización del citoesqueleto vinculado al movimiento celular y a la guía de protrusiones celulares, como las neuritas. En nuestros experimentos, los tratamientos con roscovitina 25 μ M provocaron un marcado colapso de los conos de crecimiento, similar a lo encontrado en cultivos más jóvenes (E6) realizados sobre laminina y en otros tipos neuronales (Harada et al., 2001; Hahn et al., 2005). En dichos cultivos además del mencionado colapso del cono de crecimiento, se apreció la retracción de las neuritas, dejando tras de sí una delgada fibra de retracción. En las condiciones de nuestros experimentos evidenciamos, además, una pérdida de la fosforilación en la S25 que comenzaba en los procesos celulares y luego se extendía al soma de las neuronas, principalmente en las ubicadas en la periferia de las colonias. El colapso del cono de crecimiento y la retracción neurítica pueden estar relacionados tanto con fenómenos de reordenamiento del citoesqueleto o con cambios en el patrón de adhesión celular a nivel neurítico. En ambos procesos se ha evidenciado la actividad reguladora de Cdk5 (Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008). Considerando a MARCKS un nuevo sustrato de Cdk5, es posible que esté vinculada a estos procesos en relación a su fosforilación en la S25. Sin embargo, en este trabajo no presentamos evidencia causal de que sea efectivamente la ausencia de la fosforilación en la S25 la que está vinculada con la manifestación morfológica que observamos en los neuroblastos retinianos. De hecho, posiblemente se trate de un fenómeno multicausal promovido por alteraciones en el nivel de fosforilación de diversos sustratos de Cdk5. Podríamos sin embargo, intentar inhibir la actividad de Cdk5 mediante tratamientos farmacológicos sobre cultivos celulares y rescatar el fenotipo expresando una variante de MARCKS fosfomimética de la S25. Solamente de esta manera podríamos establecer la vinculación directa entre la fosforilación en la S25 de MARCKS y los fenómenos de retracción neurítica.

Estos resultados en conjunto muestran claramente que la inhibición de la actividad de Cdk5 provoca una reducción en la fosforilación de la S25 de MARCKS al inducir probablemente un desbalance entre las actividades de fosforilación de Cdk5 y desfosforilación a cargo de alguna fosfatasa celular. De esta manera estos hallazgos, en conjunción con la información bibliográfica disponible respecto a las Cdk5 en neuroblastos, constituyen una de las primeras evidencias de la capacidad de Cdk5 de fosforilar a MARCKS *in vivo* durante la diferenciación neuronal.

Nota: Los resultados presentados en este capítulo son parte del artículo publicado Toledo A, Zolessi FR, Arruti C (2013) A Novel Effect of MARCKS Phosphorylation by Activated PKC: The Dephosphorylation of Its Serine 25 in Chick Neuroblasts. PLoS ONE 8(4): e62863.

CAPÍTULO II

¿Componentes de la matriz extracelular y/o factores de crecimiento son promotores de la fosforilación en la S25?

Búsqueda de interactores moleculares de MARCKS.

Una vez identificada la quinasa responsable de la fosforilación en la S25, nos propusimos buscar señales que puedan promover la activación de mecanismos que concluyen en la fosforilación de la S25. El objetivo de este capítulo fue analizar si algunos componentes de la matriz extracelular (MEC) o moléculas de elevada capacidad adhesiva y promotoras del crecimiento neurítico, tienen la capacidad de modular la localización subcelular y/o el nivel de fosforilación de MARCKS en la S25 en neuroblastos aislados de retina. Además buscamos si algunas moléculas conocidas por su participación en eventos que ocurren en la región subplasmalémica (córtez) de neuroblastos codistribuyen con S25p-MARCKS. También se exponen algunos resultados de la búsqueda de posibles interactores moleculares de esta forma fosforilada de MARCKS.

RESULTADOS

2.1) Aparición y etapas iniciales de la fosforilación de MARCKS en la serina 25 en neuroblastos retinianos: efectos de la laminina.

Tiempo atrás demostramos que los niveles de S25p-MARCKS decaen de manera apreciable luego de la disociación de las células de la retina y que aumentan una vez que las células se han adherido, incrementándose en función del tiempo de cultivo, para alcanzar valores elevados a las 24hs post-explantación (Toledo y Arruti, 2009). Este proceso nos permitió diseñar experimentos para evaluar si la presencia de una proteína de la MEC del sistema nervioso (en este caso laminina), propuesta como sustrato a los neuroblastos explantados, modificaba alguna característica de la variante fosforilada en la S25 de MARCKS. Para ello, las células aisladas de retina de embriones de pollo de 8 días de desarrollo se explantaron sobre sustratos de laminina adsorbida directamente al vidrio o a poliornitina. En otras situaciones se utilizó solo poliornitina. Las células disociadas se sembraron a muy baja o

media densidad (20.000 células/cm²), se incubaron y fueron examinadas luego de 1, 3, 6 y 9 horas de cultivo. Los exámenes se hicieron por microscopía de contraste de fases y por IFI, usando microscopías de epifluorescencia o laser confocal.

Sobre poliornitina las células permanecieron redondeadas más tiempo que sobre laminina (aproximadamente 3 horas más), indicando que la laminina favorece la adhesión y expansión ("spreading") de las células (figura 16 E, O), pero en ambas condiciones el crecimiento neurítico se inició aproximadamente al mismo tiempo, luego de las 6 horas de cultivo, aunque las células tenían mayor longitud neurítica en laminina (figuras 16, 17, 18). Si bien se registró señal intensa de MARCKS total en todos los casos y desde los menores tiempos observados (1 hora) su distribución fue diferente, siendo principalmente citosólica en poliornitina y mayoritariamente periférica en laminina (figura 16 E, O). S25p-MARCKS presentó niveles muy bajos durante las primeras 6 horas (figura 17), existiendo células y grupos celulares que presentaban señal intensa de MARCKS pero carecían o tenían muy baja señal de S25p-MARCKS, como puede apreciarse en las imágenes a bajo aumento de los cultivos (figuras 16, 17, 18). La aparición de S25p-MARCKS fue más precoz en las células cultivadas sobre laminina respecto a las cultivadas sobre poliornitina. También la forma y el tamaño de los parches fue diferente, siendo mayores y de límites más definidos sobre laminina. Sobre laminina el crecimiento de neuroblastos aislados fue menor que el de neuroblastos agrupados en colonias (figuras 16, 17, 18, 19). En estos grupos de células, especialmente en aquellos pequeños compuestos por dos o tres células, presumiblemente derivados de una disgregación incompleta, se observó siempre la persistencia de S25p-MARCKS en la región de estrecho contacto célula-célula (figuras 16, 17). Estos resultados son coherentes con lo que describimos previamente en acúmulos multicelulares (Toledo y Arruti, 2009).

La laminina, para provocar estos efectos, debe estar adsorbida. Los experimentos hechos con laminina soluble aplicada sobre células en suspensión, resultaron francamente citotóxicos, comprobándose un hecho que es conocido por los cultivadores de células y tejidos. No encontramos, sin embargo, diferencias en el plano basal y medio de las células en cuanto a la cantidad de MARCKS o S25p-MARCKS, como muestran las imágenes de microscopía confocal (figura 20).

Estos resultados estarían sugiriendo que la laminina podría modular un sistema de reorganización de componentes del córtex neuroblástico o activar el complejo de Cdk5 que favorecería la aparición de la fosforilación de MARCKS en la S25. Esta conjetura tiene un apoyo adicional en el hecho de haber encontrado que no habría una singularización territorial restringida a la zona celular en contacto directo con la laminina.

Figura 16: Fosforilación *de novo* de MARCKS en la S25 en neuroblastos de la retina de embriones de E8, luego de 1 hora de explantación sobre distintos sustratos adhesivos. Imágenes de epifluorescencia de la inmunodetección de MARCKS, S25p-MARCKS y marcado nuclear con Hoechst 33342. **(A-J)** Cultivos sobre poliornitina-laminina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La flecha se señala la zona de enriquecimiento de MARCKS y S25p-MARCKS en células en estrecha aposición. **(K-P)** Cultivos sobre poliornitina al 0.01%. Barras: 50 μm (A-C, K-M), 10 μm (D-J, N-P).

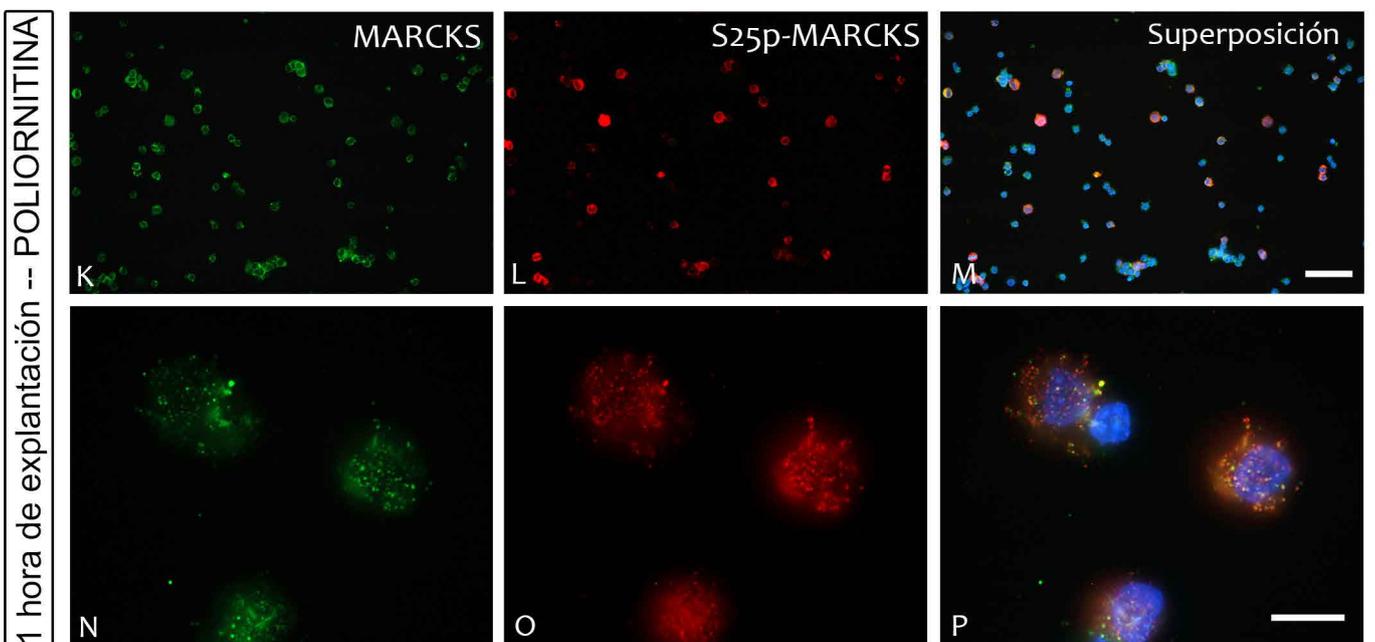
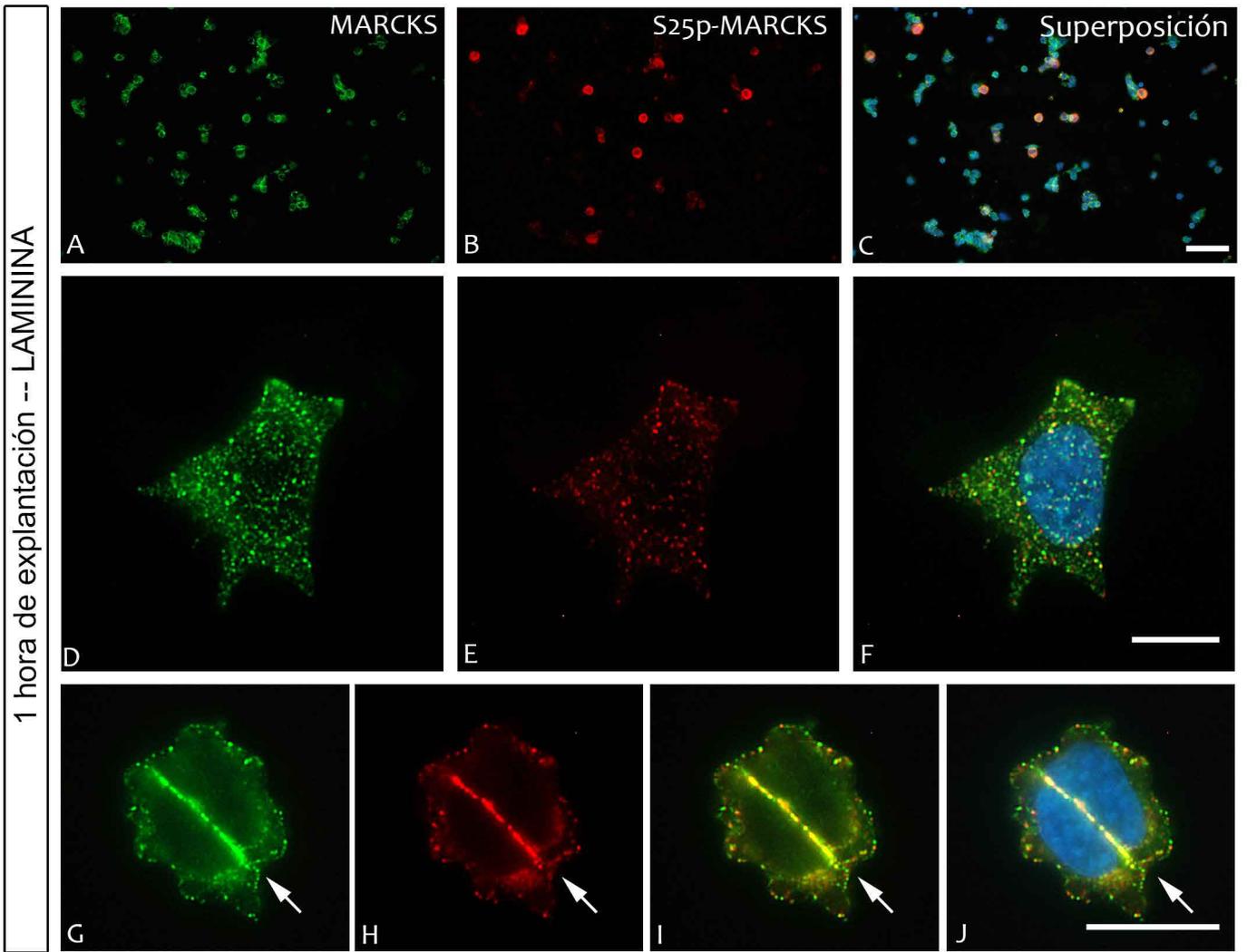


Figura 17: Fosforilación *de novo* de MARCKS en la S25 en neuroblastos de la retina de embriones de E8, luego de 3 horas de explantación sobre distintos sustratos adhesivos. Imágenes de epifluorescencia de la inmunodetección de MARCKS, S25p-MARCKS y marcado nuclear con Hoechst 33342. **(A-K)** Cultivos sobre polionitina-laminina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La flecha se señala la zona de enriquecimiento de MARCKS y S25p-MARCKS en células en estrecha aposición. **(L-R)** Cultivos sobre poliornitina al 0.01%. Barras: 50 μm (A-C, I-N), 10 μm (D-K, O-R).

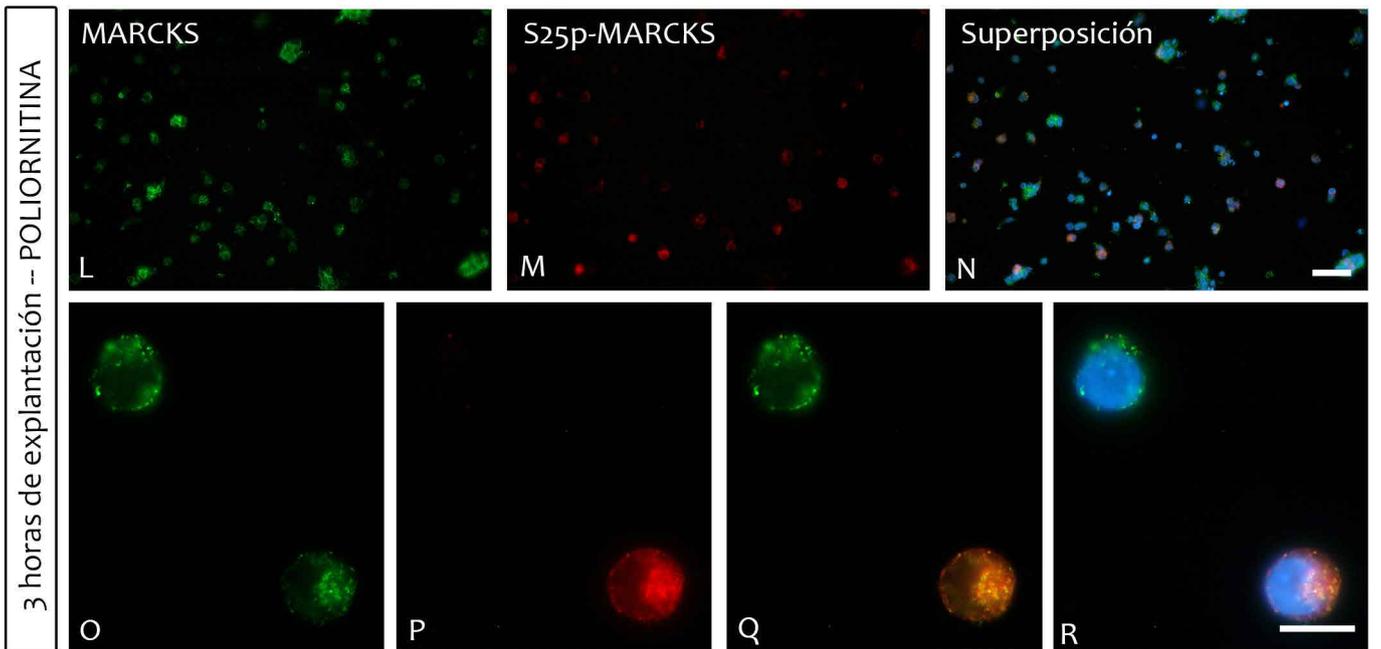
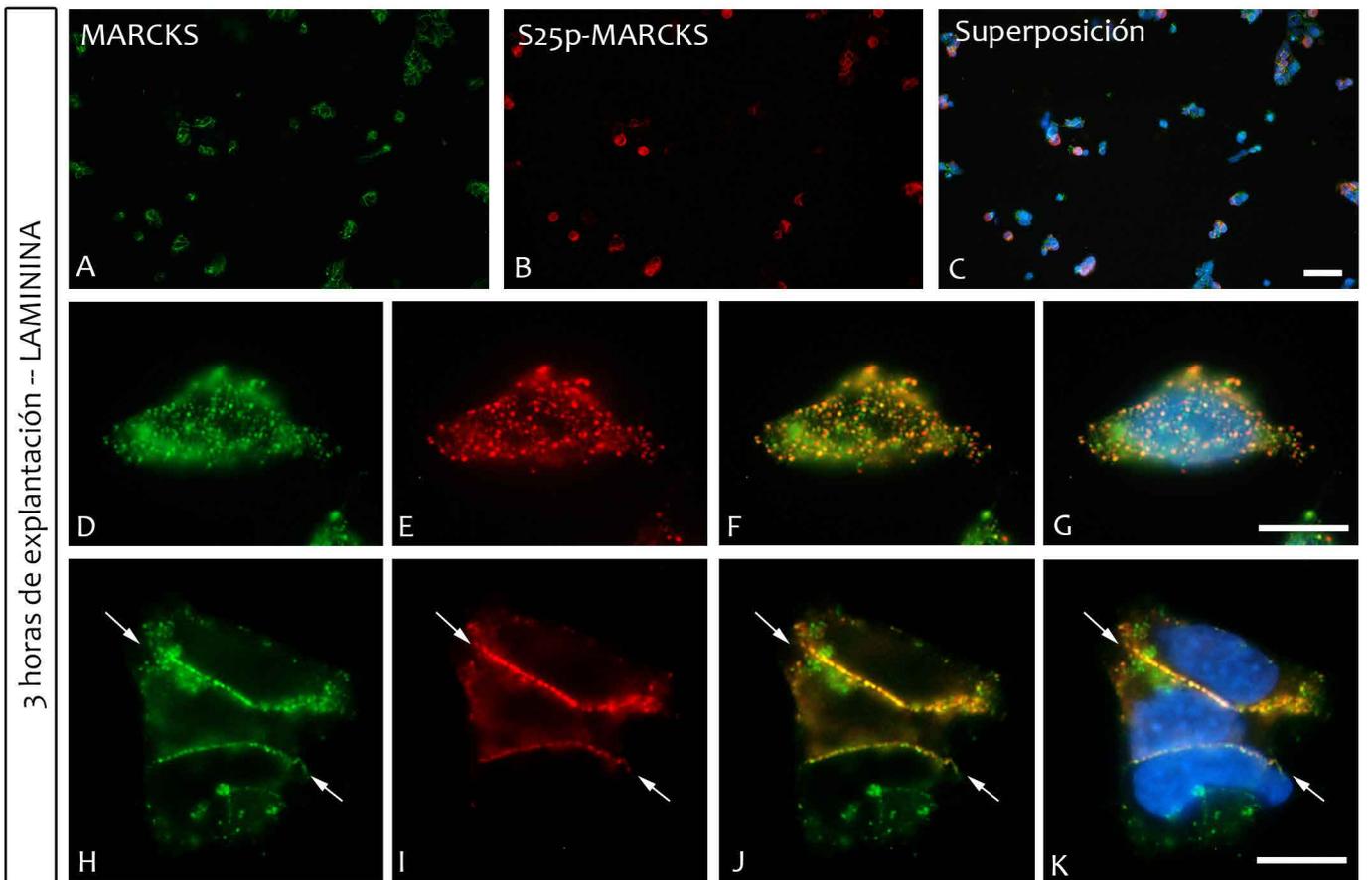
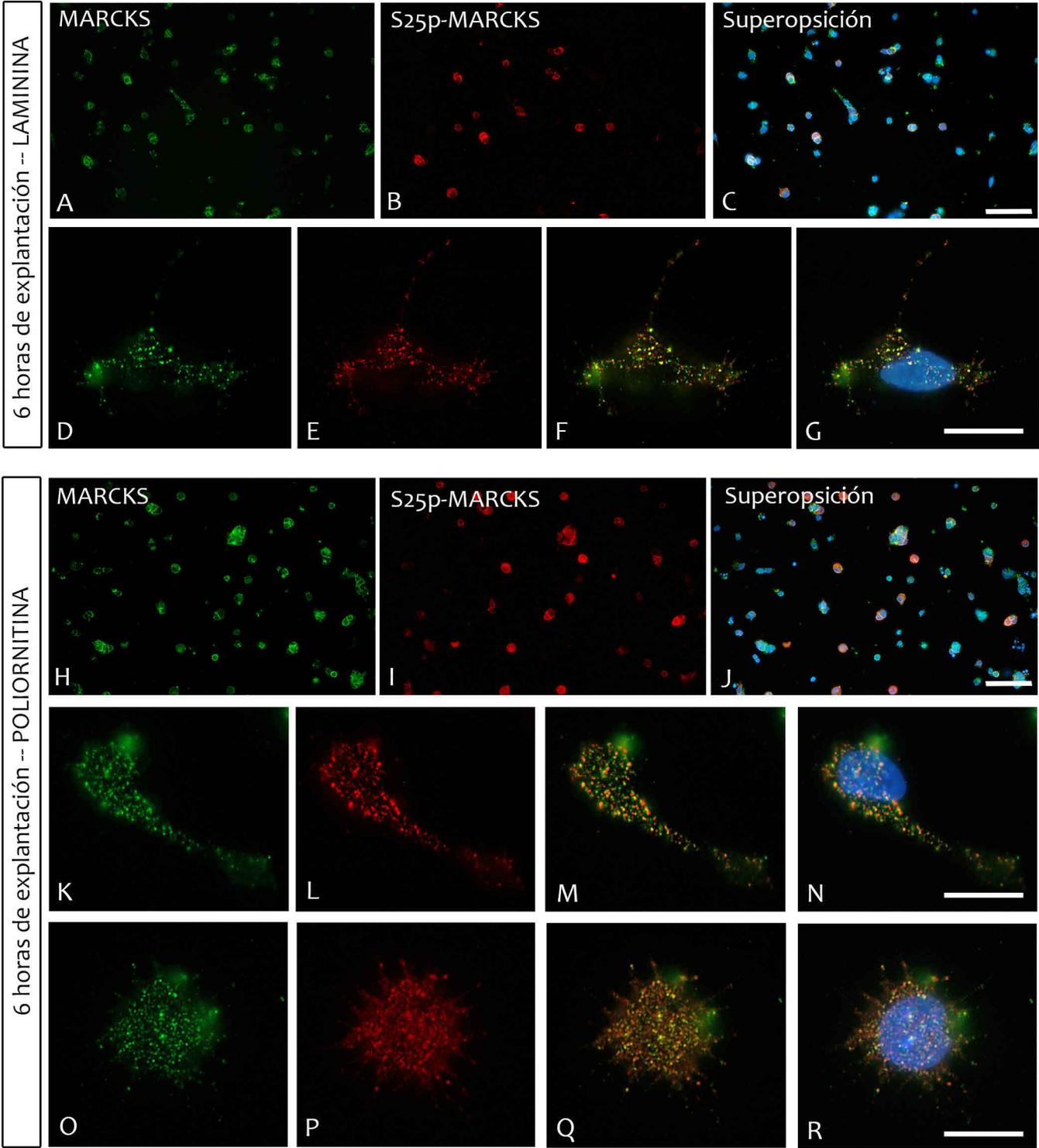


Figura 18: Fosforilación *de novo* de MARCKS en la S25 en neuroblastos de la retina de embriones de E8, luego de 6 horas de explantación sobre distintos sustratos adhesivos. Imágenes de epifluorescencia de la inmunodetección de MARCKS, S25p-MARKCS y marcado nuclear con Hoechst 33342. **(A-G)** Cultivos sobre polionitina-laminina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. **(H-R)** Cultivos sobre poliornitina al 0.01%. Barras: 50 μm (A-C, H-J), 10 μm (D-G, K-R).



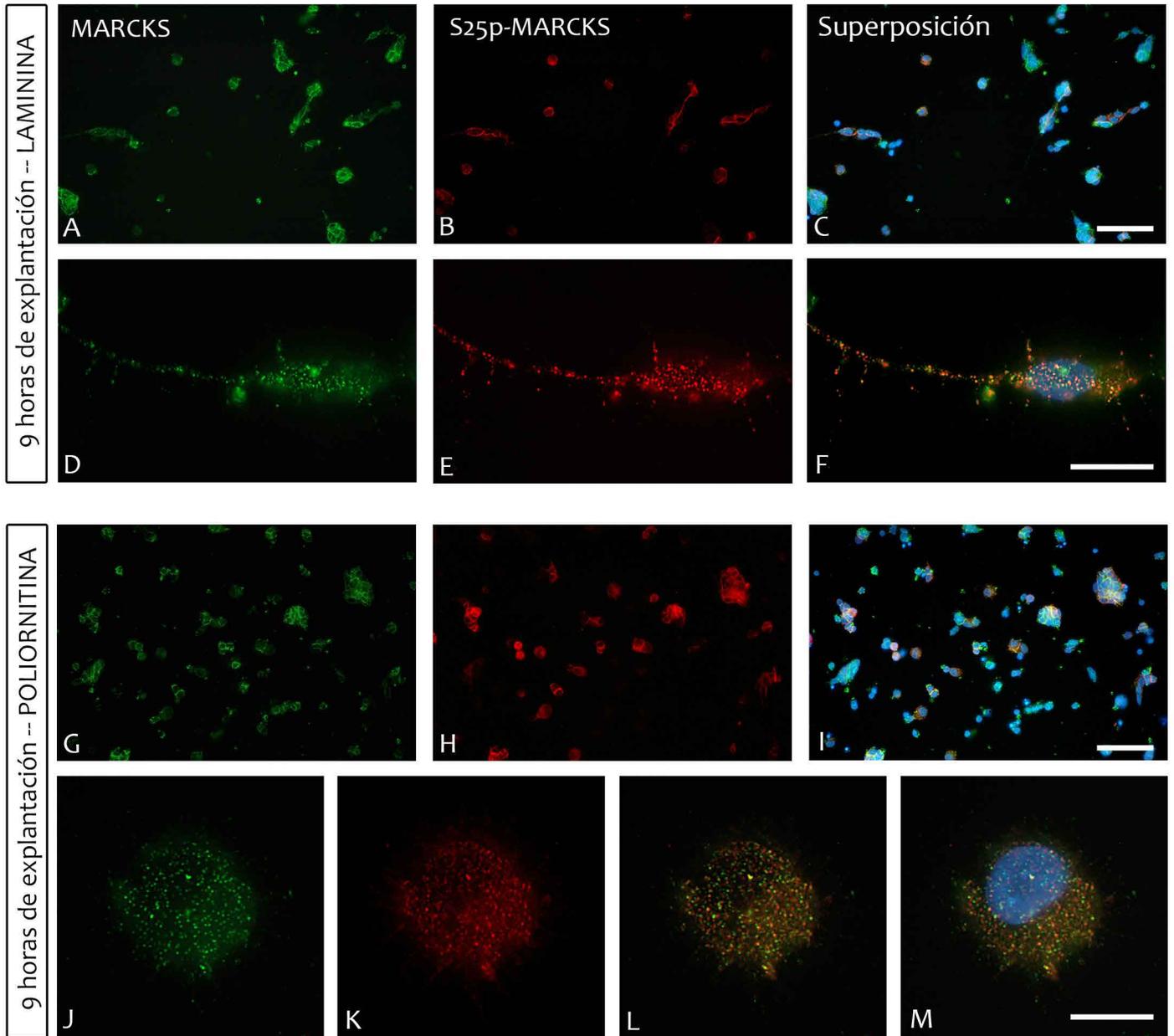
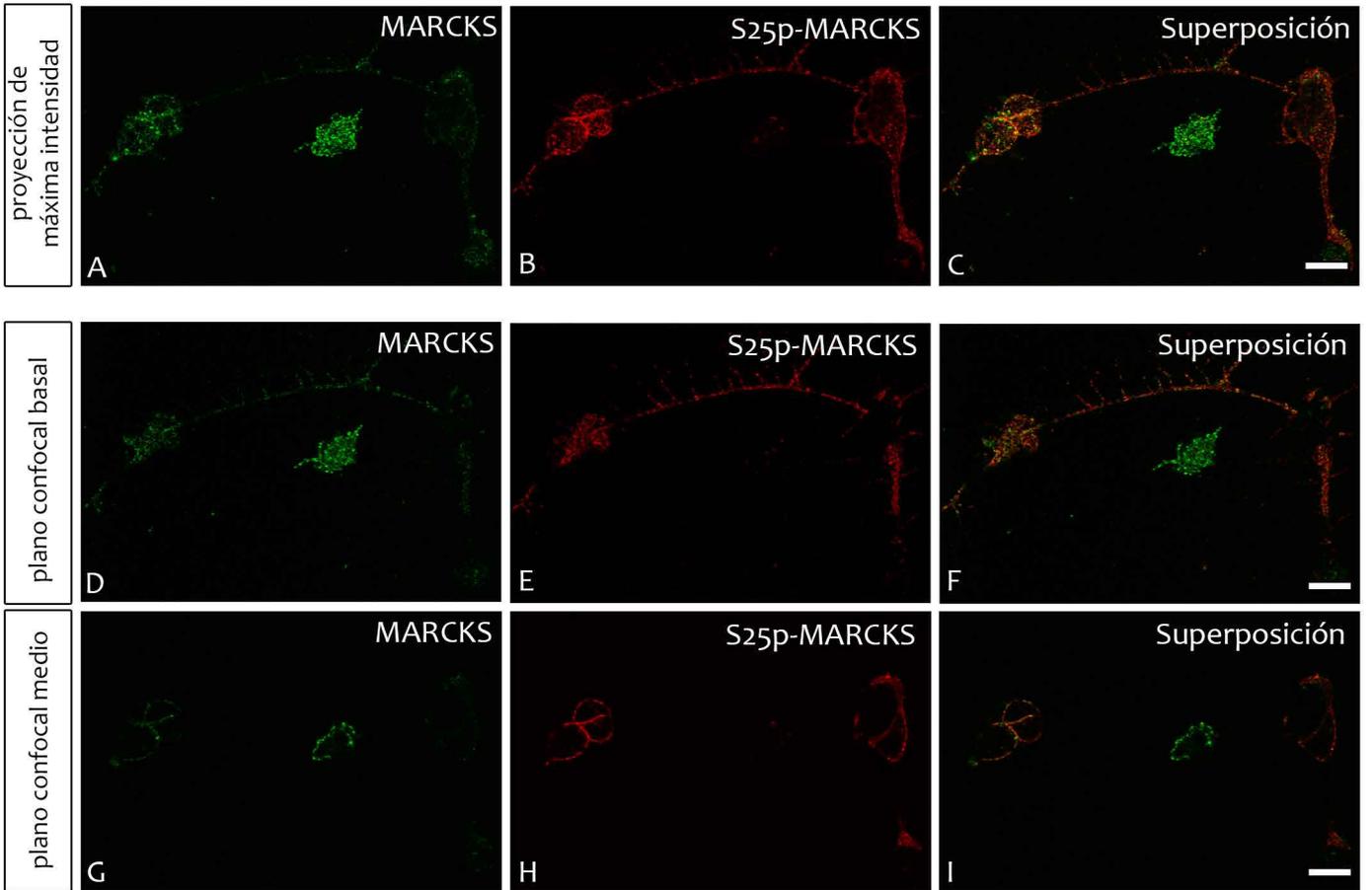


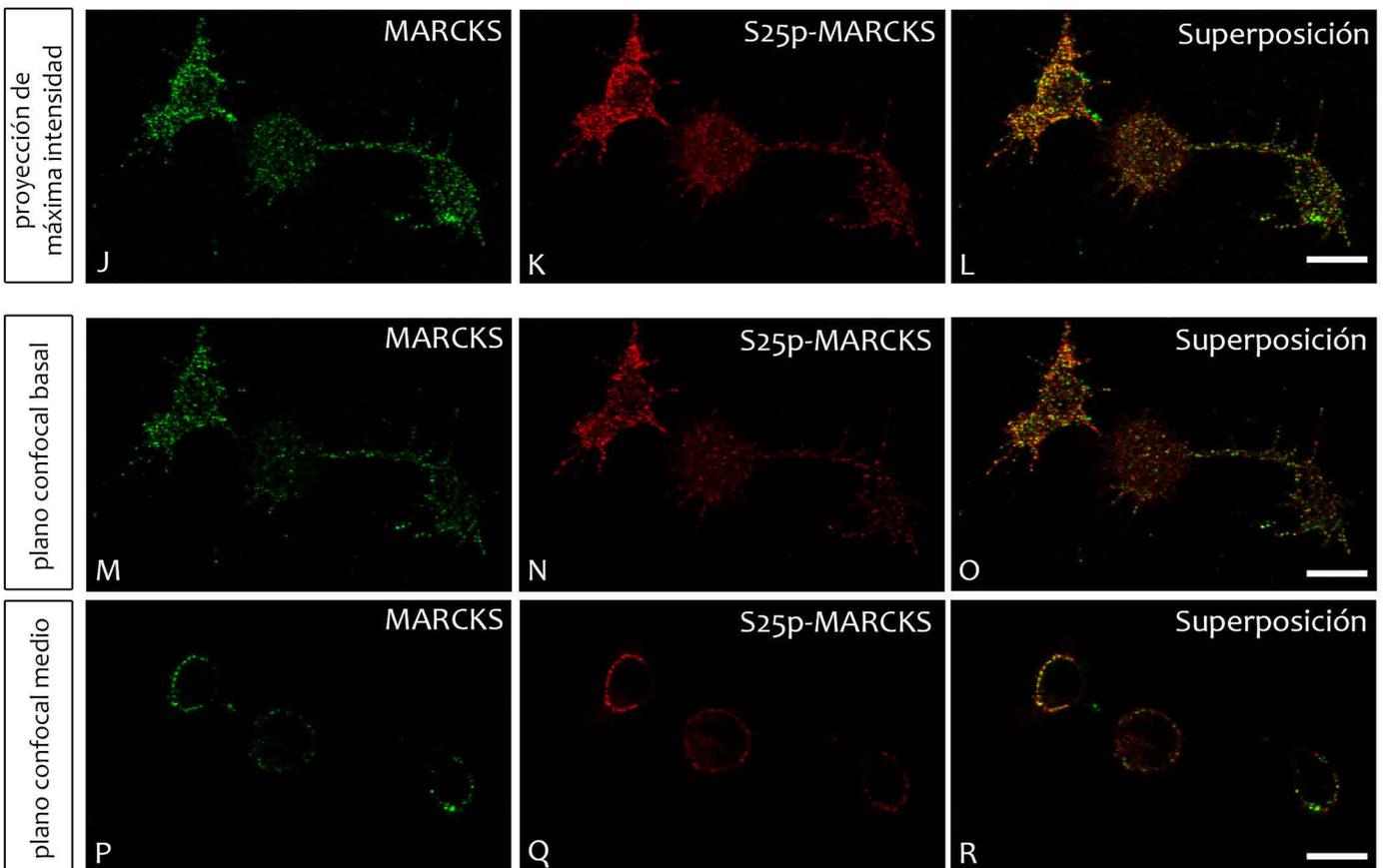
Figura 19: Fosforilación *de novo* de MARCKS en la S25 en neuroblastos de la retina de embriones de E8, luego de 9 horas de explantación sobre distintos sustratos adhesivos. Imágenes de epifluorescencia de la inmunodetección de MARCKS, S25p-MARCKS y marcado nuclear con Hoechst 33342. **(A-F)** Cultivos sobre polionitina-laminina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. **(G-M)** Cultivos sobre poliornitina al 0.01%. Barras: 50 μm (A-C, G-I), 10 μm (D-F, J-M).

Figura 20: Fosforilación *de novo* de MARCKS en la S25 en neuroblastos de la retina de embriones de E8, luego de 9 horas de explantación sobre distintos sustratos adhesivos. Imágenes de microscopía confocal de la inmunodetección de MARCKS y S25p-MARKCS. Se muestran proyecciones de máxima intensidad y secciones confocales únicas a nivel basal y medio de las células, como se indica en cada fila de figuras. **(A-I)** Cultivos sobre polionitina-laminina 10 µg/ml. **(J-R)** Cultivos sobre polionitina al 0,01%. Barras: 10 µm.

Poliornitina-Laminina 9 *hiv*



Poliornitina 9 *hiv*



2.2) Distribución de S25p-MARCKS en neuroblastos diferenciados sobre distintos sustratos.

En la sección 2.1 se exploró el efecto de una glicoproteína de MEC, laminina, en una situación en la que hay primero un descenso significativo de S25p-MARCKS y luego se produce su aparición y progresivo aumento en función del tiempo, evaluando intervalos cortos. Ahora bien, las moléculas de sustrato, o fuertemente adhesivas, ¿modifican la cantidad, tipos de acúmulos y su distribución cuando las células llegan a alcanzar un importante grado de maduración morfológica?

Para responder esa pregunta los experimentos consistieron en permitir el desarrollo de los neuroblastos *in vitro* sobre diversos sustratos hasta etapas de maduración celular en las que hay abundante crecimiento neurítico (3 a 5 días de cultivo). En ninguno de estos sustratos detectamos incrementos en el nivel de expresión o relocalización de MARCKS total, como mostraron en las imágenes de epifluorescencia. Analizamos entonces en mayor profundidad su variante fosforilada en la S25.

En estos casos se utilizó nuevamente laminina, así como colágeno I (Carri et al., 1992), fibronectina, concanavalina A (Lochter y Schachner, 1993; Chang et al., 1998). Todos ellos son sustratos muy utilizados en cultivos de neuronas. La poliornitina se usó para establecer las condiciones de base. Las células disociadas de retina de embriones de 8 días de desarrollo se sembraron a baja densidad (aproximadamente 12.000 células/cm²). En los cultivos sobre poliornitina los neuroblastos adquirieron morfologías variadas. Se desarrollaron neuronas unipolares, bi y multipolares, como fue descrito por R. Adler (Adler, 1987). En todos los neuroblastos la señal de MARCKS y de S25p-MARCKS fue muy intensa, localizada tanto en el soma como en las neuritas y conos de crecimiento, extendiéndose hasta los filopodios (figura 21). En todas esas regiones celulares la proteína apareció en pequeños acúmulos (“clusters”) periféricos (Zolessi y Arruti, 2001).

Sobre colágeno I (purificado a partir de cola de rata) adherido al vidrio mediante irradiación ultravioleta, los neuroblastos mostraron un grado similar de crecimiento, en cuanto a células adheridas y extensión de neuritas, al producido en los cultivos sobre poliornitina. Tampoco se detectó un incremento de la señal de S25p-MARCKS en ninguna región celular, ni se apreciaron cambios en los patrones de distribución ni en los tamaños de los parches (figura 21).

En cuanto a las células sembradas sobre laminina, encontramos que el crecimiento de los neuroblastos en colonias se vio favorecido frente al crecimiento de los neuroblastos aislados, como mencionáramos en la sección 2.1, al tiempo que observamos un gran número de prolongaciones neuronales largas y de bajo calibre, y pocas de mayor diámetro. En estas condiciones, muchas de las neuritas presentaron escasos puntos de adhesión al sustrato, excepto en su extremo (cono de crecimiento). Este evento tornó sumamente difícil la conservación de

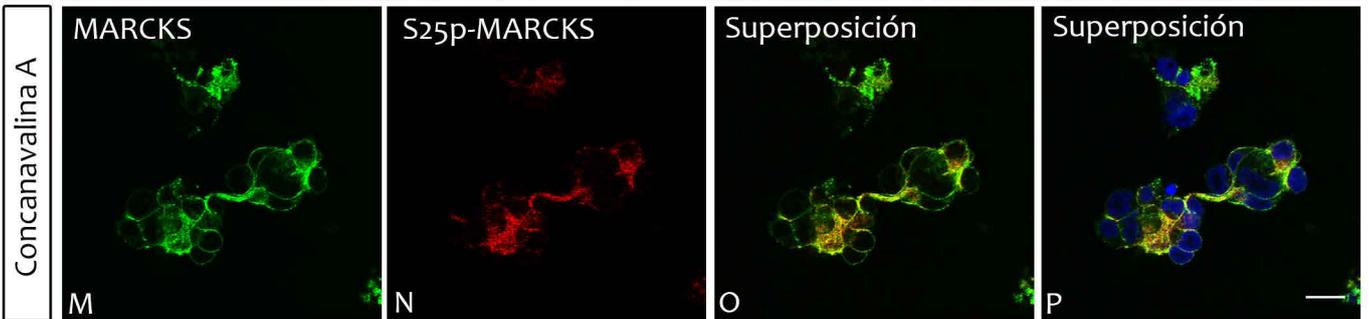
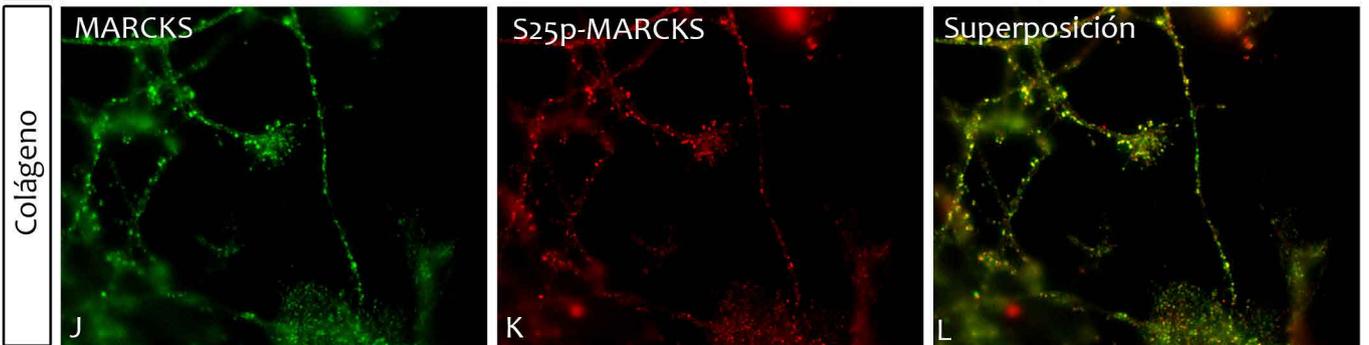
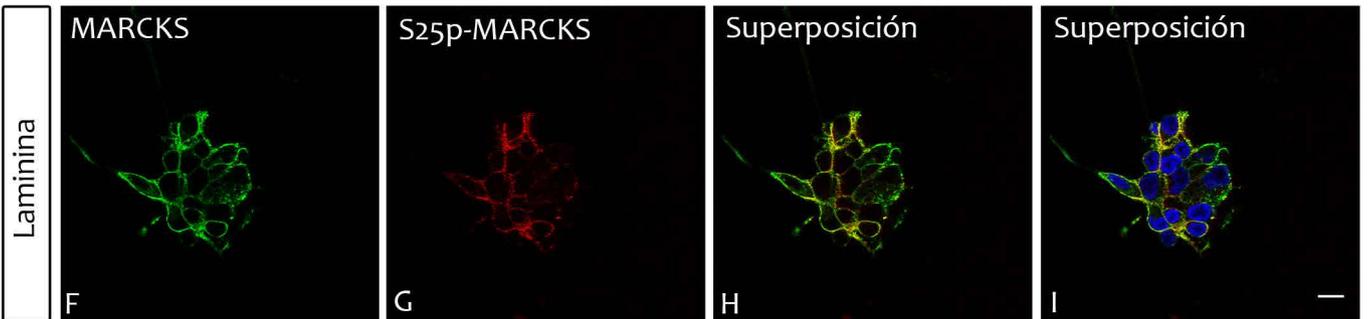
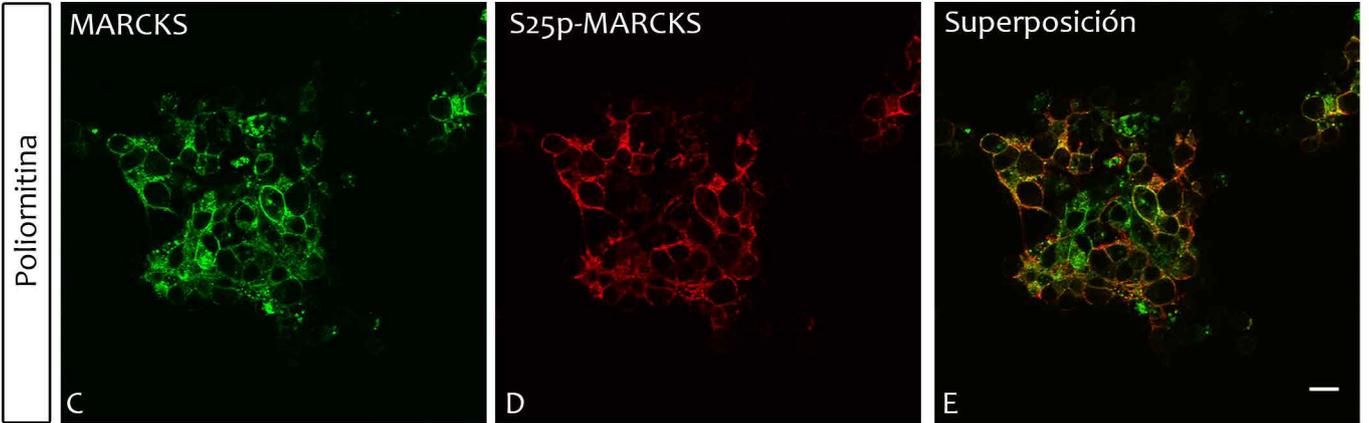
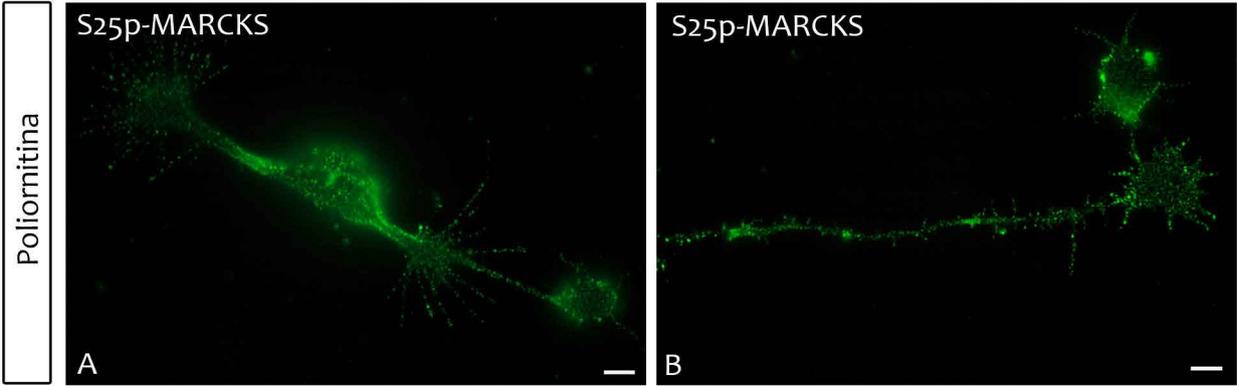
las neuritas durante el procesamiento de las células en la IFI. En la mayoría de los casos, si bien había conos de crecimiento de distintas morfologías (colapsados, clava, con filopodios), encontramos un aumento en la frecuencia de aparición de conos con numerosos filopodios. En estas condiciones, la localización de S25p-MARCKS no mostró variaciones, ni evidenciamos un incremento de la señal frente a los otros sustratos analizados (figura 21).

El sustrato de concanavalina A favoreció el desarrollo de conos de crecimiento de gran tamaño, al tiempo que las neuritas eran más cortas y de un calibre uniforme y bastante mayor al observado en los otros sustratos utilizados. S25p-MARCKS exhibió una amplia distribución en los conos, localizándose tanto en el “shaft” o tronco axónico, en la región central, lamelipodio y los filopodios. Si bien las células mostraron diferencias morfológicas notorias respecto a las células cultivadas en los otros sustratos, no apreciamos ni un incremento, ni un enriquecimiento diferencial de S25p-MARCKS en ninguna región neuronal (figura 21 M-P; 25 J-L). Sin embargo, el hecho remarcable fue que los acúmulos tenían mayor variabilidad en sus tamaños, existiendo desde algunos singularmente grandes a otros muy pequeños.

Sobre fibronectina (purificada a partir de plasma bovino) el crecimiento neurítico fue extremadamente escaso, por lo que los cultivos fueron descartados en esta instancia.

Estos resultados indican que ninguno de los sustratos provocó un aumento perceptible en la cantidad de fosforilación de la S25 de MARCKS, así como tampoco una modificación de su localización a nivel de regiones neuronales. Pero, considerando estos resultados con los de la sección 2.1, sí sugieren que esos tiempos de cultivo (3 a 5 *div*) ya fueron lo suficientemente prolongados como para permitir que se alcanzaran niveles máximos de fosforilación de MARCKS en la S25, presumiblemente resultantes de regulaciones procedentes de las propias células, y no del sustrato particular propuesto a las mismas.

Figura 21: Localización de S25p-MARCKS y MARCKS en neuroblastos de la retina de embriones de pollo de E8 cultivados durante 3-5 *div* sobre distintos sustratos. Se muestran imágenes de epifluorescencia. Marcado nuclear con Hoechst 33342 **(A-E)** Neuroblastos cultivados sobre poliornitina. **(F-I)** Neuroblastos cultivados sobre laminina 10 $\mu\text{g/ml}$. **(J-L)** Neuroblastos cultivados sobre colágeno I. **(M-P)** Neuroblastos cultivados sobre concanavalina A 1 mg/ml . Barras: 10 μm .

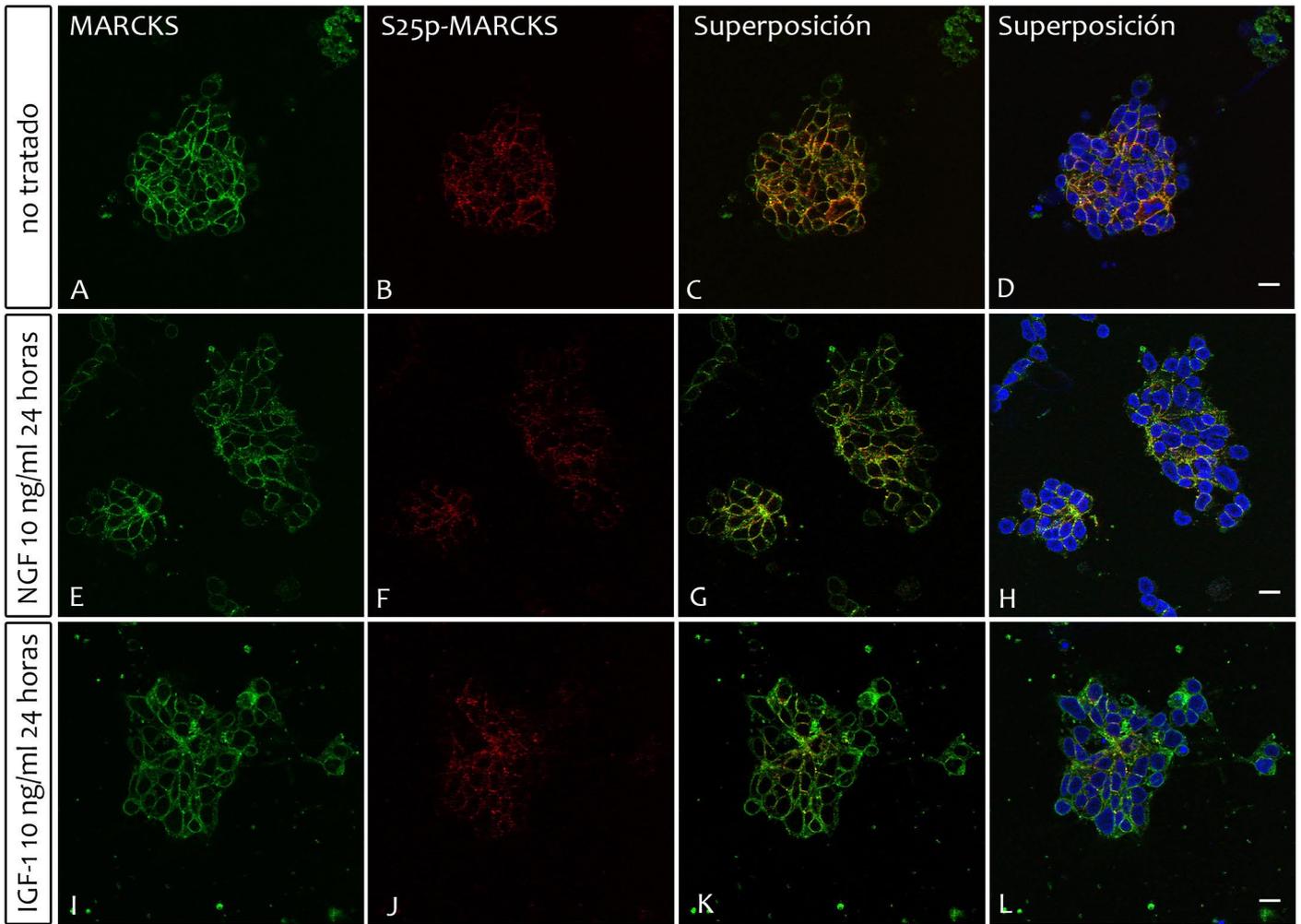


2.3) Aparición de la fosforilación en la S25 de MARCKS en neuroblastos retinianos cultivados en presencia de factores de crecimiento.

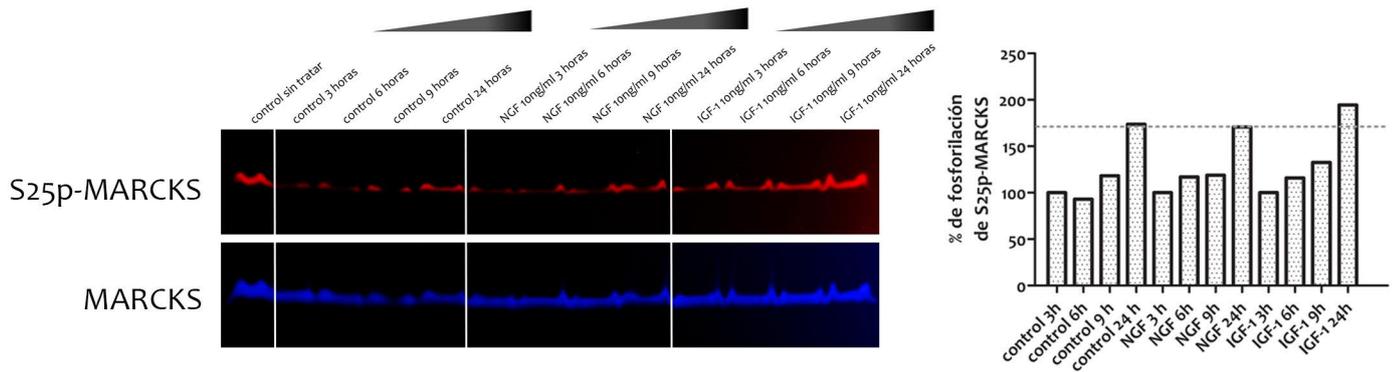
Varias evidencias han señalado los efectos de la estimulación con IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) sobre la fosforilación de MARCKS en particular en el ED, a cargo de PKC (Shiraishi et al., 2006; Yamaguchi et al., 2009). Estos trabajos vinculan el descenso de la fosforilación del ED con la translocación de MARCKS a la membrana plasmática y un aumento en el crecimiento neurítico de neuronas de la línea SHY-SY5Y. Por su parte, es de nuestro interés el hecho de que NGF (factor de crecimiento nervioso) estimula la expresión de p35, activador de Cdk5 en neuronas de la línea PC12 en diferenciación (Harada et al., 2001; Chen et al., 2010). Por último, la actividad de ambos factores tróficos, así como de otros entre los que se pueden citar FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), NT-1, 2, 3 y 4 (neurotrofinas), es de vital importancia para el desarrollo del sistema nervioso y la retina (Torres-Aleman, 2010). Teniendo en cuenta estas y otras evidencias, nos preguntamos si factores tróficos tales como IGF-1 o NGF son capaces de estimular la fosforilación en la S25 de MARCKS o de alterar su emplazamiento subcelular.

Nuevamente aquí nos valimos del sistema de neuroblastos de retina neural de E8 recién explantados, momento en el cual la fosforilación en la S25 es baja y se incrementa paulatinamente en función del tiempo (Toledo y Arruti, 2009). Explantamos neuroblastos y los cultivamos en DMEM con el suplemento N2, sin suero fetal bovino, y con NGF o IGF-1 10 ng/ml. Evaluamos mediante IFI y Western-blot el nivel de fosforilación y la distribución de S25p-MARCKS (figura 22). Como se observa en la figura luego de 24 horas de cultivo, ninguno de los factores de crecimiento alteró de manera ostensible la localización de S25p-MARCKS en los neuroblastos aislados (no mostrados) o colonias (figura 22 A-L). Por su parte, los análisis temporales de la variación de S25p-MARCKS mediante Western-blots muestran claramente cómo si bien la cantidad de la proteína total MARCKS no presenta variaciones, la fosforilación se incrementa en función del tiempo desde las 3 a las 24 horas de cultivo, en los neuroblastos no estimulados (figura 22 M y O). A modo de ilustración se muestra una gráfica de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas de S25p-MARCKS normalizadas contra la cantidad MARCKS total. Si bien el experimento fue repetido varias veces, las réplicas no representan un número válido para ser evaluado estadísticamente (Figura 22 N). Los neuroblastos estimulados con NGF no mostraron diferencias en la cinética de aparición de la fosforilación en la S25, respecto a los neuroblastos no tratados (figura 22 M y N). Sin embargo, los cultivos tratados con IGF-1 mostraron tener, no solamente un marcado desarrollo neurítico sino también un incremento en la fosforilación de la S25 respecto a los no tratados, y a los tratados con NGF (figura 22 M y N).

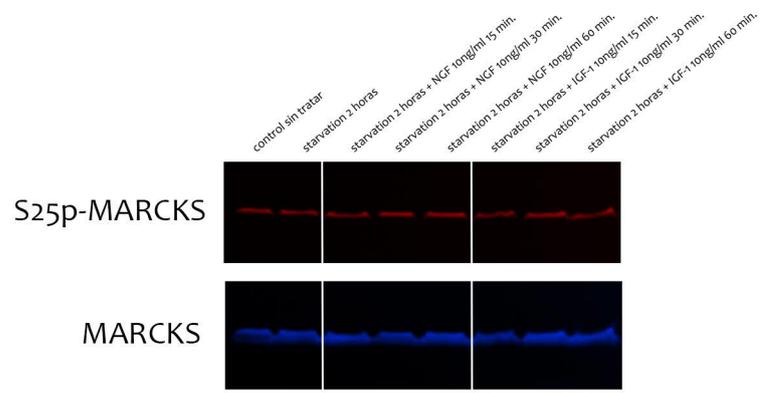
Figura 22: Efecto de la presencia de factores de crecimiento en el medio de cultivo sobre la aparición de la fosforilación en la S25 de MARCKS en neuroblastos en cultivo. Retinas embrionarias de E8 fueron disgregadas y cultivadas en medio de cultivo DMEM suplementado con N2 y tratados con NGF 10 ng/ml, IGF-1 10 ng/ml o DMSO al 0.1% en los no tratados, a distintos tiempos de cultivo. **(A-L)** Neuroblastos cultivados durante 24 horas en presencia de factores de crecimiento inmediatamente luego de la explantación, como se indican en las barras de la izquierda. Se muestran imágenes de fluorescencia de MARCKS y S25p-MARCKS correspondientes a secciones confocales únicas a nivel de la zona media de colonias adheridas al sustrato. Barras: 10 μ m. **(M)** Análisis temporal de la aparición de la fosforilación en la S25 en cultivos explantados y cultivados en presencia de factores de crecimiento durante 3, 6, 9 y 24 horas. “Control” DEMEM+N2. **(N)** Gráficos representando el curso temporal de la fosforilación relativa de MARCKS en la S25, en experimentos como los indicados en M. **(O)** Tratamientos agudos con factores de crecimiento. Neuroblastos de la retina neural de embriones de E8 explantados y cultivados durante 3 días *in vitro* en DMEM+N2, luego mantenidos durante 2 horas en DMEM solo (deprivación de suero) y seguidos de una incubación durante los últimos 15 minutos con factores de crecimiento como se indica en la parte superior del Western-blot. (M y N) Western-blots coloreados digitalmente en las inmunodetecciones de S25p-MARCKS y MARCKS.



M



N



Una vez obtenidos estos resultados, nos propusimos evaluar si IGF-1 es capaz de promover un incremento de la fosforilación en la S25 una vez que las células han alcanzado un nivel de desarrollo neurítico importante, y los niveles de S25p-MARCKS no se encuentran en su etapa de aumento inicial. Con este fin cultivamos neuroblastos durante 3 *div* en medio de cultivo con suero fetal bovino, este medio fue removido y sustituido por DMEM solo durante por 2 horas y luego se agregó NGF o IGF-1 por un breve período de tiempo. Los ensayos de Western-blot no mostraron variaciones de la fosforilación en la S25 por el período de privación de suero, y que los factores tróficos no promovieron un incremento en la fosforilación en la S25 en estas condiciones (figura 22 O). Estos resultados nos sugieren que el factor neurotrófico IGF-1 es capaz de activar cascadas de señalización o promover un estado funcional en los neuroblastos que favorecen la aparición de la fosforilación en la S25, solamente cuando los niveles de S25p-MARCKS se encuentran en ascenso en los neuroblastos post-explantados. Una vez que los neuroblastos alcanzan un desarrollo neurítico importante y los niveles de la fosforilación en la S25 se tornan estables, una estimulación aguda con IGF-1 no provoca un incremento de esta fosforilación.

2.4) Distribución de S25p-MARCKS y moléculas vinculadas a la adhesión celular en retinas de embriones de pollo.

Como mencionáramos en la introducción existen evidencias que vinculan a MARCKS y moléculas de adhesión celular como las integrinas durante el proceso de crecimiento neurítico (Gatlin et al., 2006). Por otro lado, trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron la persistencia en la fosforilación en la S25 de MARCKS en los neuroblastos asociados a colonias, a diferencia de los neuroblastos aislados luego de la disgregación celular de las retinas (Toledo y Arruti, 2009). En la sección 2.1 mostramos también que existe un enriquecimiento de MARCKS y S25p-MARCKS en la zona de contacto célula-célula (figura 16 y 17). Estas evidencias motivaron la búsqueda de posibles interacciones de la variante fosforilada en la S25 de MARCKS y moléculas de adhesión célula-célula como cadherina y NCAM. Era nuestra intención también localizar proteínas de adhesión célula-sustrato de la familia de las integrinas, importantes receptores de superficie de la MEC, pero no pudimos encontrar anticuerpos que tuvieran reacción con las variantes de pollo.

Analizamos entonces la localización de moléculas vinculadas a la adhesión inter-celular, tales como cadherinas, α -y β -cateninas, y NCAM, con algunas de las cuales ya se ha establecido la vinculación con MARCKS en diferentes tipos neuronales (Gatlin et al., 2006). Comparamos la localización de dichas moléculas con la de S25p-MARCKS durante el desarrollo de la retina neural, mediante IFI sobre cortes a congelación de ojos y retinas de embriones de pollo.

En el caso de la cadherina, utilizamos para su detección un anticuerpo policlonal que detecta todas las variantes de la cadherina (pan-cadherina). Encontramos que esta proteína está presente tanto en la retina neural como en la pigmentaria, en todos los estadios del desarrollo analizados, siendo particularmente abundante en la periferia celular, justamente en los sitios de contacto célula-célula (figura 23 B, F, J). En la retina neural en etapas tempranas, la cadherina presenta una distribución más extendida que S25p-MARCKS, quien, como mostráramos en el capítulo I, se localiza en las neuronas en diferenciación del borde vítreo de la retina (Figura 23 A-C). En etapas más avanzadas, la cadherina está presente a nivel de todas las capas retinianas, siendo especialmente abundante en las capas de fibras: capa de fibras del nervio óptico y capa plexiforme interna. En todas ellas presentó una alta colocalización con S25p-MARCKS, ya que además ambas proteínas muestran una localización en la periferia celular (figura 23 A-L).

Además estudiamos la posible codistribución de S25p-MARCKS con NCAM. Esta molécula se expresa en grandes cantidades en las células neuronales de la retina, tanto en las neuroepiteliales como en las que han comenzado su diferenciación (Daniloff et al., 1986). En los cortes de retina de distintos estadios del desarrollo, encontramos una distribución amplia de NCAM en el tejido nervioso, sin destacarse un enriquecimiento en alguna capa en particular, como en el caso de S25p-MARCKS, en las neuronas que comienzan su diferenciación. En cambio, notamos altos niveles de colocalización entre ambas proteínas en las capas de fibras, donde ambas se concentran desde E8 en adelante (figura 23 M-X).

En relación con la cadherina, buscamos la localización de dos de sus interactores citoplasmáticos: las α y β cateninas. En ambos casos, la distribución de estas proteínas mostró ser amplia, sin encontrarse un enriquecimiento en las capas de fibras, como lo observamos con la cadherina. La α -catenina presentó altas concentraciones en el citoplasma celular y en los núcleos, a diferencia de S25p-MARCKS que se localiza en la periferia celular, como mencionáramos anteriormente, lo cual resulta evidente en las imágenes superpuestas de ambas inmunodetecciones (figura 24 A-L). En el epitelio de la retina pigmentaria, se observa un claro enriquecimiento de α -catenina en los dominios laterales, en la región de contacto célula-célula. En este epitelio, si bien MARCKS está presente, no lo está su variante fosforilada en la S25, como fuera descrito previamente (Zolessi y Arruti, 2001b, 2004). La β -catenina, por su parte, se localiza en la periferia celular y mostró una intensa señal en el borde vítreo de la retina en los estadios más jóvenes. En estos estadios S25p-MARCKS también es abundante en esta región en donde tiene lugar la diferenciación de neuronas ganglionares (figura 24 M-X, flechas). Además, encontramos una intensa señal de β -catenina en la región de contacto célula-célula de la retina pigmentaria y en los pies terminales de las células gliales de Müller, cerca del borde vítreo en los estadios E8 y E12 (figura 24 M-X,

Figura 23: Distribución de S25p-MARCKS, pan-cadherina y NCAM durante el desarrollo de la retina neural. Imágenes de epifluorescencia de criosecciones transversales de ojos de embriones de pollo de 4 (A-D; M-P), 8 (E-H; Q-T) y 12 (I-L; U-X) días de desarrollo, marcados con anticuerpos anti S25p-MARCKS (3C3), anti pan-cadherina y anti NCAM, y con marcado nuclear con Hoechst 33342. Se muestran la región fúndica y parafúndica de la retina neural. rn: retina neural, rp: retina pigmentaria, fno: capa de fibras del nervio óptico, cg: capa de células ganglionares, pi: capa plexiforme interna, ni: capa nuclear interna, pe: capa plexiforme externa, ne: capa nuclear externa, Barras: 50 μ m.

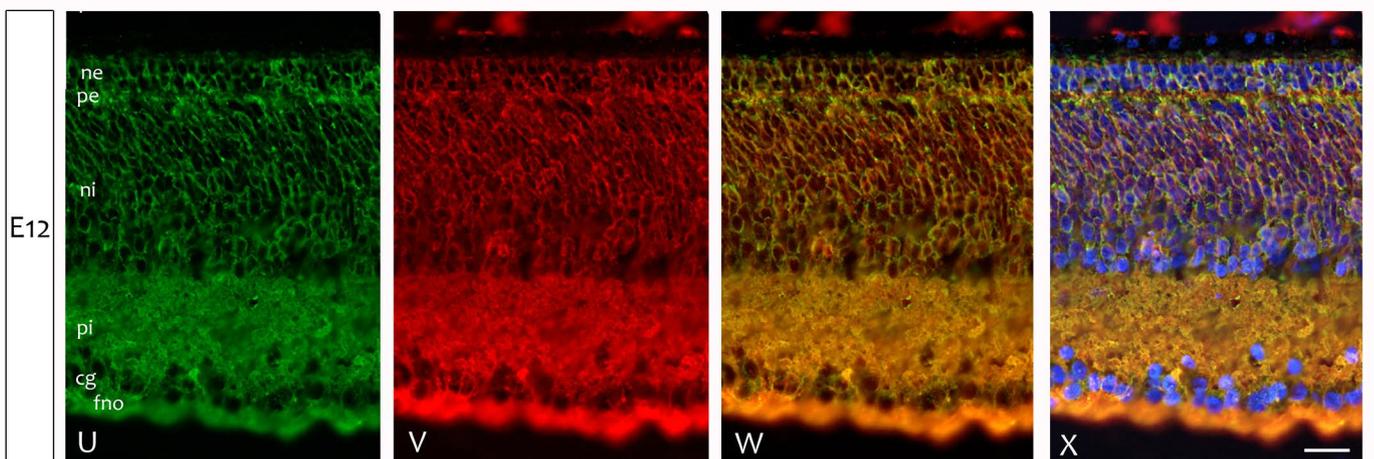
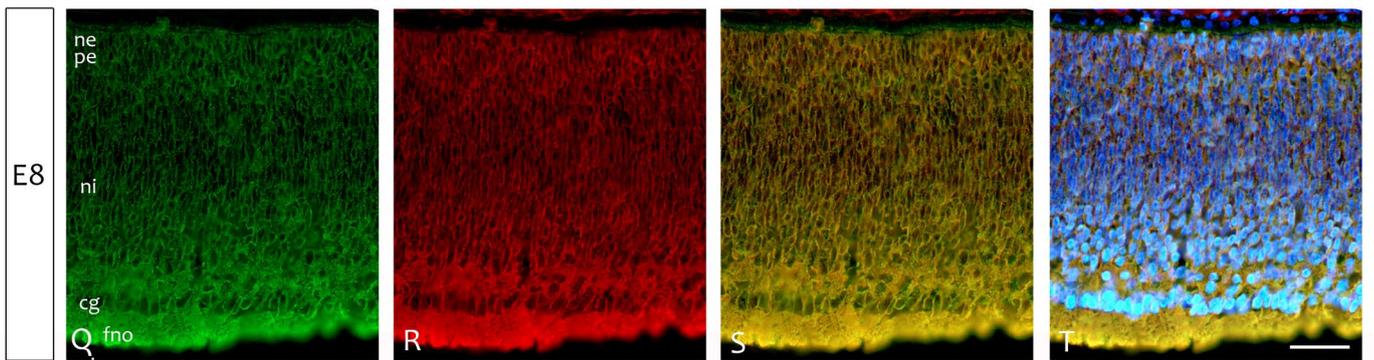
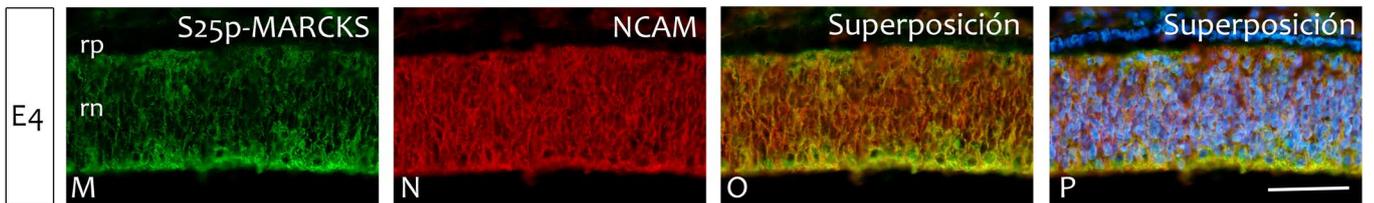
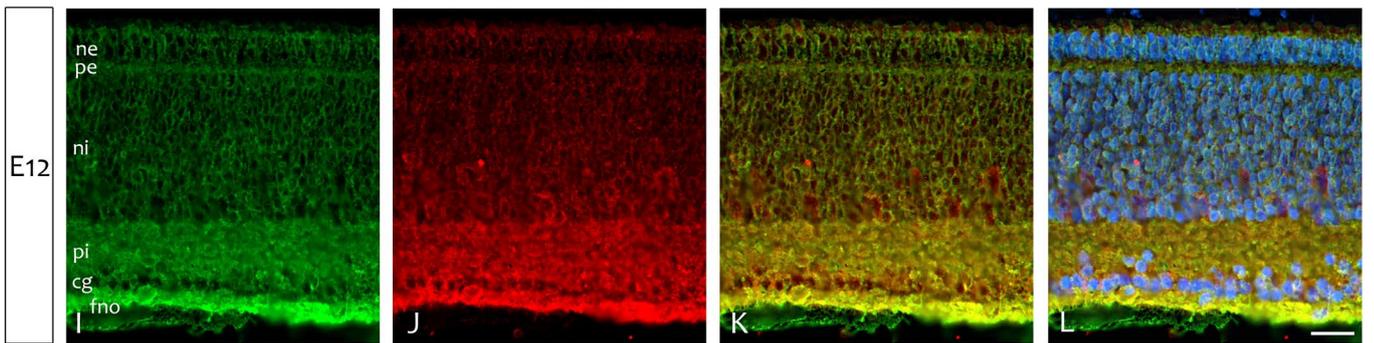
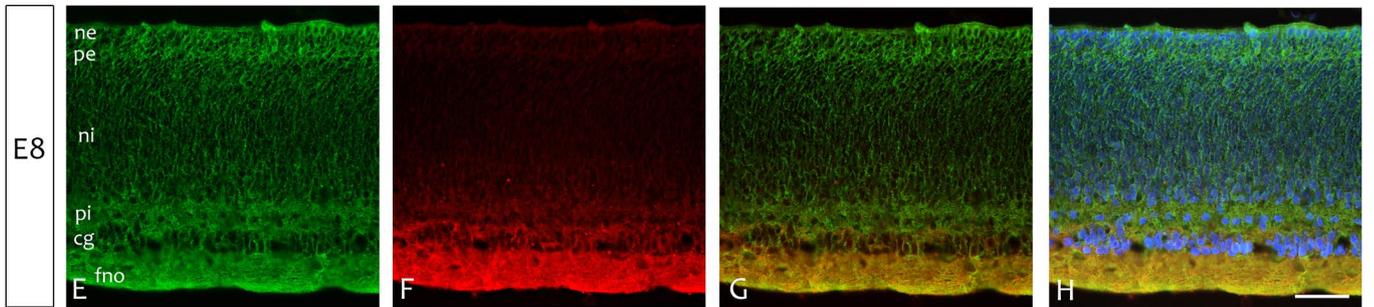
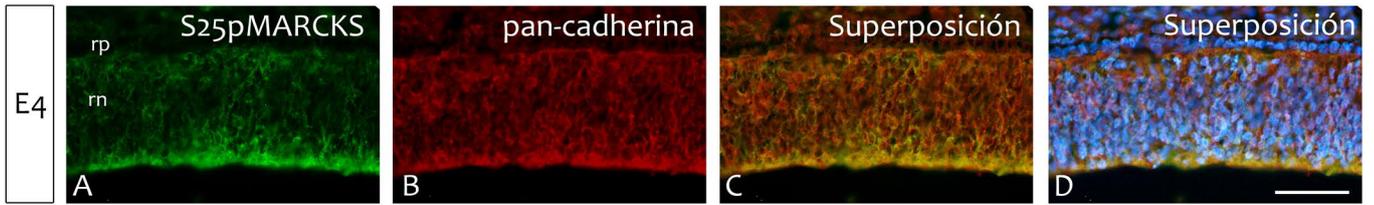
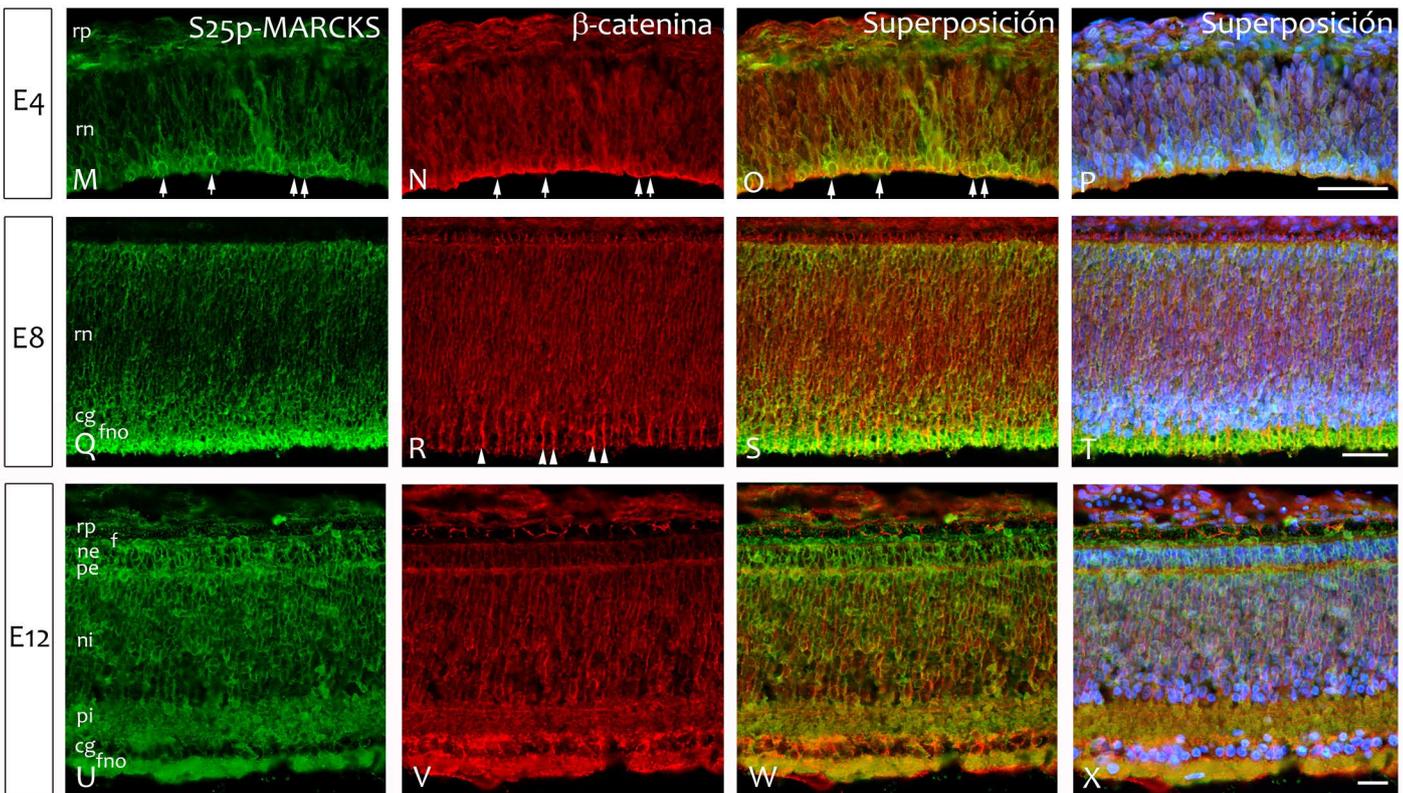
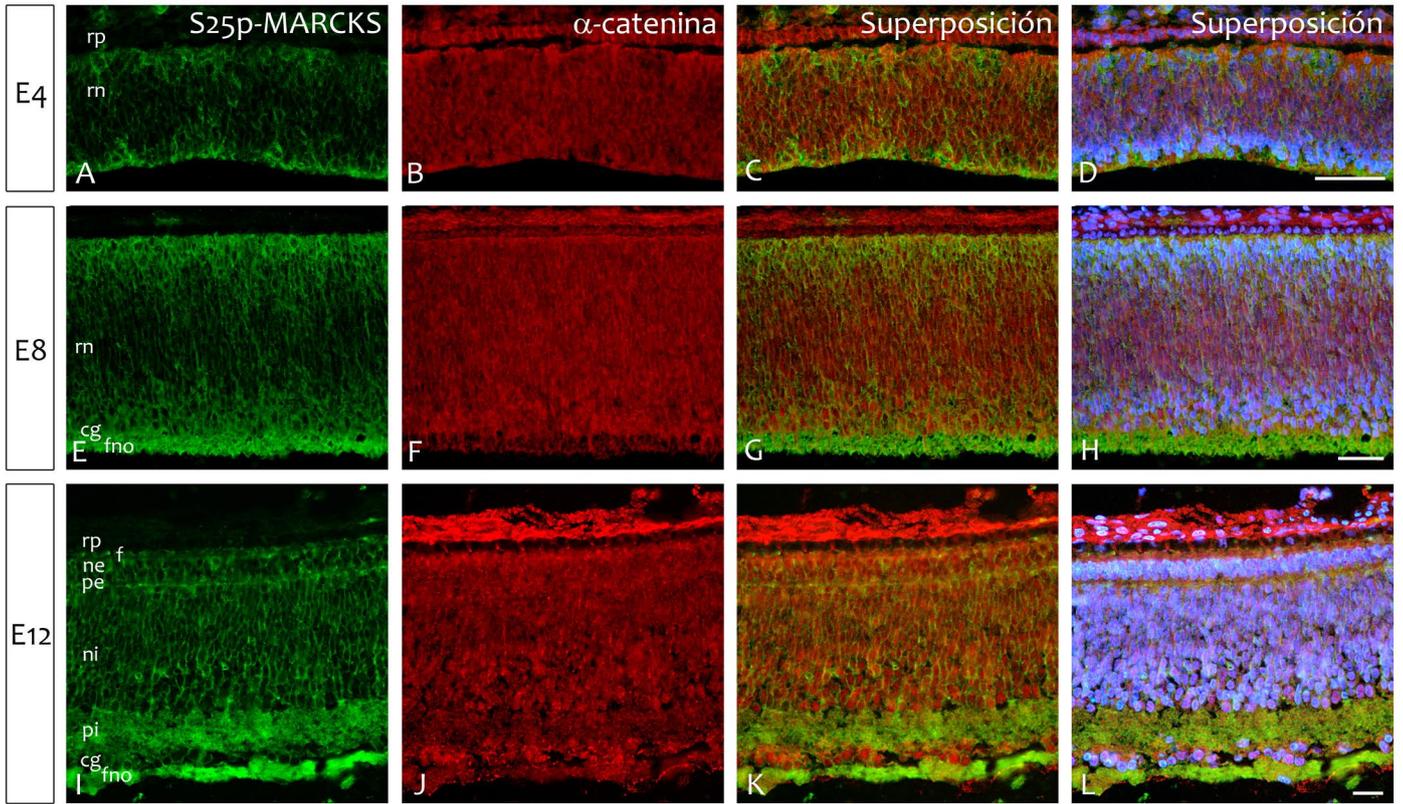


Figura 24: Distribución de S25p-MARCKS, α -catenina y β -catenina durante el desarrollo de la retina neural. Imágenes de epifluorescencia de criosecciones transversales de ojos de embriones de pollo de 4 (A-D; M-P), 8 (E-H; Q-T) y 12 (I-L; U-X) días de desarrollo, marcados con anticuerpos anti S25p-MARCKS, anti-catenina y anti β -catenina, y con marcado nuclear con Hoechst 33342. Las flechas (M-O) marcan neuronas postmitóticas en diferenciación con fuerte señal de S25p-MARCKS y β -catenina. Las cabezas de flecha en la imagen R marcan los pies de las células de Müller. rn: retina neural, rp: retina pigmentaria, fno: capa de fibras del nervio óptico, cg: capa de células ganglionares, pi: capa plexiforme interna, ni: capa nuclear interna, pe: capa plexiforme externa, ne: capa nuclear externa, f: fotorreceptores. Barras: 50 μ m.



cabezas de flecha). En estos tipos celulares no encontramos a S25p-MARCKS, si bien la proteína total se encuentra presente, como ya fuera descrito (Zolessi y Arruti, 2001, 2004).

Estos resultados indican entonces que existen altos niveles de codistribución de S25p-MARCKS con cadherina y NCAM en algunas capas retinianas, lo cual motivó un estudio en mayor profundidad de su localización a nivel subcelular en neuroblastos de la retina.

2.5) Localización subcelular de cadherinas, NCAM y S25p-MARCKS en neuroblastos cultivados sobre distintos sustratos y en microdominios de membrana plasmática.

Los resultados obtenidos acerca de la localización de S25p-MARCKS y las moléculas de adhesión analizadas en los cortes de retinas embrionarias, alentaron la búsqueda de la posible existencia de la colocalización a nivel subcelular. En particular, buscamos la ocurrencia de cambios tanto en el nivel de expresión como en el patrón de distribución de estas proteínas en neuroblastos en cultivo sobre distintos sustratos. Quisimos evidenciar además, si existía codistribución a nivel de regiones singulares de membrana plasmática como son los microdominios, ya que se ha demostrado la presencia MARCKS, cadherina y NCAM en dichas regiones (Laux et al., 2000; Palestini et al., 2002; Leshchyn'ska et al., 2003; Toledo y Arruti, 2009).

Analizamos entonces, mediante IFI la localización de las proteínas mencionadas anteriormente, en neuroblastos de la retina de embriones de E8 cultivados sobre distintos sustratos. Todas las proteínas analizadas mostraron tener una distribución en parches de membrana en distintas regiones neuronales como somas, neuritas y conos de crecimiento, en los distintos sustratos analizados, similar a lo observado con S25p-MARCKS. Sin embargo, a pesar de evidenciar diferencias en el patrón de crecimiento neurítico y adhesión celular en los distintos sustratos propuestos a los neuroblastos (sección 2.3), ninguna de estas proteínas mostró alteraciones ostensibles en su emplazamiento subcelular, ni colocalización a nivel de los parches con S25p-MARCKS (figuras 25 y 26). De hecho, aunque ocupaban las mismas regiones celulares, los parches de cadherina y NCAM eran de menor tamaño que los de S25p-MARCKS y mostraban una clara exclusión con estos últimos.

Solamente en escasas oportunidades encontramos acúmulos que colocalizaban. En el caso de la cadherina, los acúmulos se concentraban en el soma, las neuritas y las regiones más centrales de los conos de crecimiento (figura 25 B, E, H, K). Por su parte, la NCAM mostro una distribución más extendida siendo abundante tanto en

somas (asterisco), neuritas y conos de crecimiento (flechas), en este último, en todos sus dominios extendiéndose hasta el extremo de los filopodios más delgados (figura 26 B, E, H, K). A pesar de obtener este patrón de escasa colocalización entre estas proteínas, nos preguntamos si los mismos tenían lugar a nivel de algún dominio singular de la membrana con relevancia funcional como son los microdominios de membrana ricos en colesterol. Ya se ha demostrado la presencia de MARCKS y S25p-MARCKS en estos dominios (Laux et al., 2000; Palestini et al., 2002; Botto et al., 2004, 2007; Toledo y Arruti, 2009; Yamaguchi et al., 2009). Para poner en evidencia estos microdominios, nos valimos de su característica resistencia a la extracción con el detergente no iónico Tritón X-100 (Brown y London, 1997). Con este fin, tratamos neuroblastos cultivados sobre poliornitina, con Tritón X-100 al 0.1% por tiempos variables, en hielo. Utilizando esta aproximación, pretendíamos remover de la membrana la mayor parte de las proteínas exceptuando aquellas que se localizan en microdominios de membrana ricos en colesterol, resistentes al Tritón X-100. Una vez removidas las proteínas, procedimos a realizar la IFI. Estos experimentos permitieron determinar que una importante proporción de los parches de membrana de todas estas proteínas son resistentes al detergente (figuras 27 y 28). La mayor parte de la señal que no se localiza en parches (difusa) y se observa en los cultivos no tratados, es removida con este tratamiento. Por este motivo se observan acúmulos con mayor definición a nivel de sus límites. Es importante recordar en este punto y ser cautelosos con la interpretación de los resultados, que tanto la fijación de las células con paraformaldehído como la extracción en frío con detergentes constituyen procedimientos que pueden introducir artefactos. En algunos casos los parches detectados exhibían un tamaño mayor a los no tratados, lo cual podría deberse a la coalescencia de parches más pequeños producto de la remoción de proteínas y lípidos de membrana (figura 28 G, H, M, N). De todas maneras ninguno de los tratamientos modificó de ninguna manera la codistribución de S25p-MARCKS con cadherina o NCAM (figuras 27 y 28). De hecho los parches de NCAM y cadherina mostraron ser más resistentes a tratamientos prolongados con Tritón X-100 que los de S25p-MARCKS, la cual desaparece de regiones tales como neuritas sin que esto esté relacionado con la pérdida de las prolongaciones en sí (figuras 27 M-O y 28 M-O).

Como última aproximación al estudio del emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS y NCAM, nos preguntamos si S25p-MARCKS y NCAM podrían de alguna manera localizarse en los mismos dominios de membrana cuya naturaleza sea distinta a los microdominios analizados en la parte anterior. Con este objetivo, tratamos cultivos neuronales sin fijar con el anticuerpo anti-NCAM de manera de provocar artificialmente la coalescencia de los acúmulos de esta proteína, en acúmulos de mayor tamaño, y evaluamos posteriormente mediante IFI si

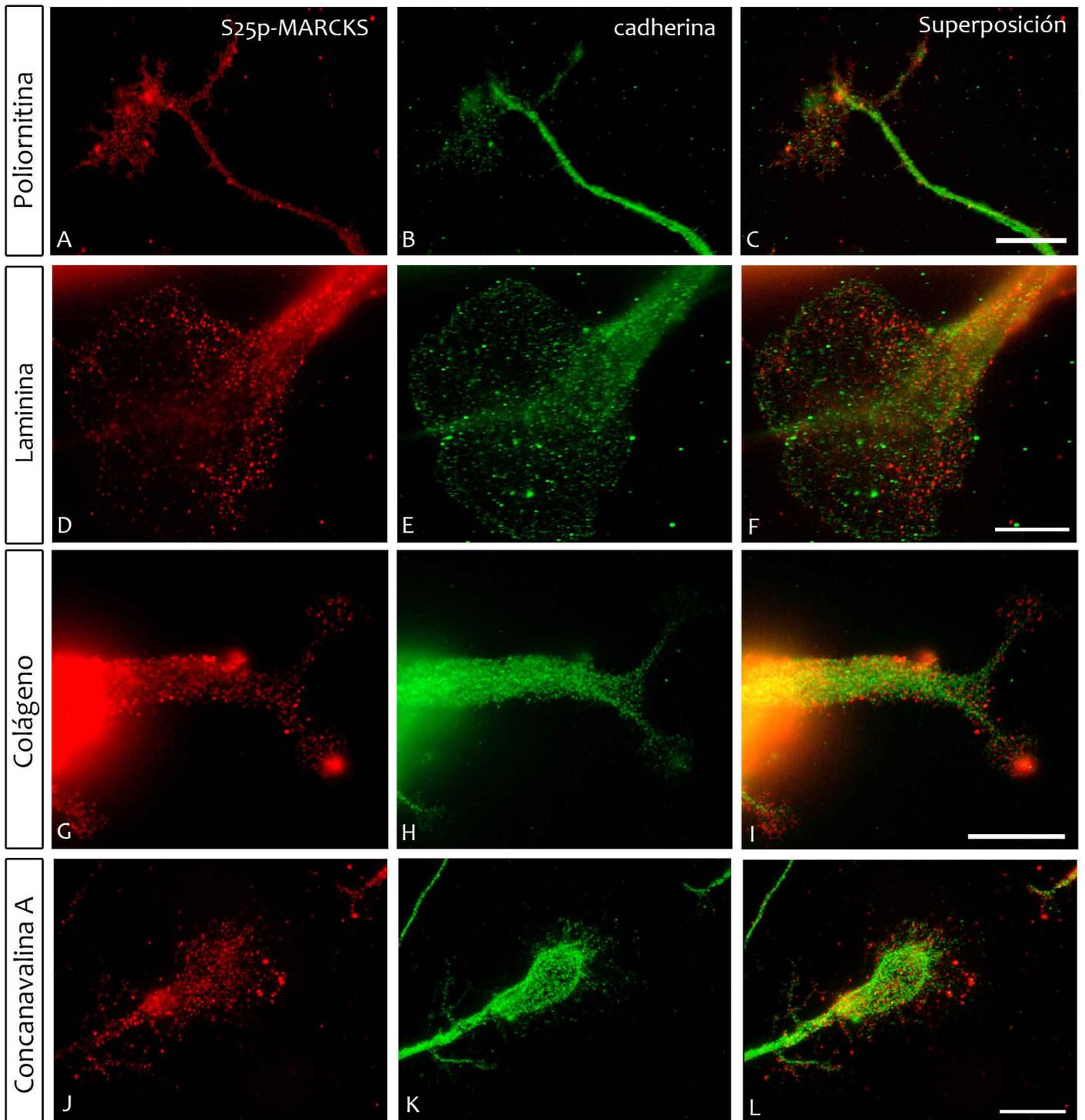


Figura 25: Localización de S25p-MARCKS y pan-cadherina en neuroblastos de embriones de pollo de E8, cultivados sobre diferentes sustratos 3-5 *div*. Se muestran imágenes de epifluorescencia de conos de crecimiento de diverso tamaño y morfología. **(A-C)** Neuroblastos cultivados sobre poliornitina. **(D-F)** Neuroblastos cultivados sobre laminina 10 µg/ml. **(G-I)** Neuroblastos cultivados sobre colágeno I. **(J-L)** Neuroblastos cultivados sobre concanavalina A 1 mg/ml. Barras 10 µm.

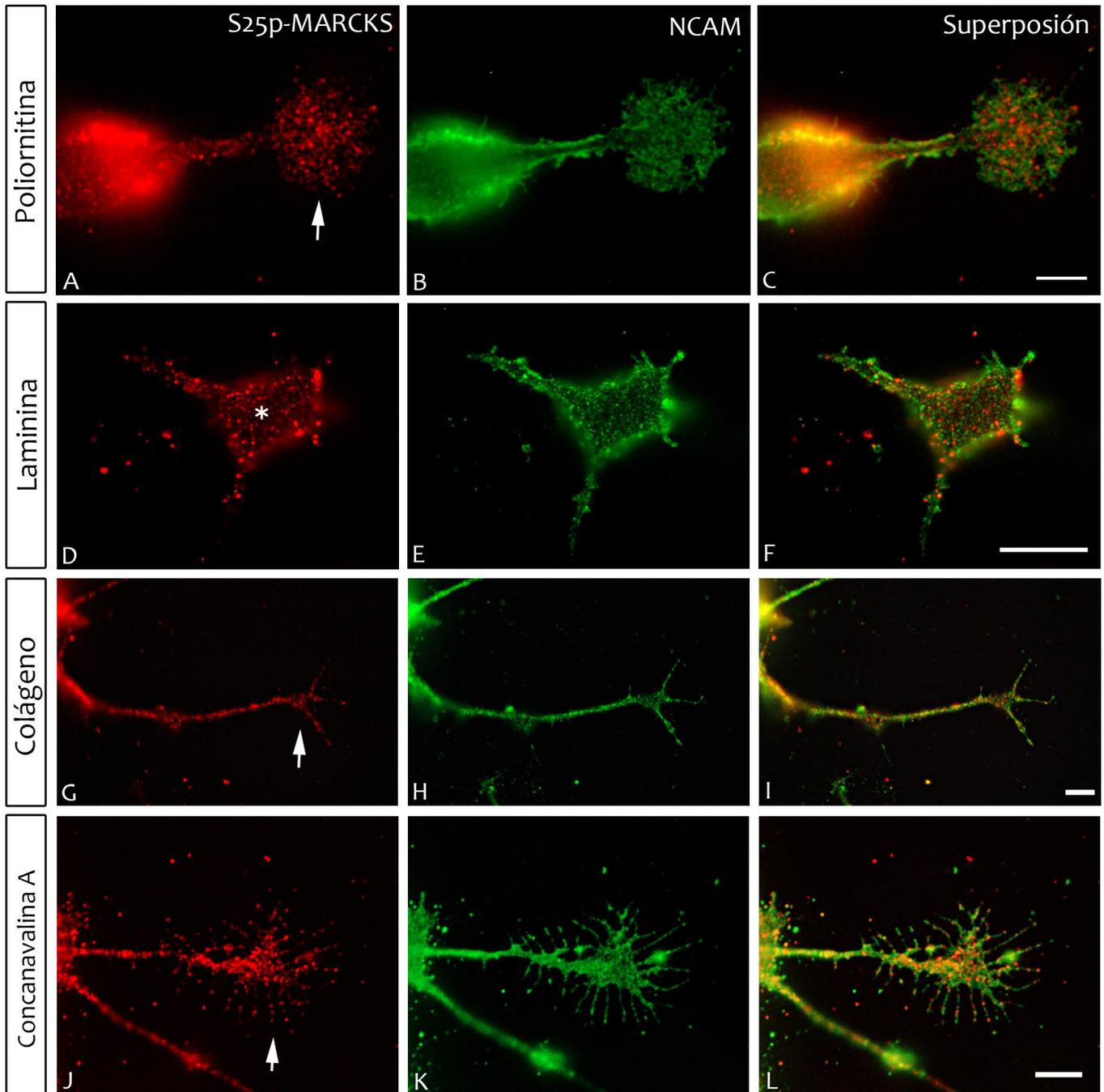


Figura 26: Localización de S25p-MARCKS y NCAM en neuroblastos de embriones de pollo de E8 cultivados durante 3-5 *div* sobre diferentes sustratos. Se muestran imágenes de epifluorescencia de conos de crecimiento (flechas) y somas neuronales (asterisco). **(A-C)** Neuroblastos cultivados sobre poliornitina. Soma neuronal y cono de crecimiento de gran tamaño **(D-F)** Neuroblastos cultivados sobre laminina 10 mg/ml. Región basal del soma neuronal, región de adhesión al sustrato. **(G-I)** Neuroblastos cultivados sobre colágeno I. Neurita con pequeño cono de crecimiento. **(J-L)** Neuroblastos cultivados sobre concanavalina A 10 mg/ml. Conos de crecimiento con filopodios extendidos. Barras: 10 μ m.

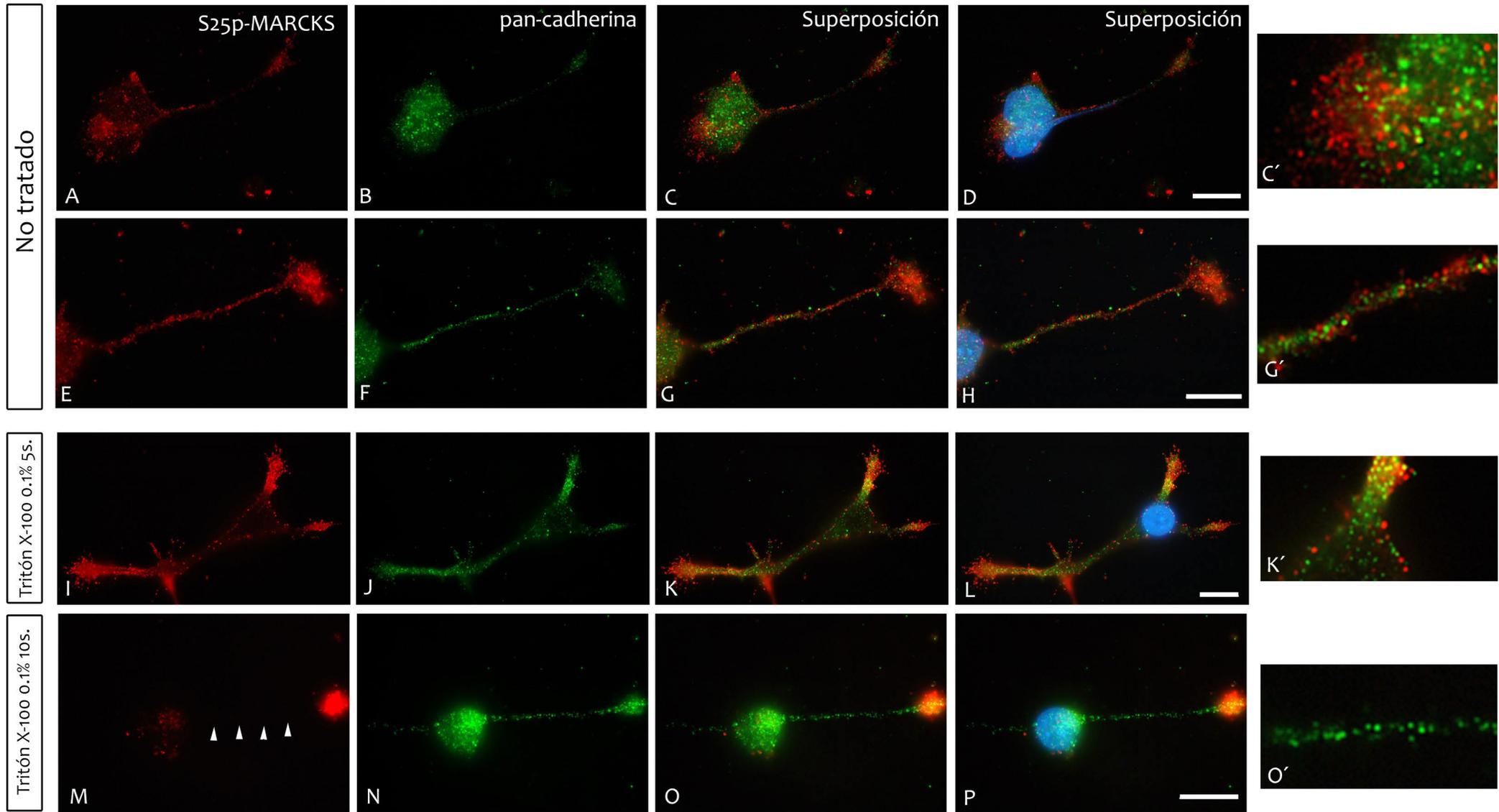


Figura 27: Localización de S25p-MARCKS y pan-cadherina en neuroblastos de la retina de embriones de pollo de E8 cultivados sobre poliornitina y extraídos con Tritón X-100 al 0.1% en hielo previo a la fijación. Imágenes de epifluorescencia. **(A-H)** Neuroblastos no incubados en Tritón X-100 previo a la fijación. **(I-L)** Neuroblastos incubados en Tritón X-100 al 0.1% durante 5 segundos. **(M-P)** Neuroblastos incubados con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 segundos. Las cabezas de flecha señalan la solubilización de la mayor parte de S25p-MARCKS en la neurita del neuroblasto de la figura. **(C', G', K', O')** Regiones de interés ampliadas de las imágenes de superposición de la fila adyacente, que permiten una observación más detallada de los parches de proteína. Barras: 10 μ m.

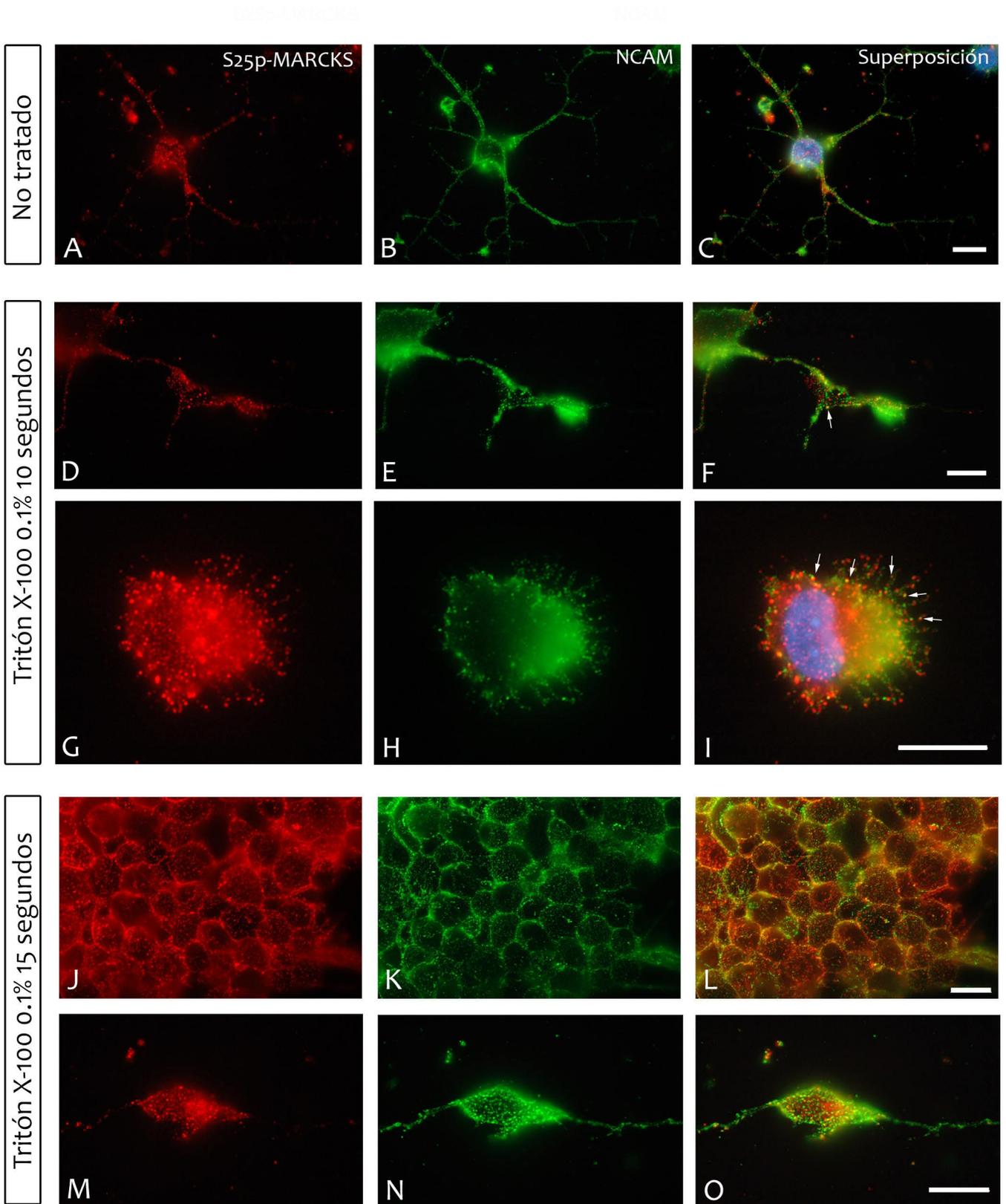


Figura 28: Localización de S25p-MARCKS y NCAM en neuroblastos de embriones de pollo de E8 cultivados sobre poliornitina y extraídos con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 y 15 segundos en hielo. Imágenes de epifluorescencia. **(A-C)** Neuroblastos fijados sin extracción previa con Tritón X-100. **(D-I)** Neuroblastos incubados con Tritón X-100 al 0.1 % durante 10 segundos antes de la fijación. **(J-O)** Neuroblastos incubados en Tritón X-100 al 0.1% durante 15 segundos previo a la fijación. Barras: 10 μ m.

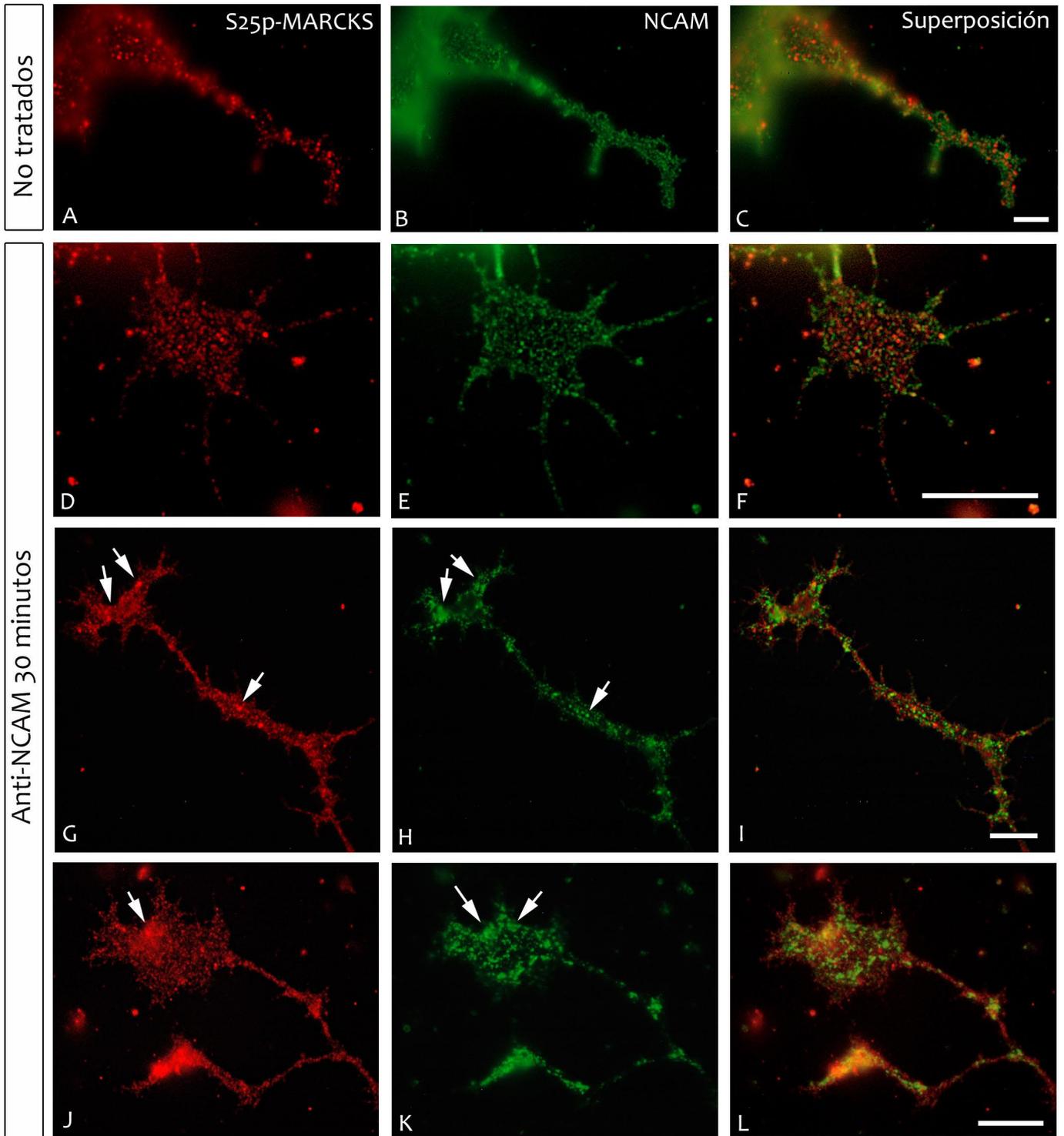


Figura 29: Localización de S25p-MARCKS y NCAM en neuroblastos incubados con un anticuerpo anti NCAM previo a la fijación. Neuroblastos cultivados a baja densidad sobre poliornitina fueron incubados luego de 3 *div* con un anticuerpo anti NCAM, durante 30 minutos. Luego las células fueron fijadas y se realizó la inmunodetección de S25p-MARCKS y NCAM. Se muestran imágenes de epifluorescencia. Flechas señalan acumulos de gran tamaño de S25p-MARCKS y NCAM. (A-C) No tratados. (D-L) Tratados. (D-F) Somas. (G-L) conos de crecimiento. Barra: 10 μ m.

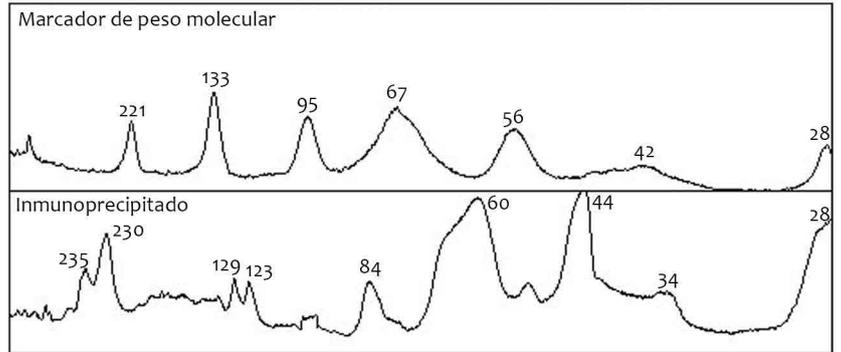
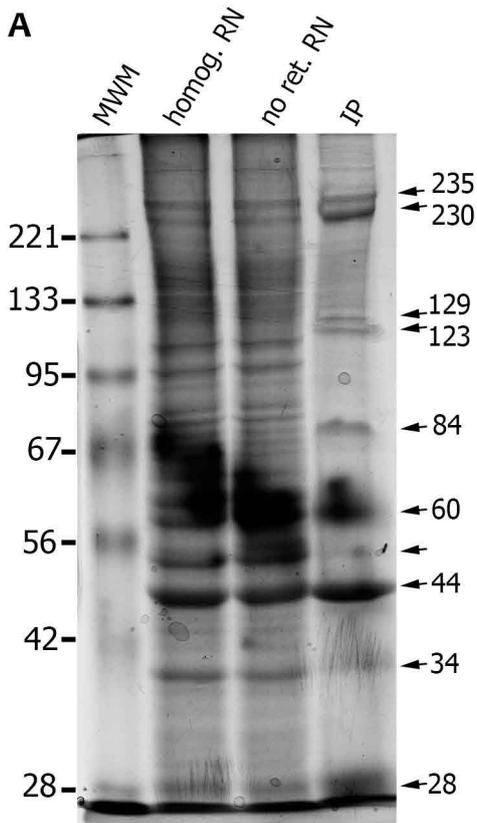
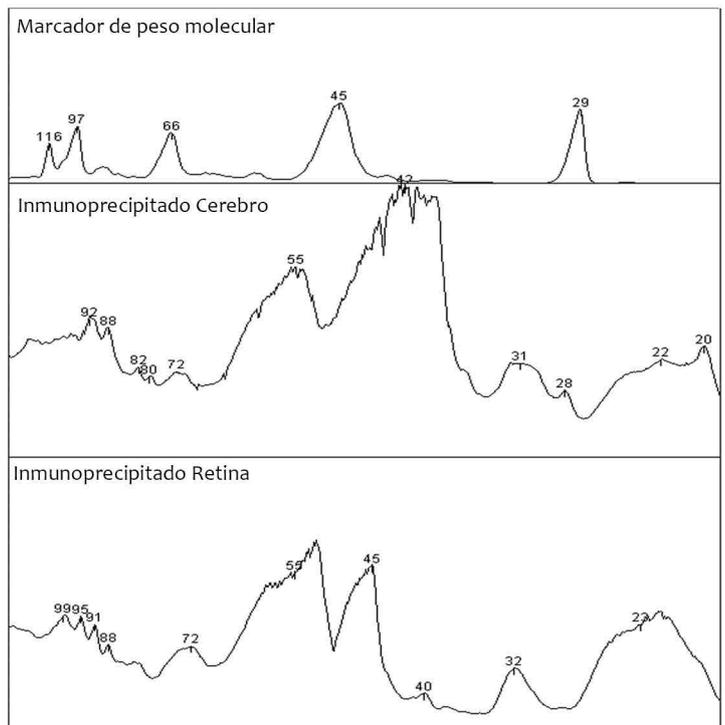
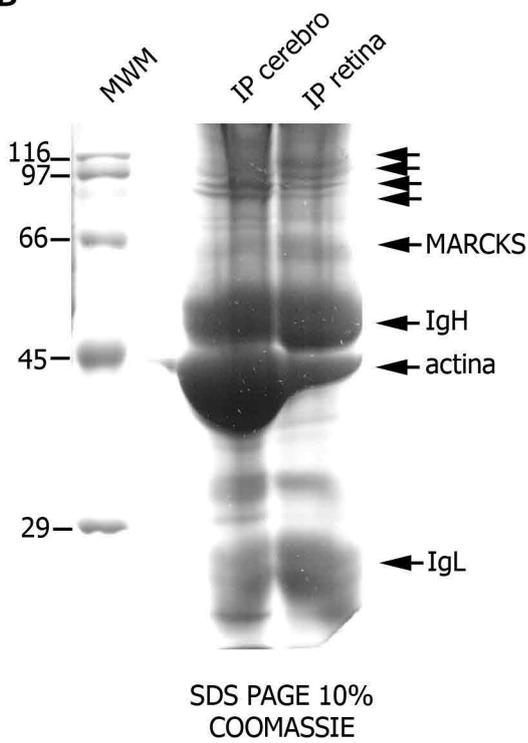
acontecían cambios en la distribución de S25p-MARCKS. De formar parte de los mismos dominios (macrodominios), la coalescencia de los parches de NCAM podría alterar o arrastrar a S25p-MARCKS a una nueva distribución. En la figura 29 puede observarse cómo los tratamientos con el anticuerpo anti-NCAM provocan la aparición de acúmulos de gran tamaño de la proteína tanto en el soma como en las neuritas y conos de crecimiento (figura 29 flechas). Sin embargo, este reordenamiento de los dominios no alteró la distribución de S25p-MARCKS. No se vio afectado ni el número ni el tamaño aparente de los acúmulos. Tampoco constatamos un incremento en los puntos de colocación de ambas proteínas (figura 29 D-L).

Estos resultados nos permiten excluir entonces la ocurrencia de codistribución de S25p-MARCKS con las moléculas de adhesión inter-celular analizadas, cadherina y NCAM, a nivel subcelular en neuroblastos de la retina cultivados sobre diferentes sustratos. No pudimos detectar, mediante las aproximaciones experimentales utilizadas, vinculación de estas proteínas a nivel de los mismos microdominios o macrodominios de membrana. Si bien es conocida la presencia de todas estas proteínas en estos sitios particulares de membrana los resultados presentados aquí muestran que no estarían en los mismos.

2.6) Identificación de interactores moleculares

Las proteínas naturalmente desplegadas como MARCKS se caracterizan por poseer una alta capacidad de interacción, lo cual les confiere la posibilidad de ser nodos en redes de señalización de proteínas (Uversky y Dunker, 2012). Considerando la posibilidad de que la fosforilación en la S25 facilite o determine la interacción de MARCKS con otras moléculas, particularmente otras proteínas, nos propusimos identificar los posibles interactores moleculares directos o indirectos de S25p-MARCKS. Para ello, realizamos inmunoprecipitaciones a partir de cerebros o retinas de embriones de pollo de 8 y 12 días de incubación, utilizando el anticuerpo monoclonal 3C3 acoplado a sefarosa. Primero comparamos los perfiles de las proteínas coinmunoprecipitadas mediante el análisis densitométrico de las muestras separadas mediante SDS-PAGE, teñidas con azul brillante de Coomassie o Blue Silver. Los gels fueron luego analizados utilizando el software Image J y su herramienta para el análisis de gels. En estos análisis pudimos determinar la presencia de al menos 8 bandas de diverso peso molecular correspondientes a proteínas coinmunoprecipitadas (figura 30 A). Los pesos moleculares estimados de dichas proteínas rondan los 235, 230, 129, 123, 84, 60, 44, 34 y 28kDa. En estas imágenes de los análisis densitométricos se puede constatar que las bandas de mayor intensidad, es decir que las proteínas más

Figura 30: Inmunoprecipitaciones de S25p-MARCKS en homogenizados de retina neural y cerebros de embriones de pollo. **(A)** Estudio de las proteínas coinmunoprecipitadas con S25p-MARCKS en retinas de embriones de pollo de E12. Muestras del homogenizado, las proteínas no retenidas y las coinmunoprecipitadas fueron separadas en un SDS-PAGE al 10% y teñido con Blue Silver. Los pesos moleculares de las proteínas coinmunoprecipitadas fueron determinados mediante ImageJ (gráficos de la derecha) y se indican con flechas a la derecha del gel. **(B)** Estudio comparativo de las proteínas coinmunoprecipitadas con S25p-MARCKS en retinas y cerebros de embriones de pollo de E12. Muestras de las proteínas coinmunoprecipitadas a partir de ambos tejidos fueron separadas en un SDS-PAGE al 10% y teñido con Coomassie. Los pesos moleculares de las proteínas coinmunoprecipitadas fueron determinados mediante Image J (gráficos de la derecha). A la derecha del gel se indican con flechas las identidades putativas de acuerdo a su peso molecular, de las proteínas coinmunoprecipitadas.

A**B**

abundantes son las de 60, 44 y 28kDa. Posiblemente estas correspondan a la subunidad mayor de la IgG utilizada para la inmunoprecipitación, a la actina (ver figura 31 B) y la subunidad menor de IgG, respectivamente. Las otras bandas corresponden a proteínas no identificadas.

Estudiamos posteriormente, si existían diferencias en el perfil de proteínas inmunoprecipitadas en cerebro y retina (figura 30 B) y en diferentes estadios del desarrollo (no mostrado). Para ello separamos las proteínas coimmunoprecipitadas en geles de acrilamida al 8% o 10%, y variando el tiempo de corrida del gel para separar más a las proteínas de bajo o alto peso molecular. En dichos perfiles constatamos que no existen diferencias importantes en el patrón de proteínas coimmunoprecipitadas, comparando las muestras de cerebro y retina entre sí, ni en diferentes estadios de desarrollo como se muestra en el ejemplo de la figura 30 B. No existen diferencias importantes de las cantidades relativas de las proteínas coimmunoprecipitadas en las distintas muestras, excepto la proteína de 45kDa, presumiblemente actina, que es mucho más abundante en el cerebro.

La presencia de un número importante de proteínas coimmunoprecipitadas motivó la identificación de las mismas mediante dos estrategias experimentales diferentes: MALDI-TOF y Western-blot. Realizamos estos ensayos a partir de retinas embrionarias de 12 días de desarrollo, de manera de reducir la posible contaminación con actina, dada su abundancia en el cerebro, evitando así alteraciones en la migración proteica en el SDS-PAGE. Una de las dos aproximaciones utilizadas para la identificación de los posibles interactores de S25p-MARKCS, consistió en el análisis de las proteínas coimmunoprecipitadas mediante mapeo peptídico con tripsina y medida por MALDI-TOF. El análisis de proteínas coimmunoprecipitadas fue realizado por la Unidad de Proteómica y Bioquímica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo. Como se muestra en la figura 31 A, separamos las proteínas coimmunoprecipitadas a partir de retinas de E12 y seleccionamos algunas bandas de interés. En la figura 31 se muestra un gel con las bandas recortadas para su análisis por MALDI-TOF a modo de ejemplo. Estos análisis permitieron la identificación de cuatro proteínas como se indican en la tabla a continuación (figura 31 A.1, A.2, A.3).

Tabla 1: Análisis por MALDI-TOF de las bandas recortadas del gel de separación de las proteínas coimmunoprecipitadas, que se muestra en la figura 31 A.

PROTEÍNA	PESO MOLECULAR TEÓRICO (kDa)	MASA MOLECULAR EN SDS-PAGE (kDa)
Espectrina	285	218
Tenascina	243	204
Drebrina E	65	116/109/99
Actina	40	116/109/99

En particular la drebrina E y la espectrina son capaces de interactuar con la actina, por lo que no se puede descartar que su presencia en la muestra corresponda a interacciones con actina y no con S25p-MARCKS directamente. De hecho, la drebrina cuyo peso molecular teórico es de 65-67kDa (dependiendo del tipo; Shirao, 1995) fue identificada en bandas de 99, 109 y 116kDa. En estos casos los espectros de masas obtenidos, analizados con el motor de búsqueda Mascot, identificaron la presencia de drebrina E y también de β -actina (peso molecular teórico 40kDa) con lo cual se pueden encontrar formando complejos, que a su vez fueron coimmunoprecipitados en tanto productos de la interacción de S25p-MARCKS con la actina.

Por otro lado, la aparición de la tenascina, una proteína de la MEC, entre las proteínas coimmunoprecipitadas, nos resultó desconcertante. No obstante, puede interpretarse también como una proteína de interacción indirecta con MARCKS, que forme parte de complejos macromoleculares en los que se encuentra presente la actina, con quien, a su vez, MARCKS es capaz de interactuar directamente.

En otra serie de experimentos, tratamos de identificar interactores de S25p-MARCKS mediante Western-blot de inmunoprecipitaciones realizadas a partir de retinas. Los mismos nos permitieron determinar, al igual que los análisis por MALDI-TOF que la variante fosforilada en la S25 es capaz de interactuar directa o indirectamente con actina, como fuera descrito previamente (figura 31 B) (Toledo y Arruti, 2009). Además, encontramos coimmunoprecipitación con calmodulina, lo cual resulta muy interesante ya que es la primera evidencia de que esta fosforilación no impide la capacidad de MARCKS de interactuar con calmodulina, como sí lo hacen las fosforilaciones en el ED. No se detectó coimmunoprecipitación con cadherinas, NCAM y β -catenina (figura 31 B) lo cual va en la misma línea de nuestros hallazgos en IFI sobre cortes de retina neural o cultivos de células aisladas.

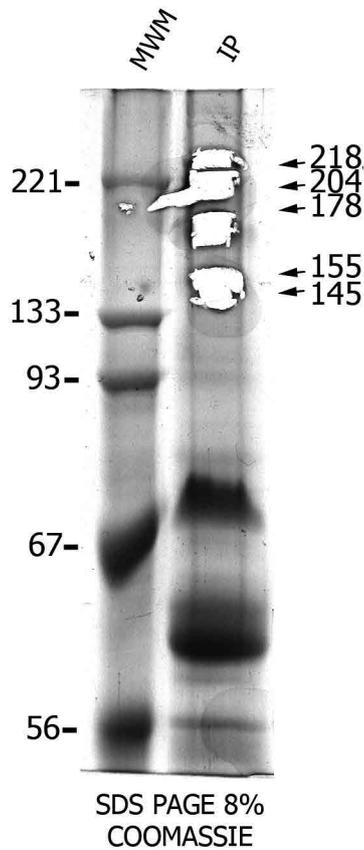
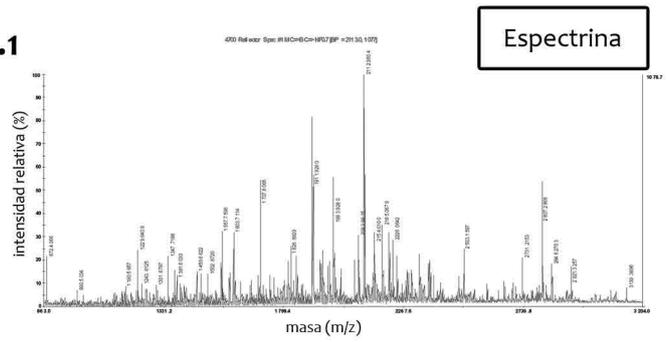
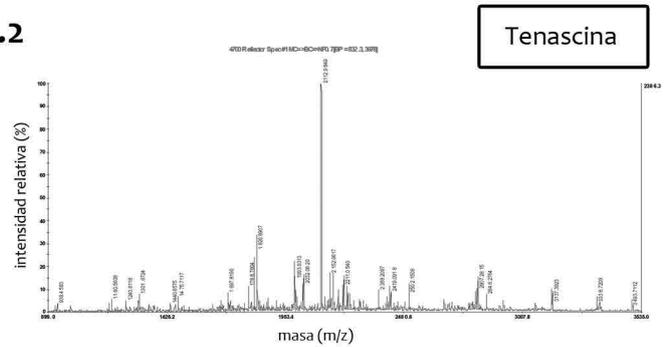
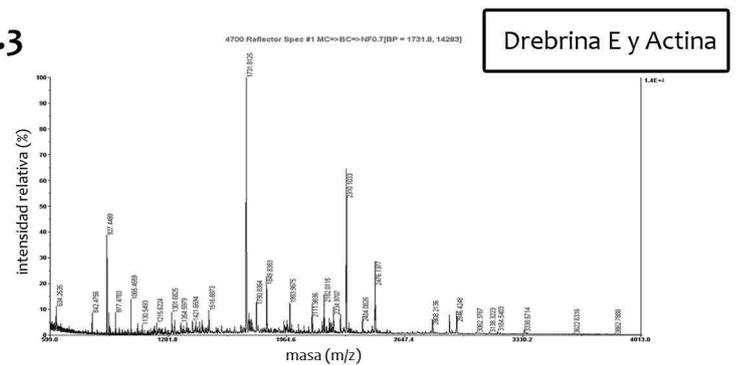
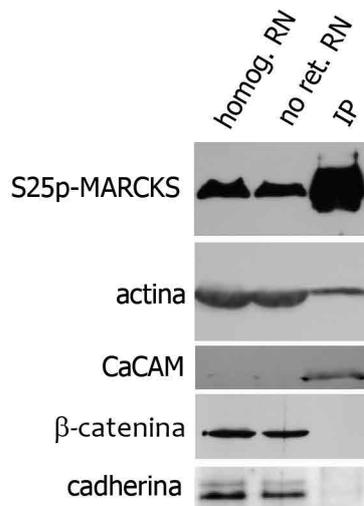
A**A.1****A.2****A.3****B**

Figura 31: Estudio por espectrometría de masas y Western-blots de las proteínas coimmunoprecipitadas con S25p-MARCKS. **(A)** SDS-PAGE de proteínas coimmunoprecipitadas con S25p-MARCKS teñidas con azul de Coomassie. Bandas seleccionadas de 218, 204, 178, 155 y 145 kDa fueron recortadas y analizadas mediante espectrometría de masa. A la derecha se muestran algunos de los espectros de masas y se indican las proteínas identificadas en los mismos. A1: espectrina, A2: tenascina y A3: drebrina E y actina. **(B)** Western-blots de las proteínas coimmunoprecipitadas a partir de retinas embrionarias de E12. Las muestras de homogenizado, de proteínas no retenidas y proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas mediante SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Se muestran las inmunodetecciones de S25p-MARCKS, actina, CaCAM, β-catenina y cadherina. Se observa coimmunoprecipitación de S25p-MARCKS con actina y CaCAM, pero no con las otras proteínas inmunodetectadas.

DISCUSIÓN

En este Capítulo comunicamos los resultados de experimentos diseñados para evidenciar qué eventos son capaces de activar o modular la actividad de la enzima responsable de la fosforilación en la S25, de manera que regulen características tales como el nivel de fosforilación o el emplazamiento subcelular de S25p-MARCKS. Analizamos si algunas moléculas de la MEC o factores de crecimiento subyacen a la activación de las cascadas de señales que terminan con la fosforilación de la S25.

- **Los elementos de la MEC como promotores de la fosforilación de MARCKS en la S25.**

Es conocido que los sustratos propuestos a los neuroblastos son capaces de modular su adhesión y el crecimiento neurítico. La unión a componentes de la MEC (laminina, colágeno, fibronectina, etc.) tiene lugar a través de proteínas específicas, entre ellas las integrinas, que reconocen selectivamente diferentes componentes de la matriz. La unión a la poliornitina o polilisina, sin embargo, se da de manera inespecífica y no responde a la interacción de un receptor en particular, por lo que seleccionamos este sustrato como control para nuestros experimentos. Se ha propuesto además que el crecimiento neurítico o la respuesta a señales de guía de crecimiento axónico son más rápidas en sustratos como la laminina respecto a sustratos de adhesión inespecífica como la poliornitina (Wang y Pfenninger, 2006). Esto tiene sustento en el hecho de que la adhesión y el crecimiento neurítico sobre un sustrato involucra ciclos de adhesión y disociación de la neurona, lo cual solo tiene lugar cuando la interacción es específica y regulada (Gatlin et al., 2006). En efecto, nuestros resultados muestran que los neuroblastos retinianos en cultivo presentaron un mayor crecimiento neurítico en sustratos tales como la laminina, frente al sustrato utilizado como control, la poliornitina. Observamos mayor número de prolongaciones y de mucha mayor longitud en laminina lo que indica una mayor velocidad en el crecimiento neurítico. La presencia de un sustrato de este tipo permite el ensamblaje de complejos de adhesión, entre los que se destacan los conocidos como contactos focales, aunque en las neuronas predominan los contactos menos prominentes y más dinámicos (Gatlin et al., 2006). Estos complejos anclados a la membrana organizan de cierta manera el córtex celular ya que se encuentran en estrecha vinculación con el citoesqueleto de actina. Respecto a MARCKS, son diversas aunque contradictorias, las evidencias que la vinculan a fenómenos relacionados a la adhesión a la MEC. La sobreexpresión de una variante de MARCKS mutante constitutivamente asociada a la membrana, inhibe los estadios iniciales de la adhesión a sustrato, sugiriendo que la translocación de MARCKS al citosol es fundamental para permitir la adhesión (Myat et al., 1997; Spizz y Blackshear, 1997). Por otro lado, en los conos de crecimiento MARCKS refuerza los contactos con el sustrato mediados por la integrina $\alpha4\beta1$ que reconoce a la

laminina (Gatlin et al., 2006). Además, en sistemas no neurales se ha descrito la asociación de MARCKS con elementos del sistema de adhesión celular, por ejemplo en líneas celulares tumorales, donde se localiza en áreas de contacto dinámico célula-sustrato (para diferenciarlo de los contactos focales) colocalizando en gran medida con la integrina $\alpha 3$ (Estrada-Bernal et al., 2009). Por último, y de nuestro particular interés, la vinculación entre la actividad de Cdk5 y moléculas de adhesión como integrinas $\alpha 1\beta 1$ que reconocen a la laminina, ha sido evidenciada en diversos tipos celulares (Nikolic et al., 1996; Pignino et al., 1997; Paglini et al., 1998; Li et al., 2000a). En particular la adhesión a laminina incrementa la actividad de Cdk5 al promover un aumento en la transcripción y traducción de su activador p35 (Paglini et al., 1998; Li et al., 2000b). En nuestros experimentos no evidenciamos alteraciones en la localización o nivel de fosforilación de MARCKS en neuroblastos diferenciados sobre laminina. En cambio observamos que la cinética de aparición de la fosforilación en la S25 es diferente a la que manifiestan los neuroblastos cultivados en poliornitina. El incremento de la fosforilación de la S25 que tiene lugar luego de la explantación de los neuroblastos fue más marcado, y presentó diferencias en la localización subcelular en las células cultivadas sobre laminina. Sin embargo, al no encontrar diferencias entre las regiones basales en contacto con el sustrato rico en laminina y las regiones media o apical de la célula, podemos suponer que la activación de la fosforilación estaría asociada a la reorganización del córtex celular que sigue a la adhesión al sustrato. Por otro lado, es interesante señalar que existen antecedentes en la bibliografía que indican que la unión a la laminina incrementa los niveles de p35 en *toda* la célula ya que una vez traducido, el activador se inserta en distintas regiones de la membrana plasmática, y no solamente en los sitios de contacto con el sustrato (Paglini et al., 1998). Si este fuera el caso, una activación en la traducción de p35 repercutiría en la activación de Cdk5 en toda la célula participando en un proceso global de reestructuración del córtex y no solamente en la región en contacto con el sustrato. Esta hipótesis sería fácilmente analizable si pudiéramos disponer de anticuerpos que reconozcan p35 de manera confiable en el pollo. De esta manera se podría poner en evidencia si existe un incremento en la cantidad de p35 en los neuroblastos retinianos cultivados en estas condiciones. Además, para analizar el efecto de la reorganización del córtex celular podrían inhibirse o activarse receptores de laminina con anticuerpos específicos o con péptidos RGD (Arg-Gly-Asp) de reconocimiento de integrinas, y evidenciar que efecto tiene esto sobre la fosforilación en la S25.

- **Rol de los factores de crecimiento en la fosforilación de la S25 de MARCKS.**

Luego de evaluar efectos de la adhesión a componentes de la MEC como posibles factores promotores de la fosforilación en la S25, analizamos si algunos de los factores de crecimiento conocidos por participar en la regulación de distintos eventos durante el desarrollo de la retina neural, afectaban la fosforilación en la S25. Es por esto que estimulamos cultivos de neuroblastos de la retina con factores de crecimiento cuya repercusión sobre la

expresión o actividad de Cdk5 o MARCKS ha sido evidenciada. En particular, algunas referencias mostraron cómo la expresión de p35 y por tanto la actividad de Cdk5 se ve incrementada en respuesta al NGF (Harada et al., 2001; Chen et al., 2010). Por su parte, los tratamientos de células de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y con IGF-1 inducen una translocación de MARCKS a la membrana, lo cual podría contribuir a formar parte del pool de moléculas fosforilables por Cdk5 (Shiraishi et al., 2006; Yamaguchi et al., 2009). En nuestros experimentos encontramos que los tratamientos con NGF no alteran la cinética de aparición ni la localización de la fosforilación en la S25 de MARCKS cuando es agregado en los cultivos recién explantados. Si NGF es capaz de estimular la traducción de p35 y por tanto la actividad de Cdk5, entonces ¿cómo podemos explicar esta aparente discrepancia entre nuestros resultados y las evidencias existentes? El ARNm del NGF es detectado en la retina embrionaria de pollo desde el cuarto día de desarrollo (Frade et al., 1999). Este es capaz de interactuar en la superficie celular con sus receptores tirosina quinasa TrkA o con su receptor de menor afinidad, p75. Tal vez en las neuronas de la retina, si bien están presentes tanto NGF como sus receptores, las cascadas de señalización que activan su interacción no desencadenan un aumento en la traducción de p35. Nuevamente, al igual que en los experimentos anteriores sobre sustratos, nuestras conjeturas podrían ser analizadas estudiando los niveles de p35, tanto de la proteína como de su mensajero, mediante Western-blot o RT-PCR. Por otro lado, es conocido que durante la diferenciación de la retina existen varias olas de apoptosis que acompañan al desarrollo normal (Prada et al., 1991; Frade et al., 1999). Además, la interacción de NGF con su receptor p75 ha sido relacionada con la inducción de muerte neuronal en la retina (Frade et al., 1999). Estas evidencias podrían sugerir que en las primeras etapas del desarrollo retiniano en aves o durante el cultivo de neuroblastos en la retina, se produzca un desbalance en favor de la expresión del receptor p75 en lugar de TrkA, lo cual resultaría en la activación de una cascada de señalización intracelular que no determine la transcripción de p35.

En cambio los tratamientos con IGF-1 indujeron un claro aumento en el crecimiento neurítico respecto a los cultivos no tratados. Además, si bien no evidenciamos un incremento en la cantidad de MARCKS total, sí evidenciamos un incremento en la fosforilación en la S25. Desconocemos si, tal como ocurre en células de neuroblastoma de la línea SH-SY5Y, el tratamiento con IGF-1 induce una translocación de MARCKS a la membrana en nuestros cultivos de retina, al menos no lo pudimos demostrar mediante IFI. Fraccionamientos subcelulares podrían aclarar este punto y nos permitirían dilucidar si la translocación de MARCKS a la membrana facilita o promueve su fosforilación en la S25, sin descartar que la estimulación de la fosforilación se dé por vías accesorias, como por ejemplo mediante alguna cascada de señalización que active a Cdk5 por un mecanismo que no implique el aumento en la expresión de su activador. Además, sería interesante dilucidar qué cascadas de señalización son activadas como consecuencia de la estimulación con IGF-1. Por otra parte, considerando los

resultados expuestos aquí y el efecto activador de la laminina sobre la fosforilación en la S25, podrían analizarse los efectos de tratamientos combinados, es decir cultivos sobre laminina estimulados con IGF-1. En estos experimentos podríamos encontrar un efecto potenciador ante la combinación de ambos tratamientos, lo que podría sugerir la existencia de elementos en común activados en las cascadas intracelulares de señalización.

- **La fosforilación en la S25 de MARCKS no propicia su interacción con proteínas de adhesión intercelular.**

Si bien existen numerosas evidencias en las que se demuestra la relación entre MARCKS y los procesos de contacto célula-sustrato, son menos numerosas las que lo vinculan con procesos de contacto inter-celulares, tanto en células de tipo neuronal, como no neuronal. Las protocadherinas son moléculas de adhesión de la familia de las cadherinas que participan en el proceso de arborización en neuronas corticales. La delección del grupo de genes de las protocadherinas resulta letal en ratones. Sin embargo, los ratones *knock-out* condicionales de esta proteína han permitido identificar distintos actores en la vía de regulación de la neuritogénesis. En particular, de nuestro interés es que MARCKS se encuentra hiperfosforilada en el ED en ratones *knock-out* para las protocadherinas, debido a la hiperactivación de PKC por la vía FAK-PLC. El fenotipo mutante de estos ratones es rescatado por la sobreexpresión de MARCKS salvaje o de una variante no fosforilable en el ED (Garrett et al., 2012). En este caso, parece importante la asociación de MARCKS a la membrana en los procesos relativos a la arborización dendrítica. Estos resultados aportan evidencias que sugieren que MARCKS puede participar en eventos de organización del córtex celular, tanto vinculado al contacto célula-sustrato (discutido anteriormente), como en los sitios de contacto intercelular. Considerando que nosotros encontramos a la variante fosforilada de MARCKS en la S25 principalmente asociada a la membrana plasmática de la célula y enriquecida en las zonas de contacto célula-célula, nos preguntamos si esta modificación postraduccional modula la capacidad de interactuar con moléculas de adhesión. Para contestar esta pregunta, evidenciamos mediante IFI la localización de S25p-MARCKS y moléculas vinculadas a la adhesión intercelular de vital importancia en el desarrollo neuronal, tales como NCAM, cadherina y α - y β -cateninas. Estas moléculas de adhesión que median contactos homófilicos son determinantes claves en el crecimiento neurítico y la sinaptogénesis. Las cadherinas por ejemplo, se vinculan con el mantenimiento de la integridad del neuroepitelio durante la migración de los progenitores, así como en la segregación de las diferentes capas de la retina (Mey y Thanos, 2000). Los resultados obtenidos en las IFI sobre cortes de retina de embriones de distintos estadios del desarrollo resultaron francamente alentadores ya que demostraron que tanto NCAM como las cadherinas son abundantes en la periferia celular, en las mismas capas de la retina en donde encontramos un enriquecimiento de S25p-MARCKS. Si bien los patrones de expresión no resultaron idénticos, ya que las moléculas de adhesión presentaban un patrón más extendido que S25p-MARCKS, encontramos zonas de enriquecimiento de todas estas proteínas especialmente a nivel de las capas de fibras, en

donde tienen lugar eventos de vital importancia como la sinaptogénesis. Por tanto, considerando que a nivel tisular encontramos colocalización, analizamos a nivel subcelular en cultivos de neuroblastos de la retina, la posible codistribución entre S25p-MARCKS y cadherinas o NCAM. Nuestros análisis por IFI sobre cultivos de neuroblastos, si bien nos permitieron evidenciar la presencia de estas proteínas en los tres dominios celulares analizados: somas, prolongaciones y conos de crecimiento, y todas localizándose en parches subplasmalémicos, no pusieron de manifiesto la colocalización entre ellas y S25p-MARCKS. Tampoco aparecieron variaciones cuando expusimos los neuroblastos a diferentes sustratos. Por tanto, estos resultados sugirieron que S25p-MARCKS no estaría formando parte de complejos funcionales con NCAM o cadherinas, no al menos en las situaciones fisiológicas analizadas. Sin embargo, considerando algunos datos que indican la localización de estas moléculas en dominios particulares de membrana denominados dominios de membrana resistentes a detergente (DRM) (Laux et al., 2000; Palestini et al., 2002; Toledo y Arruti, 2009), nos planteamos como objetivo estudiar si a nivel de estos microdominios existía colocalización de S25p-MARCKS con cadherina o NCAM. Estas balsas lipídicas pueden ser distinguidas por su resistencia a la extracción con un detergente no iónico como el TritónX-100. En particular en la célula dos elementos determinan la insolubilidad al Tritón X-100: 1) la asociación a dominios de membrana resistentes al detergente o "rafts" y 2) la asociación al citoesqueleto, en este caso en particular la asociación al citoesqueleto de membrana. En nuestros experimentos, luego de someter a los neuroblastos a la extracción con Tritón X-100 durante tiempos cortos, aparecieron acúmulos de mayor tamaño de S25p-MARCKS, de cadherinas y NCAM. Esto puede ser consecuencia de la remoción de las moléculas de estas proteínas que no se encontraban asociadas a microdominios resistentes al detergente, o también puede deberse a la coalescencia de parches de mayor tamaño. No podemos descartar que estos parches resistan debido a encontrarse asociados al citoesqueleto de actina o a complejos proteicos de asociación al citoesqueleto de actina. Además encontramos la remoción de la mayor parte de S25p-MARCKS en las neuritas, antes que en los somas neuronales, aunque las moléculas de adhesión mostraron resistencia en estos mismos sitios. ¿Por qué desaparecen antes los parches de las neuritas? ¿Son acaso menos resistentes al detergente porque su naturaleza lipídica es diferente, o se trata de un evento relacionado al acceso del detergente a las proteínas? Un fenómeno similar fue observado en los somas en donde los acúmulos de S25p-MARCKS fueron más resistentes al Tritón X-100 en la superficie basal que en la apical, es decir que apreciamos un gradiente de extracción. Esto puede tener explicación nuevamente en el hecho de que los parches basales se encuentran formando parte de complejos de adhesión al sustrato (no puestos en evidencia en nuestros experimentos) actuando como elementos de estabilidad de los parches de membrana frente a los que se encuentran en la superficie apical, que claramente no están participando de la organización del citoesqueleto de actina en lo que tiene que ver con la adhesión al sustrato sino en relación al mantenimiento de la citoarquitectura. Por otro lado, no podemos descartar que el acceso del detergente al espacio virtual existente

entre la superficie basal de la célula y el sustrato sea menor, por motivos difusionales, que el acceso a la superficie apical de la célula. De acuerdo a estos resultados, no podemos concluir que la fosforilación en la S25 propicie la formación de complejos entre MARCKS y moléculas de adhesión intercelular como cadherinas y NCAM ni la relocalización a nivel de los mismos. En cambio, la organización de los parches basales y su resistencia a la extracción con detergente apoyan nuevamente la posible relación entre estos y sitios privilegiados de contacto con el sustrato. Análisis por IFI con elementos de la familia de las integrinas pueden aportar información que apoyen nuestras conjeturas.

- **Búsqueda de interacciones directas o indirectas de MARCKS con posible rol fisiológico.**

La búsqueda de proteínas o moléculas con las cuales MARCKS sea capaz de interactuar directa o indirectamente en distintas condiciones fisiológicas constituye un mecanismo para acercarnos a él o los posibles roles fisiológicos de MARCKS. Además de sus interactores clásicos, actina y CaCAM, se ha encontrado que MARCKS es capaz de interactuar con la proteína motora miosina V y la chaperona Hsp70, y más recientemente se determinó su interacción con NCAM (Arbuzova et al., 2002; Theis et al., 2013). En esta sección del trabajo nos propusimos analizar mediante diferentes abordajes experimentales los posibles interactores moleculares de MARCKS, si bien no discriminamos si se trataba de interactores directos o indirectos, es decir formando parte de complejos proteicos. Además, es importante tener en cuenta que si bien realizamos las inmunoprecipitaciones utilizando un anticuerpo que reconoce la variante fosforilada de MARCKS, la presencia de una proteína coimmunoprecipitada no indica necesariamente que su interacción dependa de la fosforilación en la S25 dado que ese residuo está en el sitio de interacción con el anticuerpo. Para distinguir si la fosforilación es necesaria deberíamos efectuar ensayos de interacción *in vitro* con las proteínas fosforiladas en la S25 y no fosforiladas, purificadas. De esta manera podemos evaluar si la fosforilación confiere alguna característica, como por ejemplo un cambio conformacional en la proteína que posibilite su interacción con otros ligandos. Por otra parte, análisis comparativos de los inmunoprecipitados obtenidos con el Acm 3C3 y con el anticuerpo polo 52 (anti-MARCKS total) podrían contribuir a identificar posibles interactores que se unan diferencialmente a MARCKS cuando no está presente la fosforilación en la S25.

Los análisis por Western-blots claramente solo pueden abarcar el estudio de interactores de alguna manera conocidos, como pueden ser la actina o calmodulina, y no nos permiten realizar una búsqueda más amplia de interactores no conocidos. Por este motivo, nuestra primera aproximación fue la identificación de interactores clásicos y algunos no conocidos pero de nuestro interés, como las proteínas de adhesión. Como describiéramos en trabajos previos, la fosforilación en la S25 no impide la interacción de MARCKS con actina (Toledo y Arruti, 2009), a diferencia de las fosforilaciones clásicas por PKC en el ED que repelen electrostáticamente la interacción

con actina (Hartwig et al., 1992; Arbuzova et al., 2002). Sin embargo, no podemos concluir que la fosforilación en el dominio aminoterminal de la proteína no repercute de alguna manera en la afinidad que presenta el ED por la actina. Es conocido, y nosotros hemos evidenciado la ocurrencia de interacciones de rango amplio en esta proteína naturalmente desplegada, en donde fenómenos que tienen lugar en el ED tienen efectos en zonas alejadas de la proteína (Toledo y Arruti, 2009). No podemos excluir, teniendo en cuenta estas evidencias, que la fosforilación en la S25 module de manera fina la interacción con actina, ya sea facilitándola o reduciéndola. Estudios de cosedimentación donde se comparen las afinidades de la proteína fosforilada en la S25 y no fosforilada, por los filamentos de actina, pueden aportar datos muy interesantes al respecto.

Por otro lado, un elemento que nos resultó novedoso fue la identificación de calmodulina como interactor de S25p-MARCKS. Nuevamente aquí vemos cómo la modificación de un residuo alejado del ED donde tiene lugar la interacción con calmodulina no impide su unión. Vale preguntarse si esta interacción se ve o no favorecida por el estado fosforilado de la proteína. En este sentido, los hallazgos de Yamamoto y cols. realizados con las proteínas *in vitro* utilizando MARCKS purificada a partir de cerebro bovino, muestran que la afinidad de MARCKS por calmodulina se ve incrementada cuando la misma es fosforilada por TPKII (Cdk5) (Yamamoto et al., 1995). Podría constituir este otro ejemplo de interacciones de rango amplio en donde una fosforilación en el extremo amino terminal de la proteína modula su interacción en regiones alejadas 150 aminoácidos de la misma.

Para ampliar el abanico de posibles interactores moleculares identificados, analizamos las proteínas coinmunoprecipitadas con S25p-MARCKS, mediante MARLDI-TOF. Un hallazgo de sumo interés fue la identificación de la drebrina E como posible interactor molecular de MARCKS. La drebrina (Developmentally regulated brain protein) es una proteína de interacción con actina, identificada por primera vez en el sistema nervioso de embriones de pollo (Shirao y Obata, 1986). Existen dos isoformas la E, de expresión ubicua en tejidos embrionarios, y la drebrina A que es específica de las neuronas adultas, ambas transcritas a partir del mismo gen y generadas por splicing alternativo. Debido a su naturaleza ácida y a modificaciones postraduccionales su peso molecular aparente calculado por SDS-PAGE es mayor al estimado a partir de sus secuencias aminoácidas, similar al fenómeno observado en MARCKS. La drebrina E que identificamos mediante MALDI-TOF es expresada en una variedad de tipos celulares durante estadios tempranos del desarrollo y se localiza en las regiones subplasmalémicas de la célula (Shirao y Obata, 1986). Durante el desarrollo del sistema óptico en pollos, la drebrina se concentra en los somas y los conos de crecimiento axónico (Shirao y Obata, 1986). En neuronas del hipocampo en cultivo, la drebrina E (única drebrina que se expresa en estas células) se localiza en la zona intermedia de los conos de crecimiento, en la región limítrofe entre la actina presente en los

lamelipodios y filopodios de la región periférica del cono de crecimiento, y la región central, rica en microtúbulos. De hecho la proteína EB3 de asociación al extremo de los microtúbulos, es responsable de posicionar a la drebrina en la región de transición, de manera que ella actúa mediando el contacto de estos dos elementos del citoesqueleto fundamentales para el crecimiento y la navegación de los conos de crecimiento axónicos (Geraldo et al., 2008). Su sobreexpresión promueve la elongación de los axones y su silenciamiento inhibe el crecimiento axónico (Mizui et al., 2009). Se une a la actina compitiendo con la tropomiosina, quien confiere estabilidad a los filamentos de actina. De esta manera los filamentos de actina unidos a la drebrina son fácilmente atacados por la gelsolina lo cual promueve un alto dinamismo de los filamentos (Ishikawa et al., 1994, 2007). En neuronas adultas, la drebrina A participa en la regulación del citoesqueleto de actina en las espinas dendríticas, modulando de esta manera la plasticidad sináptica. Forma parte de grandes complejos postsinápticos incluidos el receptor de NMDA, CAMKII, cofilina, PSD-95 y actina (Dun y Chilton, 2010). Las evidencias aquí expuestas hacen factible entonces que S25p-MARCKS interactúe con la drebrina E, formando complejos que podrían estar modulando la dinámica de actina durante la neurogénesis. No podemos descartar a partir de los resultados obtenidos que la interacción con drebrina tenga lugar de manera indirecta ya que tanto MARCKS como la drebrina interactúan con la actina y son muy abundantes en el sistema nervioso en desarrollo. Estudios posteriores de interacción *in vitro* son necesarios para confirmar esta interacción así como ensayos de inmunolocalización para determinar su co-distribución y propiciar análisis posteriores relativos a su relevancia funcional.

La identificación de tenascina como posible interactor de MARCKS resultó algo desconcertante. Los miembros de la familia de las tenascinas son elementos de la MEC que juegan un rol morfo-regulatorio durante el desarrollo y la remodelación tisular, al modular la adhesión celular y las propiedades de señalización de células neurales y no neurales (Jones y Jones, 2000). Algunos receptores de superficie celular de la familia de las integrinas, CAMs y receptores inusuales de condroitín sulfato-proteoglicanos, son capaces de reconocer a las tenascinas (Jones y Jones, 2000). Claramente una proteína de la MEC no es esperable que pueda ser reconocida directamente por MARCKS, la cual carece de dominios extracelulares. En cambio, MARCKS podría llegar a formar parte de complejos proteicos de membrana o pertenecer a microdominios de membrana que contengan receptores de superficie, muy posiblemente de la familia de las integrinas (Joester y Faissner, 2001), de manera que mediante una inmunoprecipitación se detecta interacción entre MARCKS y la tenascina, probablemente mediada por otros interactores.

Los resultados de estas inmunoprecipitaciones y MALDI-TOF claramente deben ser validados por diferentes métodos como por ejemplo Western-blot, inmunodetección o ensayos de interacción con las proteínas

purificadas o recombinantes, fijadas a sustrato. Una vez confirmada la interacción, se podría analizar la relevancia de esta interacción mediante por ejemplo ensayos de inhibición de su interacción con anticuerpos bloqueantes.

Las evidencias expuestas en este capítulo nos permiten concluir que las cascadas de señalización activadas como consecuencia de la interacción con laminina presentada como sustrato a los neuroblastos retinianos o la exposición de las células a IGF-1, determinan una activación de la fosforilación de la S25 de MARCKS. Además encontramos que esta variante fosforilada es capaz de interactuar con calmodulina, actina, drebrina y tenascina. Nuevos experimentos son necesarios para confirmar esta interacción y determinar su posible relevancia fisiológica.

CAPITULO III

Relación entre las fosforilaciones clásicas de MARCKS en el ED y la fosforilación en la S25

Como se menciona en la Introducción, MARCKS es fosforilable en varios residuos de serina o treonina (entre 5 y 8), localizados fuera del ED en diferentes regiones de la proteína. Al considerar no solamente estas variables fosforiladas por separado, sino también sus posibles combinaciones, resulta evidente que MARCKS puede ser sujeto de diferentes formas de regulación funcional, solamente considerando los efectos de las fosforilaciones sobre esta proteína y no otras modificaciones postraduccionales que también pueden producirse como por ejemplo su miristilación. Esto nos condujo a analizar las posibles interacciones entre las fosforilaciones clásicas en el ED, producidas por PKC, y la fosforilación no clásica de MARCKS en la S25. Para ello analizamos primero los niveles de fosforilación en el ED en condiciones fisiológicas, y luego estimularla en distintas condiciones experimentales, analizando en cada caso la localización y nivel de fosforilación en la serina 25.

RESULTADOS

3.1) Presencia y localización de MARCKS fosforilada en el ED durante el desarrollo del sistema nervioso.

Determinamos en primer lugar la cantidad y localización de MARCKS fosforilada en el ED en el sistema nervioso de embriones de pollo de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días de desarrollo y lo comparamos con S25p-MARCKS. En criosecciones de retinas y de embriones enteros, inmunodetectamos con anticuerpos específicos, las fosforilaciones en el ED así como la fosforilación en la serina 25. Las IFI mostraron que la cantidad de MARCKS fosforilada en el ED (pED-MARCKS) fue sumamente baja en prácticamente todos los estadios analizados (figuras 32 a 35). Es interesante destacar que en el tubo neural y la copa óptica de embriones de 2 y 4 días de desarrollo, solo encontramos células mitóticas con señal para pED-MARCKS (borde apical de ambas estructuras). Aquí también encontramos señal positiva para el Acm 3C3, ya que como fuera descrito previamente (Zolessi y Arruti, 2001b), el anticuerpo presenta reacción cruzada con un antígeno todavía no identificado, que está enriquecido en las células en mitosis. Dado que en los embriones de E2 y E4 una gran parte de la población celular neuroepitelial se encuentra en proliferación activa, esta señal mitótica del Acm 3C3 fue alta. No obstante, en los embriones de

Figura 32: Localización de S25p-MARCKS y pED-MARCKS en las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso. **(A-F)** Copa óptica de embriones de pollo de E2. El recuadro en A indica la región observada a mayor aumento en D-F. **(G-L)** Secciones transversales del tubo neural de embriones de pollo de E2. El recuadro en G muestra la región observada a mayor aumento en J-L. Todas las imágenes son secciones confocales únicas. Barras 10 μm .

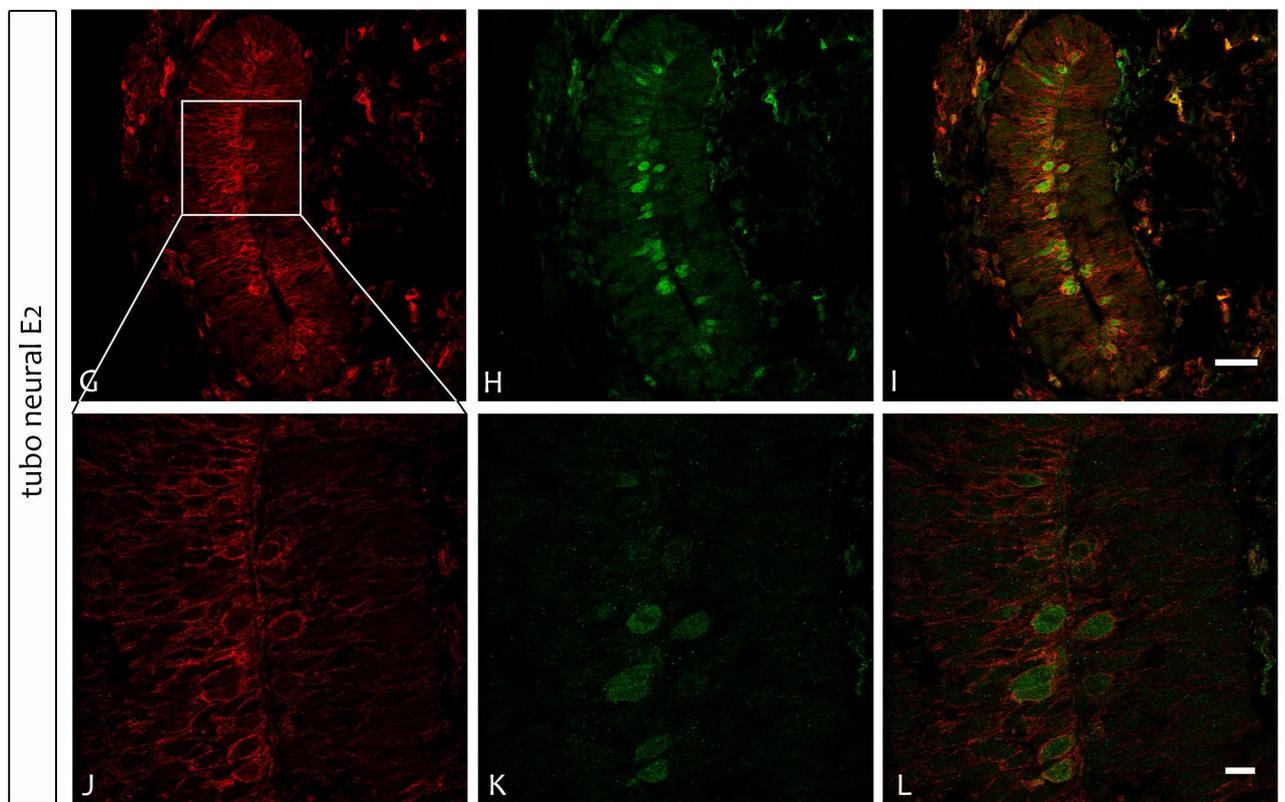
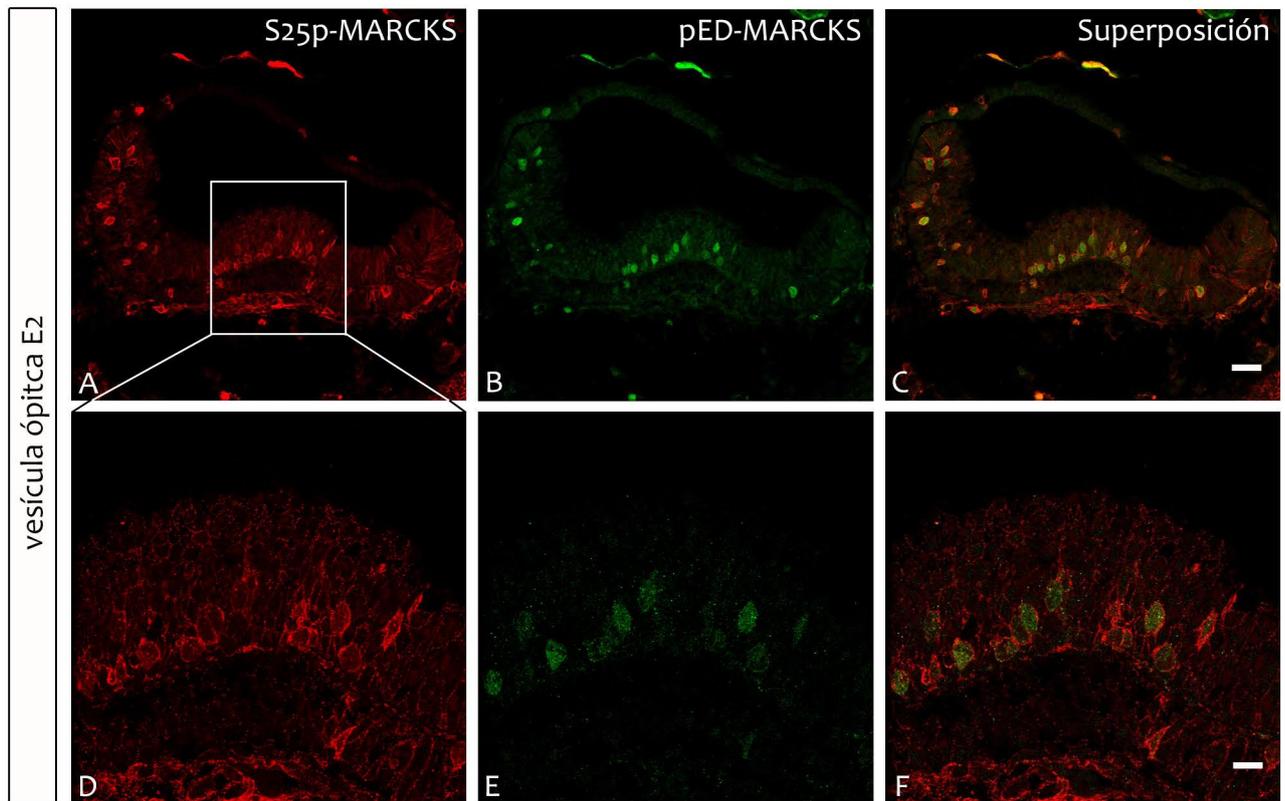


Figura 33: Localización de MARCKS y S25p-MARCKS en las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso. (A-F) Copa óptica de embriones de pollo de E2. El recuadro en A indica la región observada a mayor aumento en D-F. (G-L) Secciones transversales del tubo neural de embriones de pollo de E2. El recuadro en G muestra la región observada a mayor aumento en J-L. Todas las imágenes son secciones confocales únicas. Barras 10 μm .

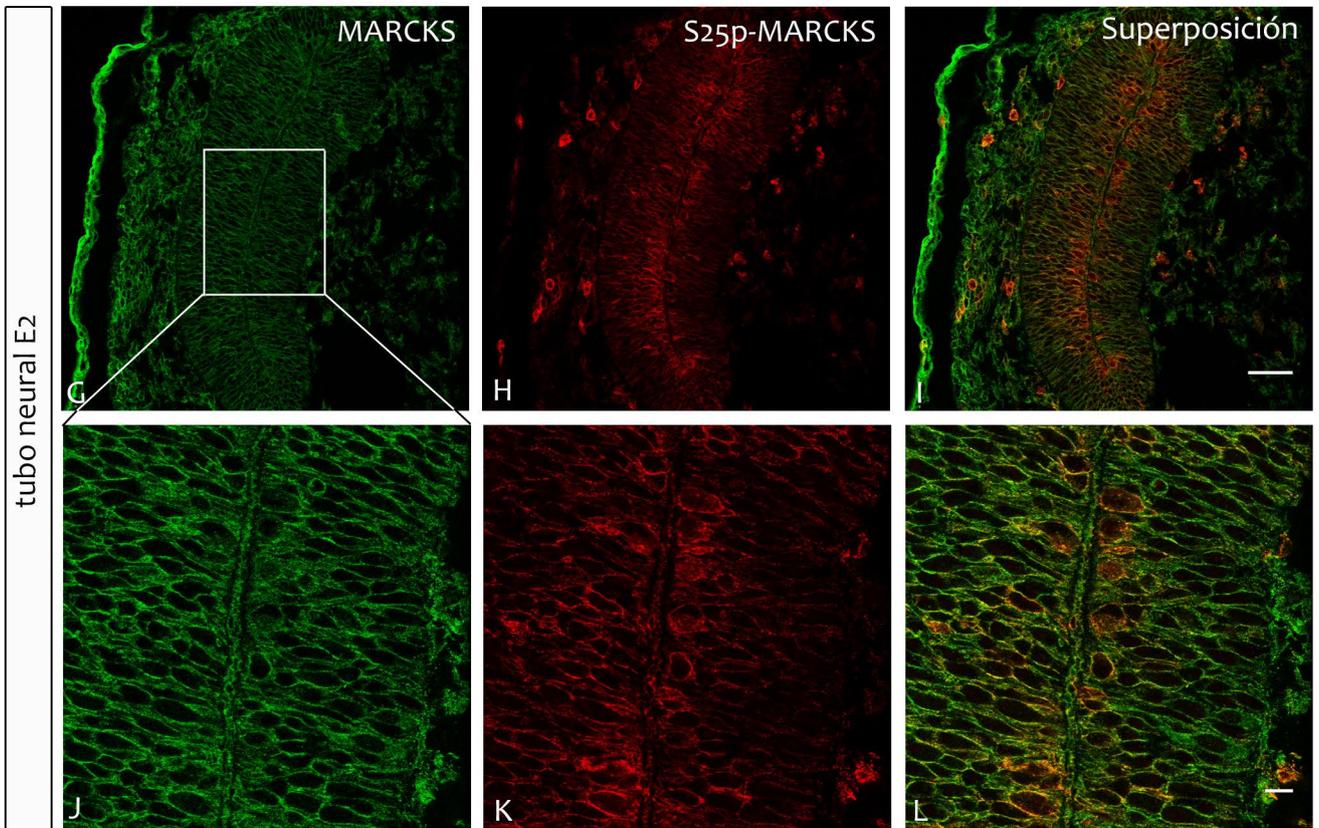
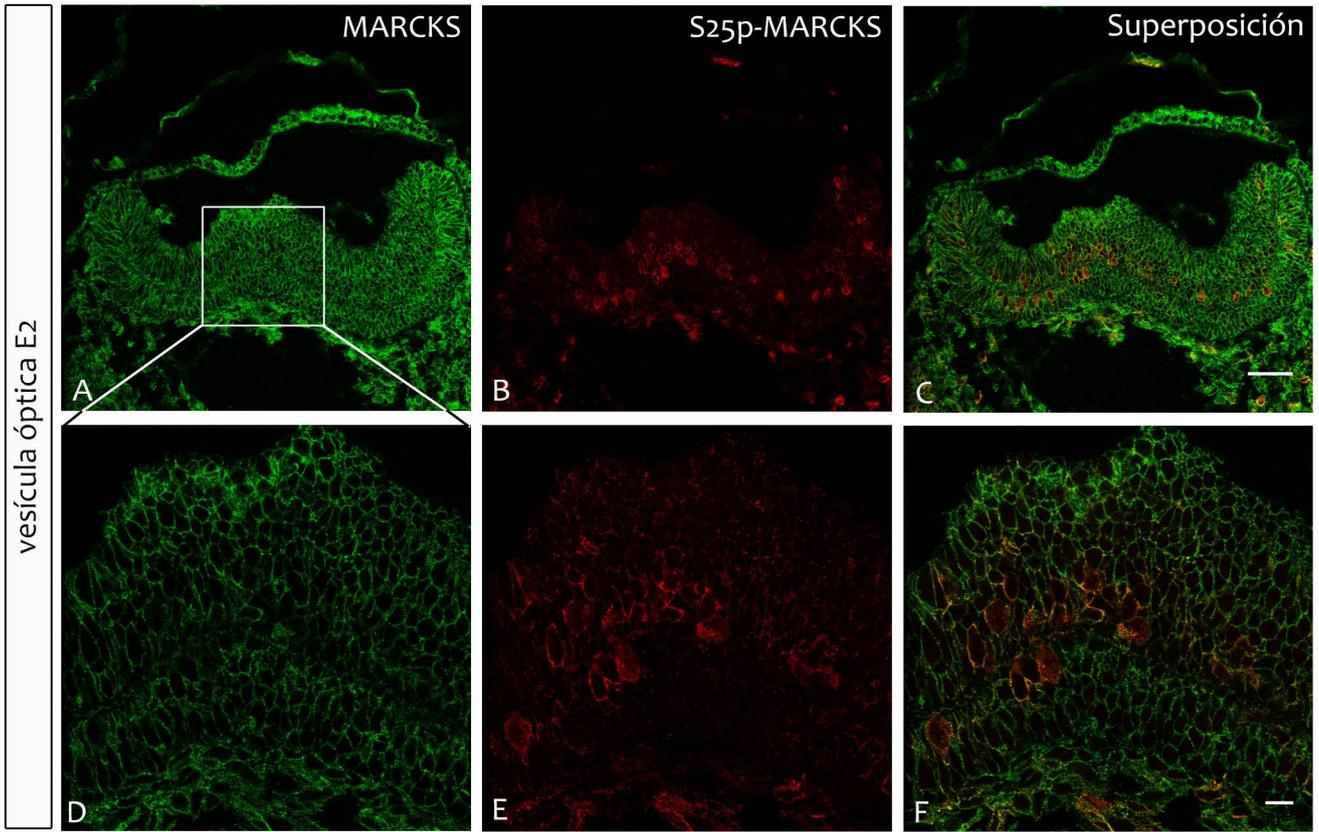
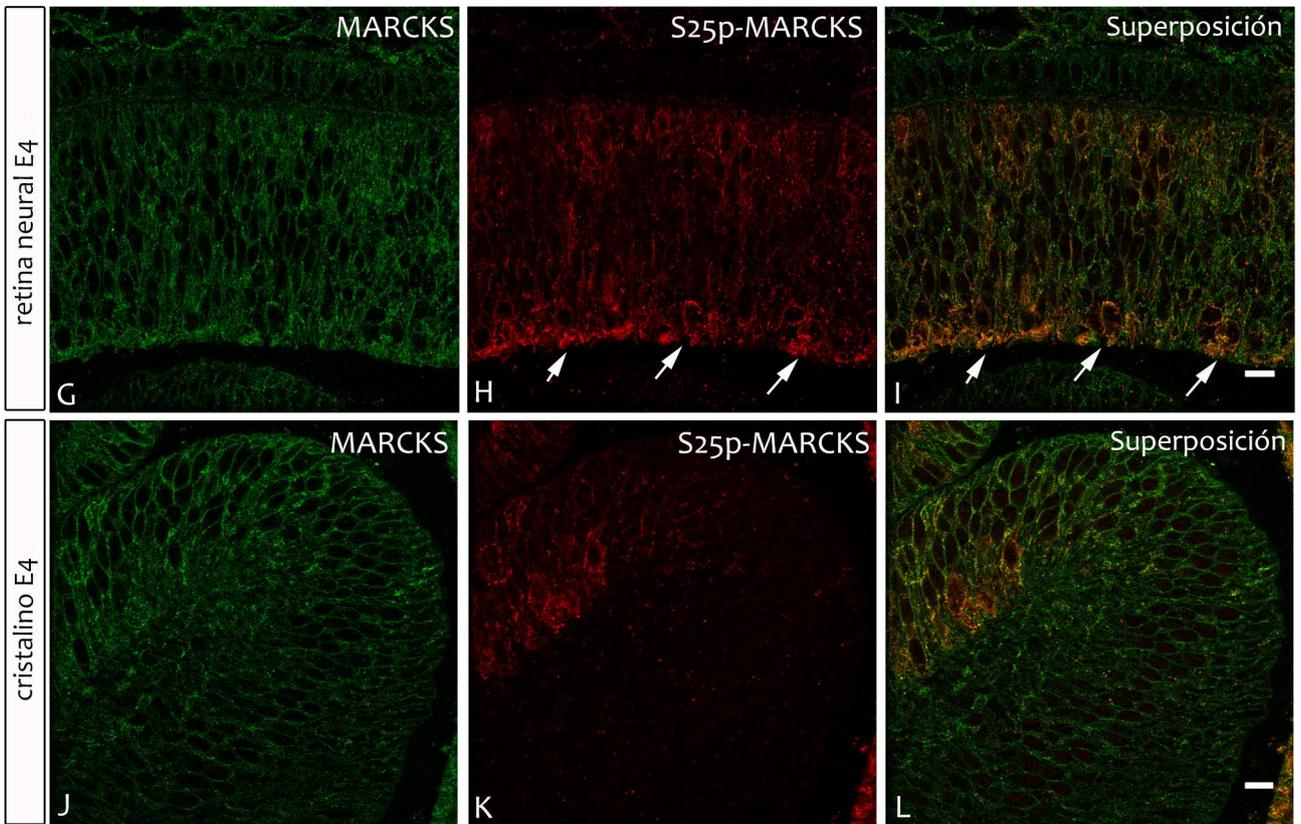
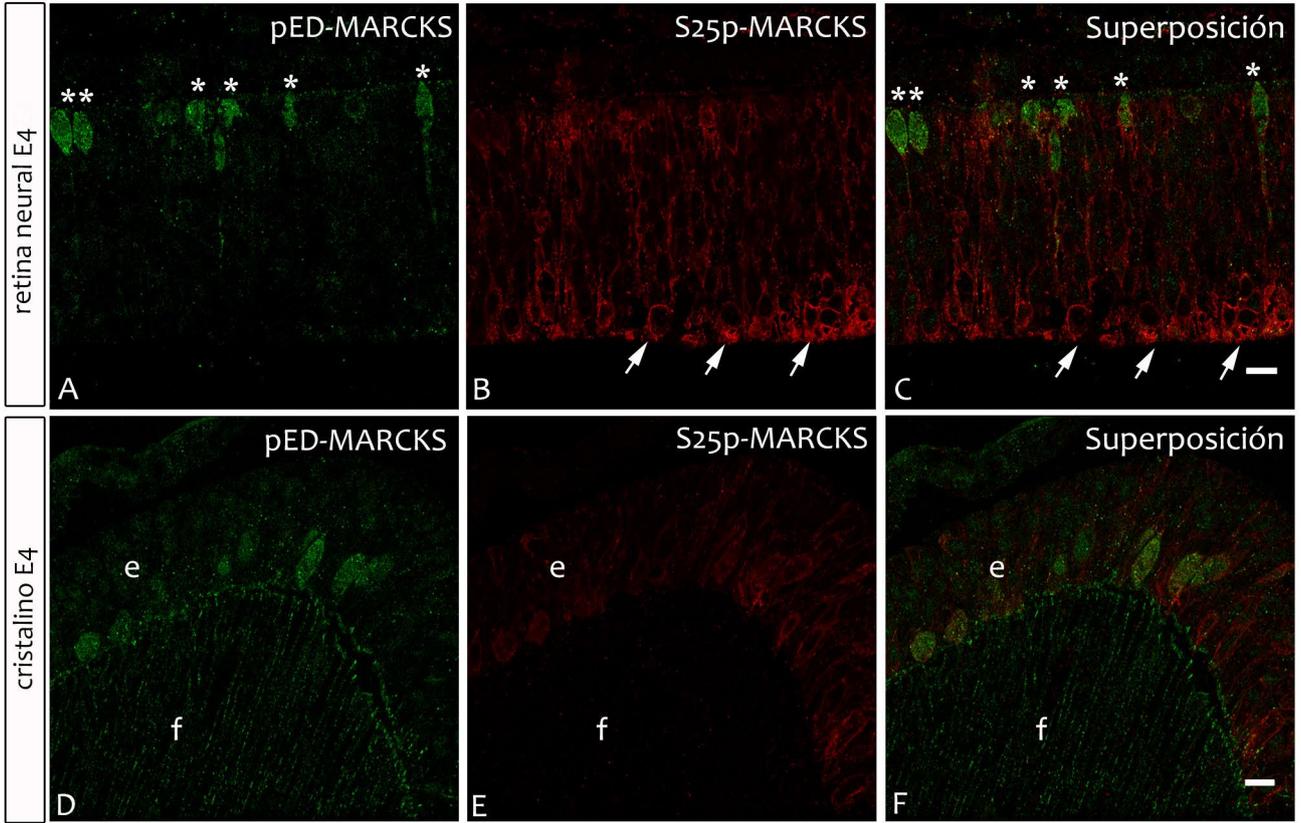


Figura 34: Localización de MARCKS, S25p-MARCKS y pED-MARCKS en las primeras etapas del desarrollo. **(A-C)** pED-MARCKS y S25p-MARCKS en la retina neural de embriones de pollo de E4. Los asteriscos marcan las células mitóticas del borde apical de la retina y las flechas las neuronas jóvenes en diferenciación en el borde vítreo. **(D-F)** pED-MARCKS y S25p-MARCKS en el cristalino de embriones de pollo de E4 (corte transversal abarcando epitelio y fibras del cristalino en sentido longitudinal). **(G-I)** MARCKS y S25p-MARCKS en la retina de E4. Las flechas señalan las neuronas jóvenes en diferenciación localizadas en el borde vítreo. **(J-L)** MARCKS y S25p-MARCKS en el cristalino de E4 (corte oblicuo abarcando epitelio y fibras en sentido transversal). Todas las imágenes son secciones confocales únicas. Barras 10 μm .



E4, algunas células en el borde vítreo de la retina neural, han iniciado el proceso de diferenciación y presentan elevados niveles de fosforilación de la S25 en MARCKS (figura 34 flechas). Estas células en cambio, no mostraron niveles detectables de pED-MARCKS. Dicha variante fosforilada solo se encontró, en este estadio del desarrollo, en las células en mitosis del borde apical del neuroepitelio (figura 34 asteriscos). En el cristalino en desarrollo, nuevamente solo encontramos señal de Acm 3C3 en las células en división del epitelio (figura 34 E). pED-MARCKS apareció en las superficies laterales de las fibras del cristalino (figura 34 D), fenómeno interesante que – hasta lo que sabemos – no había sido descrito hasta el presente. Como ha sido identificado en trabajos previos, en todas estas estructuras, la cantidad de MARCKS total es abundante, tanto en el tejido neural como en tejidos no neurales (figura 33) (Zolessi y Arruti 2001b).

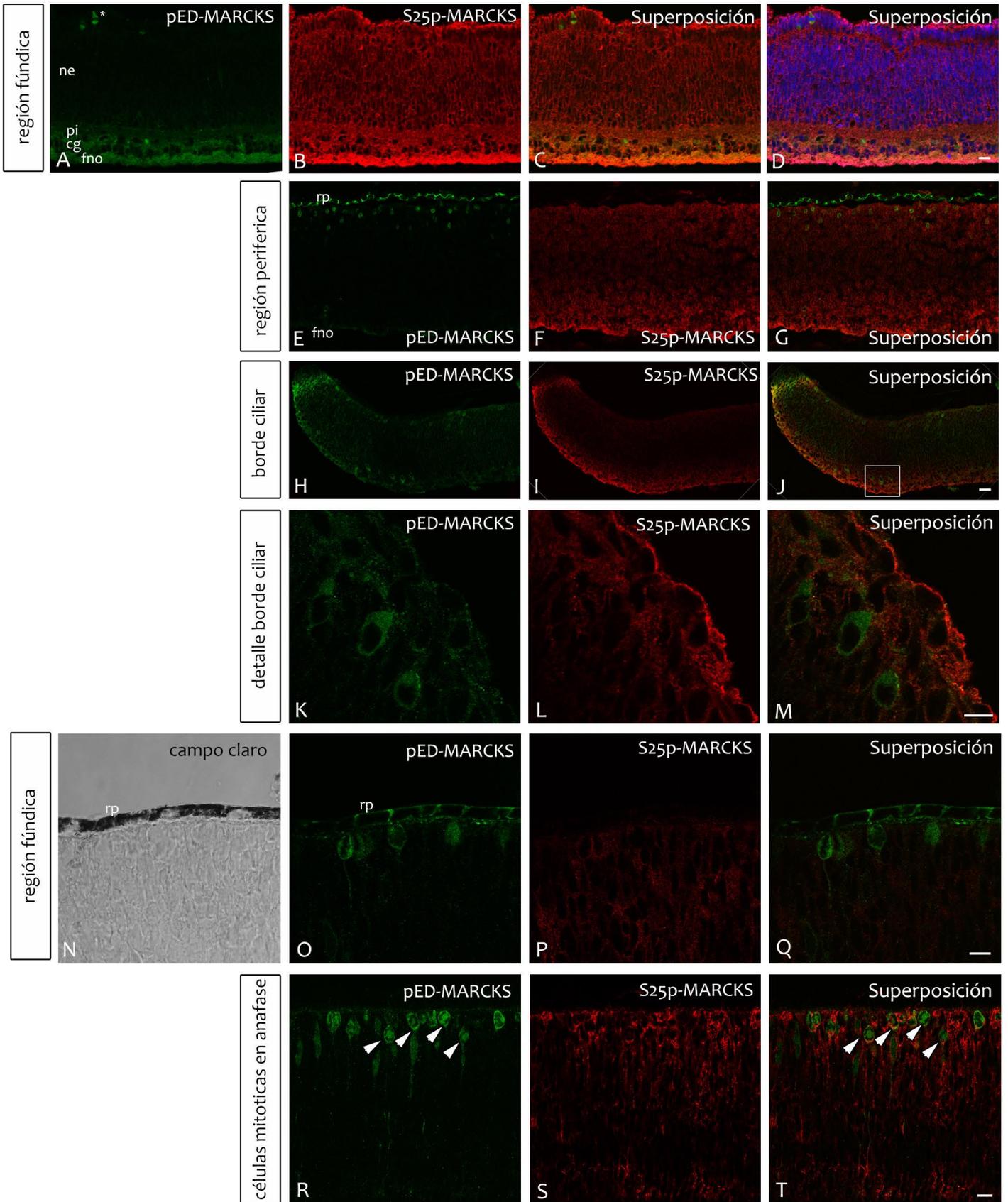
Al analizar regionalmente la presencia de ambas fosforilaciones en la retina de embriones de 8 días de desarrollo (E8), encontramos que existe un incremento de la señal de pED-MARCKS en los somas de las células ganglionares, y en la capa de fibras del nervio óptico (además de su permanencia en las células mitóticas del borde apical de la retina) (figura 35 A-D). En este estadio la diferenciación neuronal está avanzada en la región fúndica de la retina, pero dado el gradiente centro-periferia de la histogénesis retiniana, la diferenciación neuronal está más retrasada en la retina periférica, lugar en donde encontramos poco pED-MARCKS (figura 35 E-G). En esta zona, cercana al borde ciliar, la señal de pED-MARCKS fue intensa en las células ganglionares en diferenciación que se encuentran migrando hacia el borde vítreo. En dichas células pudimos evidenciar claramente que pED-MARCKS se localiza en pequeños parches de tamaños homogéneos, tanto citosólicos como periféricos. Por otro lado, las células mitóticas localizadas en la región ventricular de la retina, presentaron una señal sumamente intensa que ocupaba toda la célula, desde etapas iniciales de la mitosis hasta anafase tardía. En dichas células pED-MARCKS se localiza entre los territorios cromosómicos de las futuras células hijas y se extiende incluso hacia las proyecciones apical y basal de las células neuroepiteliales, las cuales son sumamente delgadas (figura 35 N-T). En la imagen se aprecia claramente que la señal en estas células es principalmente citosólica, con regiones de mayor concentración como pequeños acúmulos (figura 35 K-M).

Más adelante en el desarrollo de la retina neural, en particular E10 y E12, notamos un incremento en la cantidad de pED-MARCKS localizada en las capas más internas de la retina en diferenciación: capa de fibras del nervio óptico, células ganglionares y capa plexiforme interna, principalmente (figura 36 A-I).

Por su parte, la variante fosforilada en la S25 es abundante en neuronas en diferenciación de la retina a partir de E8, siendo particularmente abundante en la plexiforme interna, células ganglionares y en la capa de fibras del nervio óptico. En estadios más avanzados como E10 y E12, S25p-MARCKS se extiende a todas las capas en diferenciación de la retina, experimentando un incremento sostenido desde el inicio de la diferenciación en la

Figura 35: Localización de pED-MARCKS y S25p-MARCKS en diferentes regiones de la retina neural de embriones de E8. **(A-D)** Localización de pED-MARCKS y S25p-MARCKS en la región fúndica de la retina. Cg: células ganglionares, fno: fibras del nervio óptico, ne: neuroepitelio, pi: plexiforme interna. Con asterisco se señalan las células mitóticas. **(E-G)** Región periférica de la retina neural en donde se aprecia un grado de desarrollo menor de la retina al de la región fúndica del mismo estadio. Rp: retina pigmentaria. **(H-J)** Borde ciliar de la retina neural. Con el recuadro blanco se señalan células ganglionares jóvenes en el borde vítreo de la retina. Esta misma región se ve a mayor aumento en (K-M). **(N-Q)** Región fúndica de la retina observada a gran aumento, en donde se destaca la señal positiva del anticuerpo anti pED-MARCKS en la región lateral de las células epiteliales de la retina pigmentaria y también en las células neuroepiteliales en mitosis. **(R-T)** Corte a nivel de la región fúndica de la retina, en donde se aprecia una importante población de células en anafase mitótica. Se aprecia la exclusión de pED-MARCKS de los territorios cromosómicos (cabezas de flecha). Todas las imágenes son secciones confocales únicas. Barras: 10 μm .

Retina neural de embriones de E8



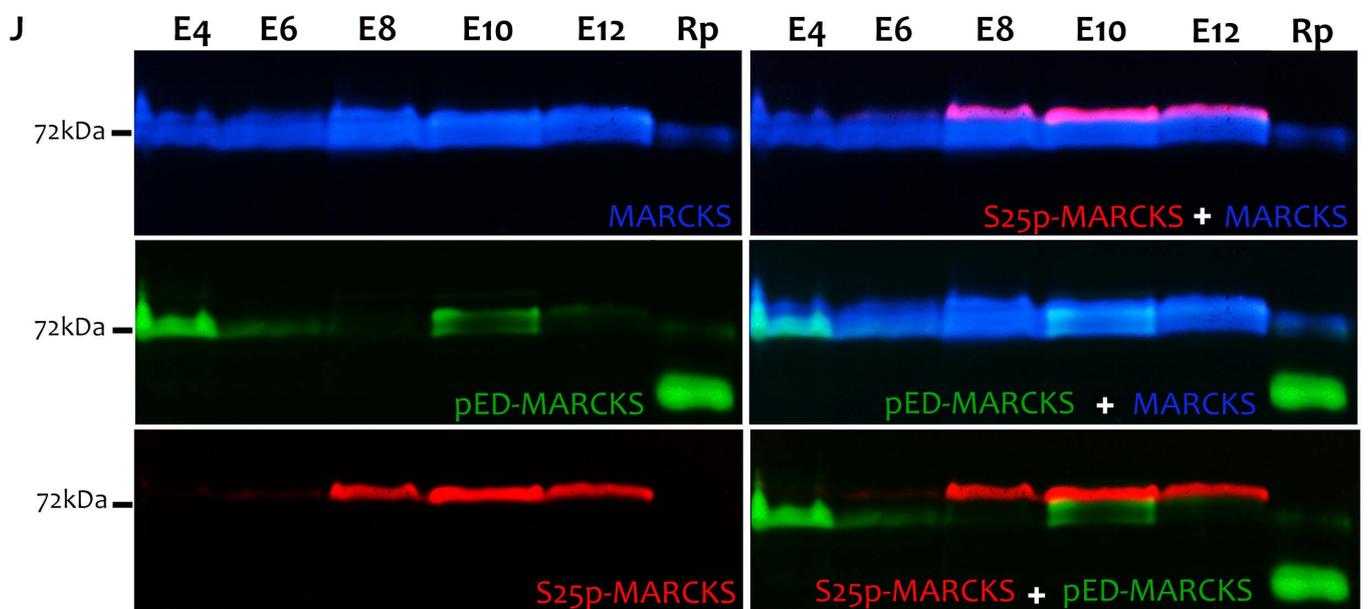
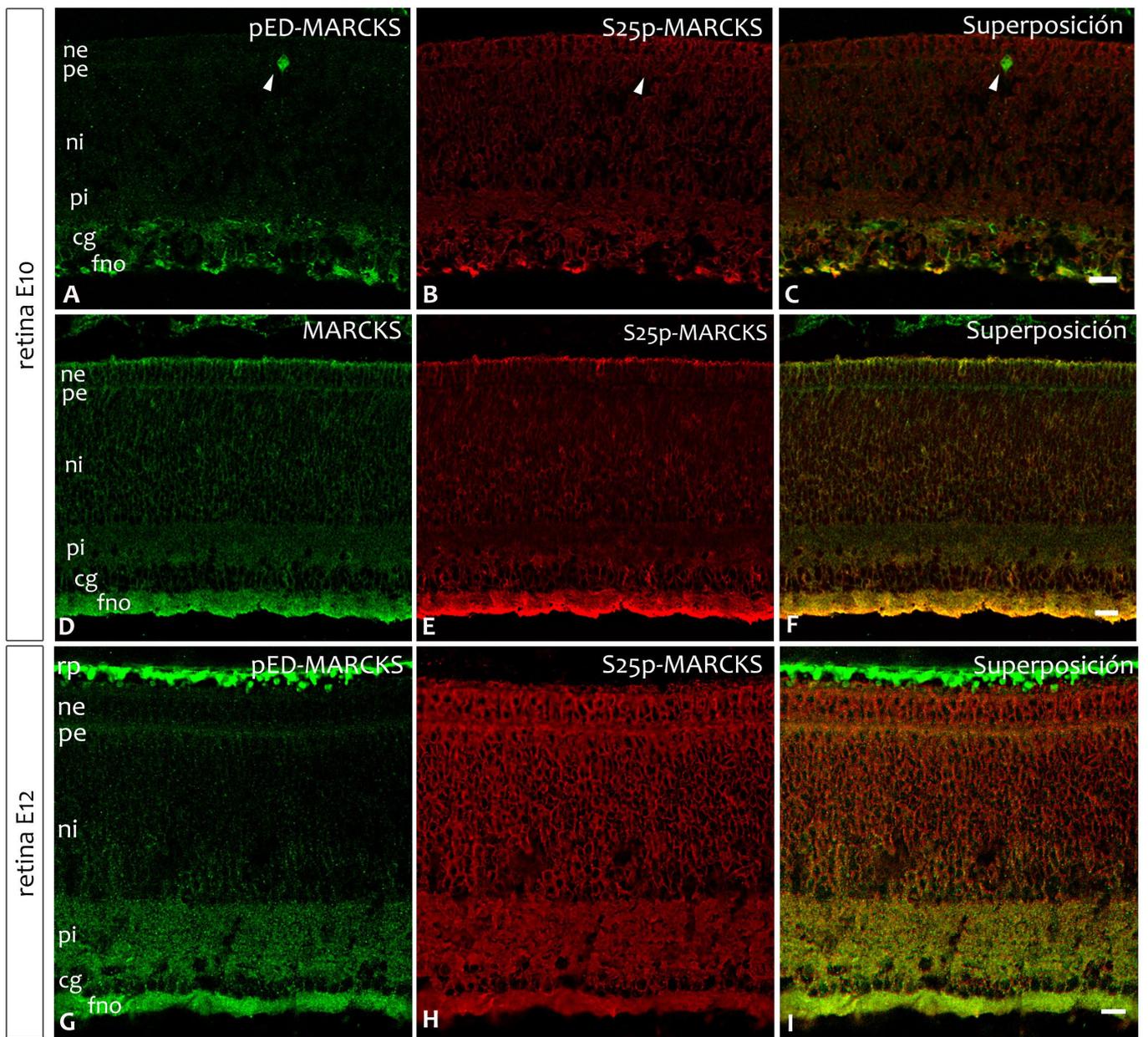
retina hasta etapas avanzadas de la misma (figura 36 B y H). En todos estos estadios la señal se organizó en acúmulos principalmente periféricos o subplasmalémicos, como mencionáramos en los capítulos previos de esta tesis (figuras 35 y 36). Nos resultó muy llamativo en estos experimentos, que si bien tanto pED-MARCKS como S25p-MARCKS se distribuyen en forma de acúmulos, tienen poca o nula colocalización, aunque se encuentran presentes en los mismos tipos celulares. Los parches de pED-MARCKS estaban distribuidos principalmente en el citoplasma celular y poco en la periferia, mientras que los de S25p-MARCKS eran principalmente periféricos (figura 35 K-M).

Los resultados obtenidos mediante IFI en distintos estadios del desarrollo mostraron claramente que la variante fosforilada en la S25 es mucho más abundante que la fosforilada en el ED, especialmente en los primeros estadios del desarrollo (E4-E12). Además, lo que nos resultó sumamente interesante y exploraremos en más detalle en las siguientes secciones, es el hecho de que estas variantes fosforiladas de la misma proteína muestran exclusión de emplazamiento a nivel subcelular, lo cual constituye la primera evidencia al respecto para esta proteína.

3.2) Evaluación de los niveles de fosforilación de MARCKS en el ED durante el desarrollo del sistema nervioso mediante SDS-PAGE.

Para comparar los niveles de fosforilación de MARCKS en la S25 y en el ED analizamos tanto muestras de ojos como de retina neural de embriones de pollo de 4, 6, 8, 10 y 12 días de desarrollo, mediante Western-blots. Como mencionáramos en la Introducción, MARCKS presenta una movilidad electroforética anómala debido a la interacción ineficiente con el SDS que tienen las proteínas con alto contenido en aminoácidos con carga negativa, (Uversky y Dunker, 2012). MARCKS tiene una movilidad electroforética relativa de 70kDa en geles de acrilamida al 10%. La banda electroforética es ancha y heterogénea, sobre todo visibles en condiciones de carga elevada de proteínas en el carril, pudiéndose distinguir al menos 4 sub-bandas. En estas separaciones electroforéticas pudimos constatar que la fracción de proteína fosforilada en el ED fue baja en E6, E8 y E12, mientras que en E4 y E10 la fracción es mayor (Figura 36 J). La aparición de una señal intensa en las muestras de retina de E4 está en concordancia con el elevado número de células en mitosis positivas para pED-MARCKS que describimos en la sección anterior. En esa sección describimos además una intensa señal del anticuerpo anti-pED-MARCKS en los bordes laterales de la retina pigmentaria. Los Western-blots para muestras de retina pigmentaria aislada, mostraron claramente que la señal no corresponde a MARCKS ya que su peso molecular es de aproximadamente 45kDa, banda que no se encontró en ninguna otra de las muestras de retina neural analizada (figura 36 J).

Figura 36: MARCKS fosforilada en el ED y en la S25 durante el desarrollo de la retina neural. **(A-F)** Secciones confocales únicas de inmunodetecciones de MARCKS, pED-MARCKS y S25p-MARCKS en cortes transversales de retina neural de embrión de E10. Las cabezas de flecha indican células mitóticas en el borde apical del neuroepitelio. **(G-I)** Imágenes de epifluorescencia de inmunodetecciones de S25p-MARCKS y pED-MARCKS en retinas de embriones de E12. Ne: nuclear externa, pe: plexiforme externa, ni: nuclear interna, pi: plexiforme interna, cg: células ganglionares, fno: fibras del nervio óptico. Barras: 20 μm . **(J)** Western-blots secuenciales para MARCKS, pED-MARCKS y S25p-MARCKS de retinas neural de embriones de pollo de E4 a E12, y retina pigmentaria de E12, como se indica en la parte superior de la figura. La inmunodetección para cada proteína se coloreó digitalmente y se superpusieron en las imágenes de la derecha.



Al igual que la proteína total, la banda inmunoreactiva con anti pED-MARCKS fue ancha y con sub-bandas, poniendo en evidencia la existencia de distintas isoformas fosforiladas en el ED. Por su parte, S25p-MARCKS presentó un incremento sostenido desde E4 a 12. Esta fracción fosforilada no excede aproximadamente el 50% del total de MARCKS en la retina neural en los valores máximos detectados. De manera llamativa, a diferencia de lo observado para la proteína total y la variante fosforilada en el ED, S25p-MARCKS migra en forma de una banda más uniforme. Decidimos entonces comparar la migración relativa de ambas variantes fosforiladas, para lo cual dimos falso color a las placas radiográficas digitalizadas, con un programa de análisis de imágenes y las superpusimos, utilizando como referencia el borde superior de la placa radiográfica que corresponde al borde superior de la membrana de nitrocelulosa en todas las inmunodetecciones realizadas. En estas superposiciones encontramos que la banda de S25p-MARCKS es adyacente a la de pED-MARCKS y tiene una menor movilidad relativa. Ambas bandas no se solapan en ninguna región, sino que resultan perfectamente complementarias en sus límites. Al superponer ambas bandas a la banda de la proteína total, pusimos en evidencia que mientras que S25p-MARCKS corresponde al borde superior de la banda de MARCKS total, pED-MARCKS corresponde a las regiones intermedias y de menor peso molecular (borde inferior) de la proteína total, (figura 36 J). La suma de ambas variantes fosforiladas da como resultado la banda correspondiente a la proteína total, lo que sugiere que en estas condiciones experimentales no habría moléculas de MARCKS que no presenten una de estas dos fosforilaciones.

Estos resultados y los de la Sección 3.1 indican que las fosforilaciones en ambos dominios no solamente no tienen lugar en los mismos subdominios (agrupamientos) enriquecidos en MARCKS de la célula, como se mostró en las inmunodetecciones de cortes de retina, sino que además no tienen lugar en la misma molécula como lo indican los análisis por Western-blots, sugiriendo que además de exclusión espacial en la célula presentan exclusión molecular.

3.3) Localización de algunas variantes de PKC durante el desarrollo de la retina neural.

Como mencionamos en la Introducción, MARCKS fue caracterizada originalmente como el principal sustrato de PKC; al menos 3 de las 4 serinas de su ED son fosforiladas *in vivo* por PKCs convencionales (α , β , γ), noveles (δ , θ , ϵ y η) y atípicas (λ , y ζ) (Taniguchi et al., 1994; Herget et al., 1995; Uberall et al., 1997; Michaut et al., 2005). Nos preguntamos entonces si alguna de estas quinasas se localiza en la retina de pollo durante su histogénesis y si de alguna manera, una o varias de estas quinasas podrían explicar el patrón de distribución observado para pED-MARCKS descrito en la sección anterior. Para contestar esta pregunta realizamos nuevamente IFIs para detectar a PKC β y ζ en criosecciones de retinas de pollo en distintas etapas de desarrollo. Como se observa en las imágenes

de epifluorescencia de las figuras 37 y 38, ambas quinasas se encuentran en la retina neural y también en tejidos extraoculares, desde etapas tempranas del desarrollo (E4), hasta etapas avanzadas (E19, pre-eclosión). En E4, PKC β tiene un patrón de expresión extendido en el neuroepitelio, con una señal importante en el borde apical de la retina, en donde se encuentran las células mitóticas (figura 37 A-D). Recordemos que un patrón similar fue evidenciado para pED-MARCKS en la sección anterior. Luego en E8 y E12 la señal se concentra en el borde vítreo localizándose claramente en los cuerpos celulares de neuronas grandes que posiblemente se diferencien en células ganglionares y bipolares (figura 37 F, flechas). Nuevamente en este caso el patrón de localización es similar a lo presentado para pED-MARCKS ya que en E8 y E12 la señal se concentraba básicamente en la capa de fibras del nervio óptico, capa de células ganglionares y plexiforme interna (donde se localizan las prolongaciones -axones y dendritas- de las neuronas antes mencionadas). Posteriormente en E19, la señal de PKC β se concentra en la capa plexiforme interna, observándose algunas de las bandas sinápticas de Cajal (figura 37 N) y en los cuerpos celulares más internos de la capa nuclear interna. Solamente en E12 y E19 apreciamos niveles de colocalización importantes entre PKC β y S25p-MARCKS a nivel de las capas de fibras del nervio óptico y capa plexiforme interna, respectivamente (figura 37 I-P). Vale recordar en este punto que MARCKS total está presente en grandes cantidades durante la histogénesis de la retina, en todas las capas (Zolessi y Arruti, 2004).

PKC ζ por su parte, mostro un patrón bastante distinto a PKC β . Se trata de una PKC atípica y no clásica como en el caso anterior. En etapas iniciales, E4 y E8, cuando existe un gran número de progenitores neuronales en el neuroepitelio que aún se encuentran en activa mitosis, PKC ζ es abundante en el borde apical del epitelio, donde las proyecciones apicales de los progenitores hacen contacto con el epitelio pigmentario (figura 38 B y F). En esta región no existe una concentración ni de S25p-MARCKS (figura 38 A y E) ni, como fuera descrito, de MARCKS total (Zolessi y Arruti, 2004). Tampoco encontramos en esta región pED-MARCKS de manera particular, aunque sí encontramos en el borde apical señal en las células mitóticas. En estadios más avanzados, cuando ya no tienen lugar mitosis en el neuroepitelio, sino que la mayor parte de las neuronas ha sufrido su mitosis terminal, PKC ζ desaparece del bode apical de la retina y se distribuye en las capas internas. En particular en E19, parece concentrarse en células gliales de Müller ya que aparece señal en la membrana limitante externa, por encima de la capa nuclear externa, en la capa nuclear interna en donde se localizan los somas de las células de Müller y en la capa plexiforme interna (Figura 38 J y N, cabezas de flecha). El patrón de distribución de esta quinas atípica difiere claramente del que presentáramos para pED-MARCKS.

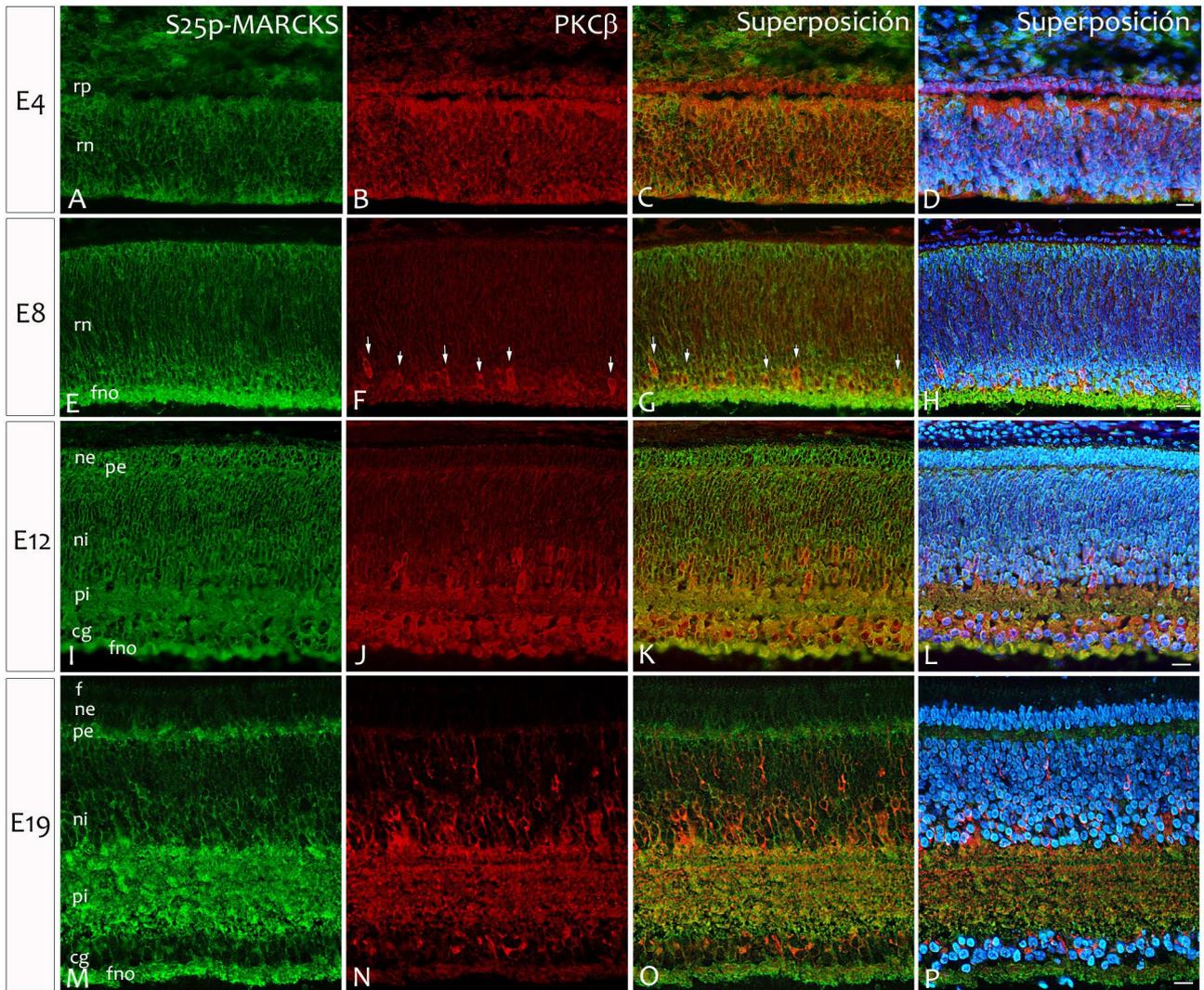


Figura 37: Distribución de S25p-MARCKS y PKC β durante el desarrollo de la retina neural. Imágenes de epifluorescencia de criosecciones transversales de ojos de embriones de pollo de 4 (A-D), 8 (E-H), 12 (I-L) y 19 (M-P) días de desarrollo, marcados con anticuerpos anti S25p-MARCKS (3C3), anti PKC β y marcado nuclear con Hoecst 33342. Se muestra la región fúndica de la retina neural. cg: capa de células ganglionares, fno: capa de fibras del nervio óptico, ne: capa nuclear externa, ni: capa nuclear interna, pe: capa plexiforme externa, pi: capa plexiforme interna, f: fotorreceptores, rn: retina neural, rp: retina pigmentaria. Las flechas indican neuronas en diferenciación positivas para PKC β , posiblemente células bipolares ganglionares. Barras: 20 μ m.

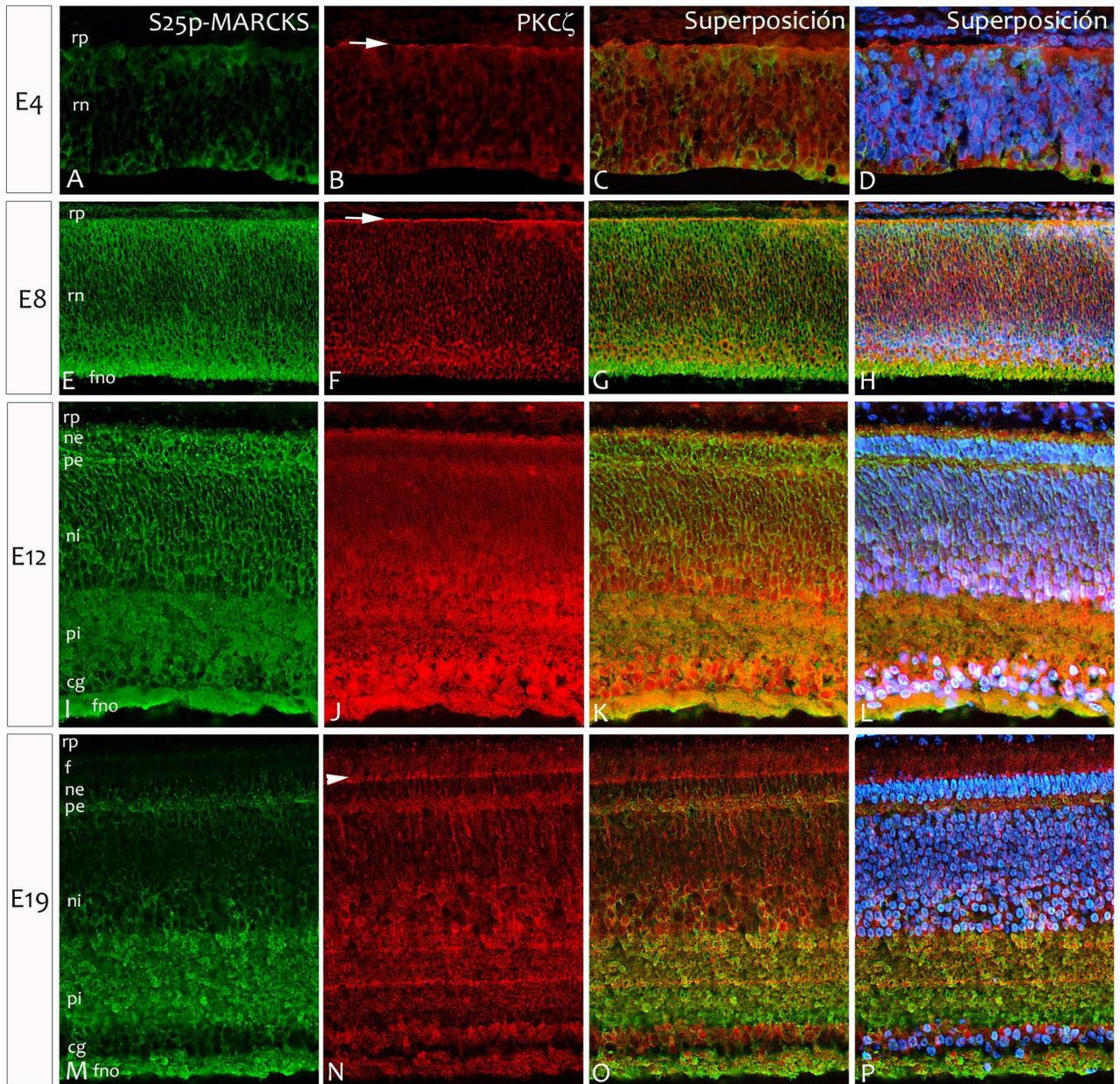


Figura 38: Distribución de S25p-MARCKS y PKC ζ durante el desarrollo de la retina neural. Imágenes de epifluorescencia de criosecciones transversales de ojos de embriones de pollo de 4 (A-D), 8 (E-H), 12 (I-L) y 19 (M-P) días de desarrollo, marcados con anticuerpos anti S25p-MARCKS (3C3) y anti PKC ζ y marcado nuclear con Hoechst 33342. Se muestra la región fúndica de la retina neural. cg: capa de células ganglionares, fno: capa de fibras del nervio óptico, ne: capa nuclear externa, ni: capa nuclear interna, pe: capa plexiforme externa, pi: capa plexiforme interna, f: fotorreceptores, rn: retina neural, rp: retina pigmentaria. Las flechas señalan el borde apical del neuroepitelio donde se concentra PKC ζ . Las cabezas de flecha señalan la membrana limitante externa. Barras: 20 μ m.

Estos resultados nos permiten concluir que durante la histogénesis de la retina existe al menos una PKC (PKC β) que presenta un patrón de localización similar al evidenciado para pED-MARCKS, lo cual sugiere que puede ser candidata para fosforilar a MARCKS en este tejido.

3.4) Estimulación de la fosforilación de MARCKS en el ED por PKC en retinas aisladas.

Con el fin de analizar en mayor detalle la interacción entre la fosforilación en la S25 de MARCKS y las fosforilaciones en el ED, decidimos estimular la fosforilación en el ED mediante tratamientos con el éster de forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA), conocido estimulador de PKC ya que emula la actividad del activador natural de las PKC clásicas u noveles, el diacilglicerol (DAG). Habiendo encontrado bajas cantidades de fosforilación en el ED durante la histogénesis de la retina y una llamativa exclusión espacial entre las fosforilaciones, nos preguntamos qué ocurre cuando se estimula una de estas fosforilaciones, en este caso la provocada por PKC.

Realizamos entonces tratamientos con PMA 30 nM, 300 nM y 3 μ M durante 15 y 30 minutos en retinas aisladas. Para ello, aislamos retinas neurales de embriones de pollo de 8 días del desarrollo, momento en el que la fosforilación en la S25 es alta mientras que la fosforilación en el ED es muy baja, y las incubamos a 37°C en DMEM en ausencia de suero fetal bovino y en presencia de PMA, o DMSO como control. Posteriormente fijamos las retinas, las crioprotegimos y procesamos para criomicrotomía. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de las IFI mostraron que la remoción de la retina y el cultivo organotípico durante 30 minutos no altera la organización de la retina ni los niveles de expresión o distribución de MARCKS, S25p-MARCKS o pED-MARCKS (comparar figuras 36-ojos enteros y 39-retinas aisladas). Una vez que determinamos la idoneidad del sistema, incubamos a las retinas en cultivo con dosis crecientes de PMA. Comenzando con dosis bajas de PMA (30 nM), ya constatamos un incremento de la fosforilación en pED-MARCKS, aunque bajo (figura 40 A-C). El incremento de la señal de pED-MARCKS tuvo lugar particularmente en las capas más internas: capa de fibras del nervio óptico, células ganglionares y mitad interna de la capa plexiforme interna. La distribución de S25p-MARCKS no parece variar con ninguno de los tratamientos.

Al igual que en las situaciones control, descritas en la sección 3.1, constatamos que a nivel subcelular los acúmulos de S25p-MARCKS no colocalizan con los parches de pED-MARCKS, localizándose este último principalmente a nivel citosólico, mientras que S25p-MARCKS presenta una localización más periférica. En las fibras del nervio óptico considerando el grado de empaquetamiento de los axones es muy difícil resolver las señales, que aparecen solapadas y, aparentemente, codistribuyendo.

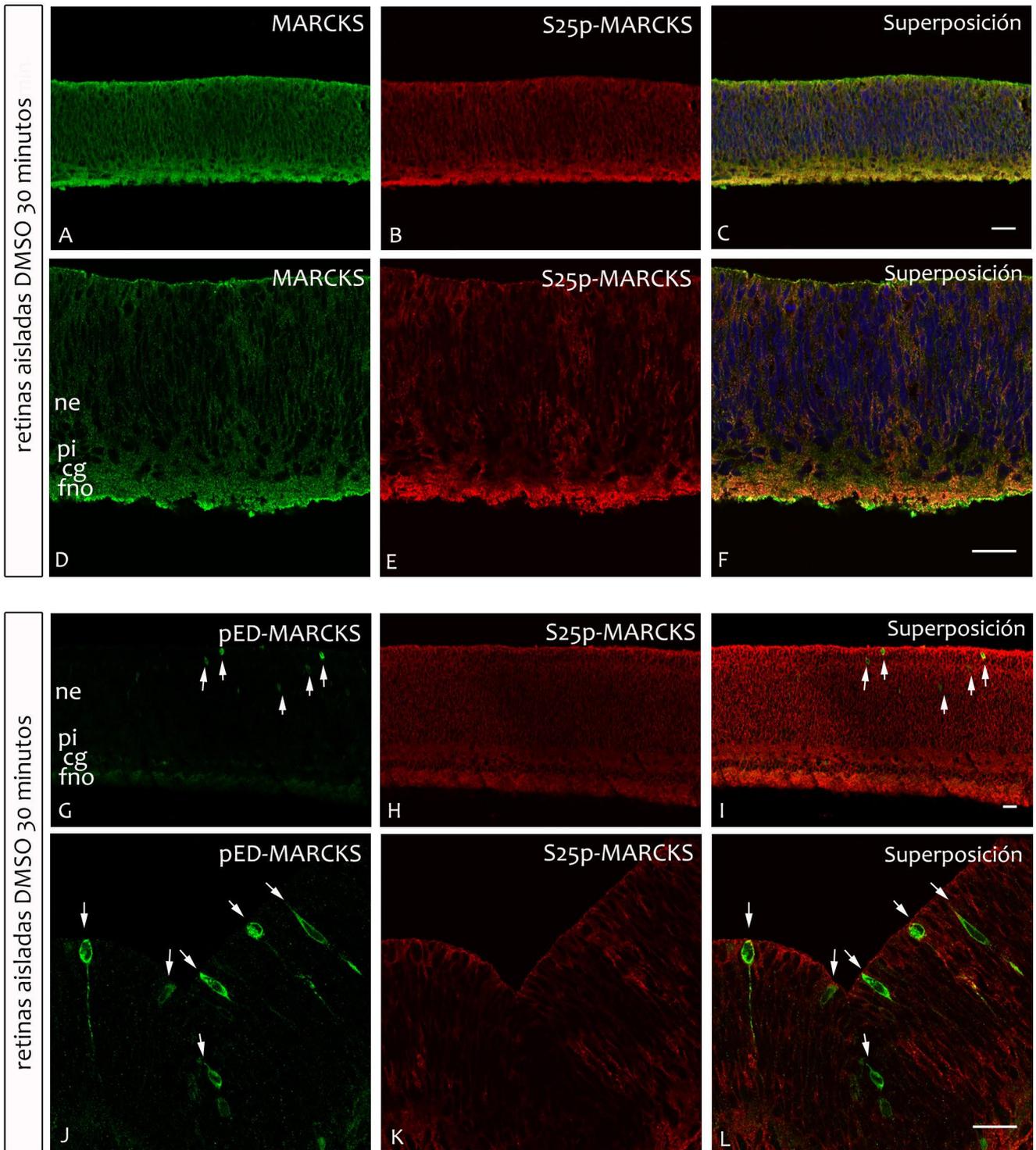
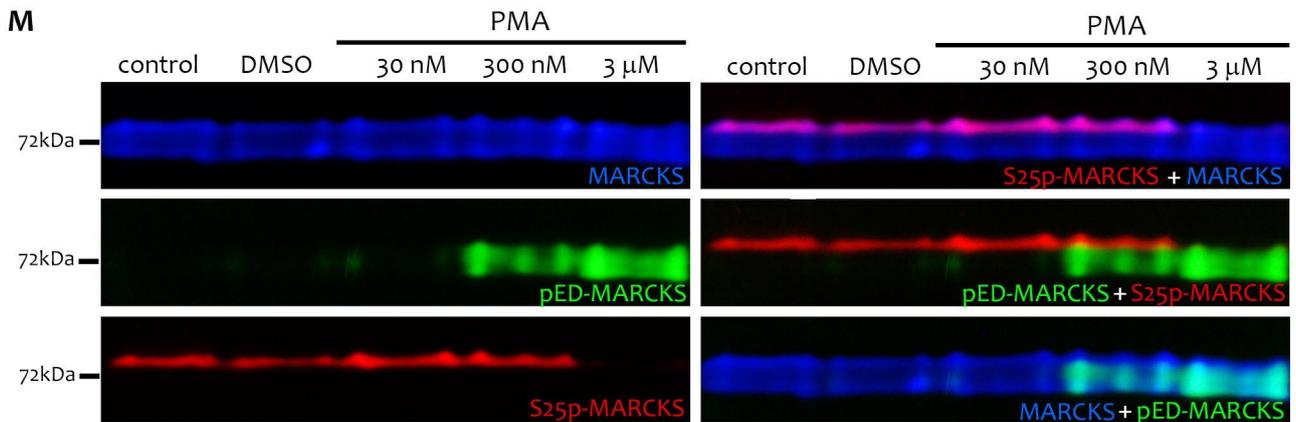
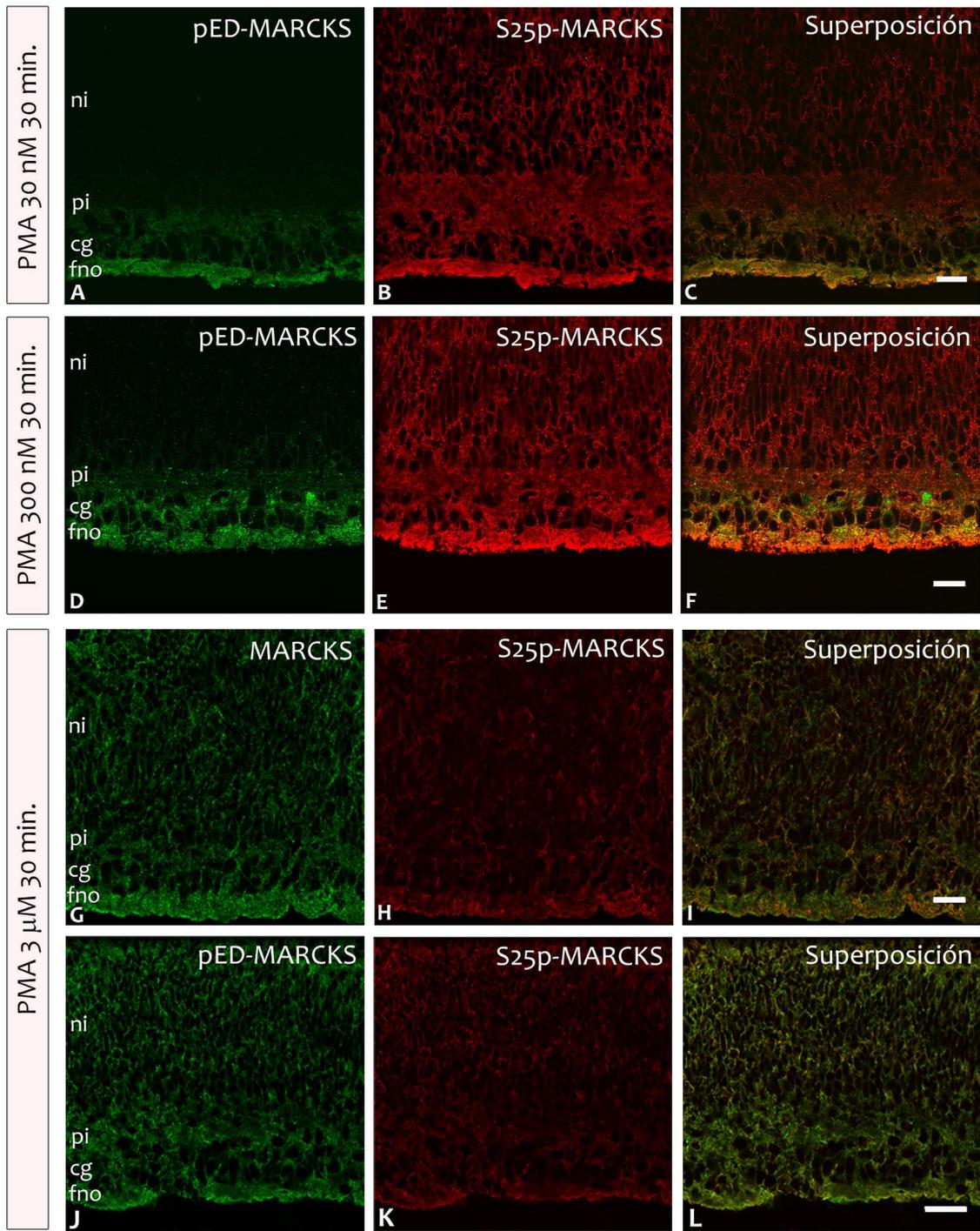


Figura 39: MARCKS fosforilado en el ED y en la S25 en retinas de embriones de E8 aisladas e incubadas con DMSO al 0.1% durante 30 minutos. **(A-F)** Secciones confocales únicas de inmunodetecciones de MARCKS y S25p-MARCKS en cortes transversales de retinas neurales de E8. **(G-L)** Secciones confocales únicas de inmunodetecciones de pED-MARCKS y S25p-MARCKS en cortes transversales de retinas neurales de E8. ne: neuroepitelio, pi: plexiforme interna, cg: células ganglionares, fno: fibras del nervio óptico. Con las flechas se señalan células mitóticas en el borde apical. Barras: 20 μ m.

Figura 40: MARCKS fosforilada en el ED y en la S25 en retinas estimuladas con PMA. **(A-L)** Secciones confocales únicas de inmunodetecciones de MARCKS, pED-MARCKS y S25p-MARCKS en cortes transversales de retinas neurales de E8 a nivel del borde vítreo, aisladas y tratadas con PMA 30 nM, 300 nM y 3 μ M durante 30 minutos. pe: plexiforme externa, ne: nuclear externa, ni: nuclear interna, pi: plexiforme interna, cg: células ganglionares, fno: fibras del nervio óptico. Barras: 20 μ m. **(M)** Western-blots secuenciales para MARCKS, pED-MARCKS y S25p-MARCKS de retinas de embriones de pollo de E8 aisladas y estimuladas con PMA 30 nM, 300 nM y 3 μ M durante 30 minutos. Se muestran dos controles: no tratado y tratado con DMSO al 0.1%. La inmunodetección para cada proteína se coloreó digitalmente y se superpusieron en las imágenes en el panel de la derecha.



A dosis más altas, 300 nM y 3 μ M el incremento de la señal de pED-MARCKS fue mucho mayor extendiéndose ahora a capas más externas de la retina. De todas formas la señal más intensa siempre fue observada en el borde vítreo (figura 40 D-L). En el tratamiento utilizando mayor concentración de PMA encontramos un fenómeno interesante, un aparente descenso en la intensidad de la señal de S25p-MARCKS (figura 40 H).

También estudiamos los efectos de estos tratamientos sobre la proteína, mediante Western-blot. Para el análisis de las imágenes de Western-blot utilizamos el mismo procedimiento que describimos en la primera sección de este capítulo: dimos color falso a cada inmunodetección para así facilitar el análisis del solapamiento de las inmunodetecciones. Aquí pudimos determinar que, en efecto, la estimulación de PKC con PMA, especialmente en las dosis de 300 nM y 3 μ M, además de promover un aumento ostensible en la cantidad de pED-MARCKS, produjo una reducción concomitante de la cantidad de S25p-MARCKS (figura 40 M). Otra observación a señalar es que la región de la banda de la proteína total que se solaparía con la banda de S25p-MARCKS permanece también en los tratados, es decir que la banda de pED-MARCKS no se extiende hacia regiones de mayor peso molecular, lo que sugiere que en esa posición se encuentran otras variantes fosforiladas de MARCKS además de S25p-MARCKS, no fosforiladas por PKC.

3.5) Distribución de MARCKS y sus variantes fosforiladas en neuroblastos aislados, tratados con PMA.

Para analizar en mayor profundidad los eventos que tienen lugar a nivel subcelular, cuando se estimula la actividad de PKC en neuroblastos de la retina, realizamos cultivos de células aisladas de la retina neural de embriones de 8 días de desarrollo. Las células fueron mantenidas durante 3 días *in vitro*, y tratadas con PMA 300 nM y 3 μ M durante intervalos comprendidos entre 10 y 30 minutos, o DMSO al 0.1% como control de vehículo. En ausencia de PMA, de manera similar a lo observado en los cortes a congelación, confirmamos que la cantidad e intensidad de acúmulos de pED-MARCKS fue muy baja (casi indetectable) (figura 41 B, video 1). En cambio, luego del tratamiento con PMA la inmunoreactividad se encontró tanto en los somas, como en las proyecciones y conos de crecimiento. Observamos parches de tamaños variables, predominando los parches pequeños (figura 41 F y J, video 2). En algunas neuronas, cuya naturaleza no determinamos mediante marcadores específicos, notamos que la señal de pED-MARCKS era levemente más intensa (no mostrado), probablemente respondiendo a estados funcionales particulares de dichas células.

Por su parte, la fosforilación en la S25 siempre fue intensa localizándose en acúmulos ubicados en los somas (regiones basal, media y apical) y prolongaciones neuronales. Estos parches eran principalmente periféricos,

también de tamaños variables como ya fuera descrito previamente (Zolessi y Arruti, 2001; Toledo y Arruti, 2009). En la población de estos parches predominan los de mayor tamaño (figura 41 E, I, G, K, H, L, video 1). En los tratamientos con PMA, inicialmente notamos que independientemente de la duración y concentración de PMA, existen algunas leves alteraciones en la morfología, como el redondeamiento de algunas células, atribuible a una pérdida de adhesión al sustrato. Sin embargo esto no alteró de manera perceptible la forma de las neuritas o de los conos de crecimiento (no encontramos fenómenos de retracción neurítica). Los tratamientos con PMA provocaron un aumento importante en la cantidad de pED-MARCKS, manifestado en el tamaño e intensidad de los acúmulos, en todos los tipos neuronales presentes en los cultivos, organizándose en parches principalmente citoplásmicos, como puede apreciarse claramente en las imágenes de secciones confocales únicas y planos ortogonales (figura 41 E-L). Nuevamente, al igual que lo observado sobre cortes histológicos, los acúmulos de pED-MARCKS no colocalizaban con los de S25p-MARCKS, que son principalmente periféricos. Este fenómeno de no-colocalización es también muy evidente en las neuritas. Sin embargo, el fenómeno más llamativo es la disminución de la señal de S25p-MARCKS de manera proporcional al aumento de la señal de pED-MARCKS. Esta disminución primero fue ostensible en las neuritas y luego en el soma neuronal (figura 41 I-L, video 2). En algunas células asociadas en pequeños grupos notamos la persistencia de S25p-MARCKS en las regiones de contacto célula-célula (figura 41 L).

También observamos que en dos eventos particulares la señal de pED-MARCKS es sumamente elevada: en la mitosis y en la apoptosis. En ambos casos la señal se organiza en parches principalmente citosólicos y de menor tamaño que en las células interfásicas (datos no mostrados). Las células mitóticas también presentan señal con el Acm 3C3 pero recordemos que se trata de una reacción cruzada con un antígeno aún no identificado (Zolessi y Arruti, 2001) mientras que en las células apoptóticas la señal del Acm3C3 está ausente.

Analizamos también el resultado del efecto de PMA mediante Western-blot. En estas condiciones de cultivo de baja densidad, donde existe bajo número de células de Müller, la fracción de MARCKS fosforilada en la S25 puede estimarse en el orden de un 30-40% del total de MARCKS, en tanto que la fracción fosforilada en el ED de MARCKS es casi despreciable con este procedimiento de detección. La estimulación con PMA 3 μ M durante 15 minutos provocó un aumento notorio de la fracción fosforilada en el ED al tiempo que la cantidad relativa de S25p-MARCKS disminuyó (Figura 41 M). Al igual que lo mostrado por los Western-blot de las muestras de retinas enteras, S25p-MARCKS y pED-MARCKS tienen diferentes movilidades relativas siendo mayor la de esta última. En los tratamientos, se observa que mientras que la banda de S25p-MARCKS desaparece, la de la proteína

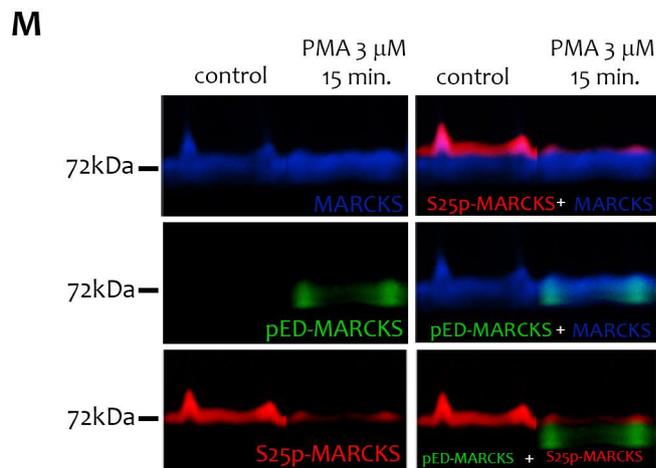
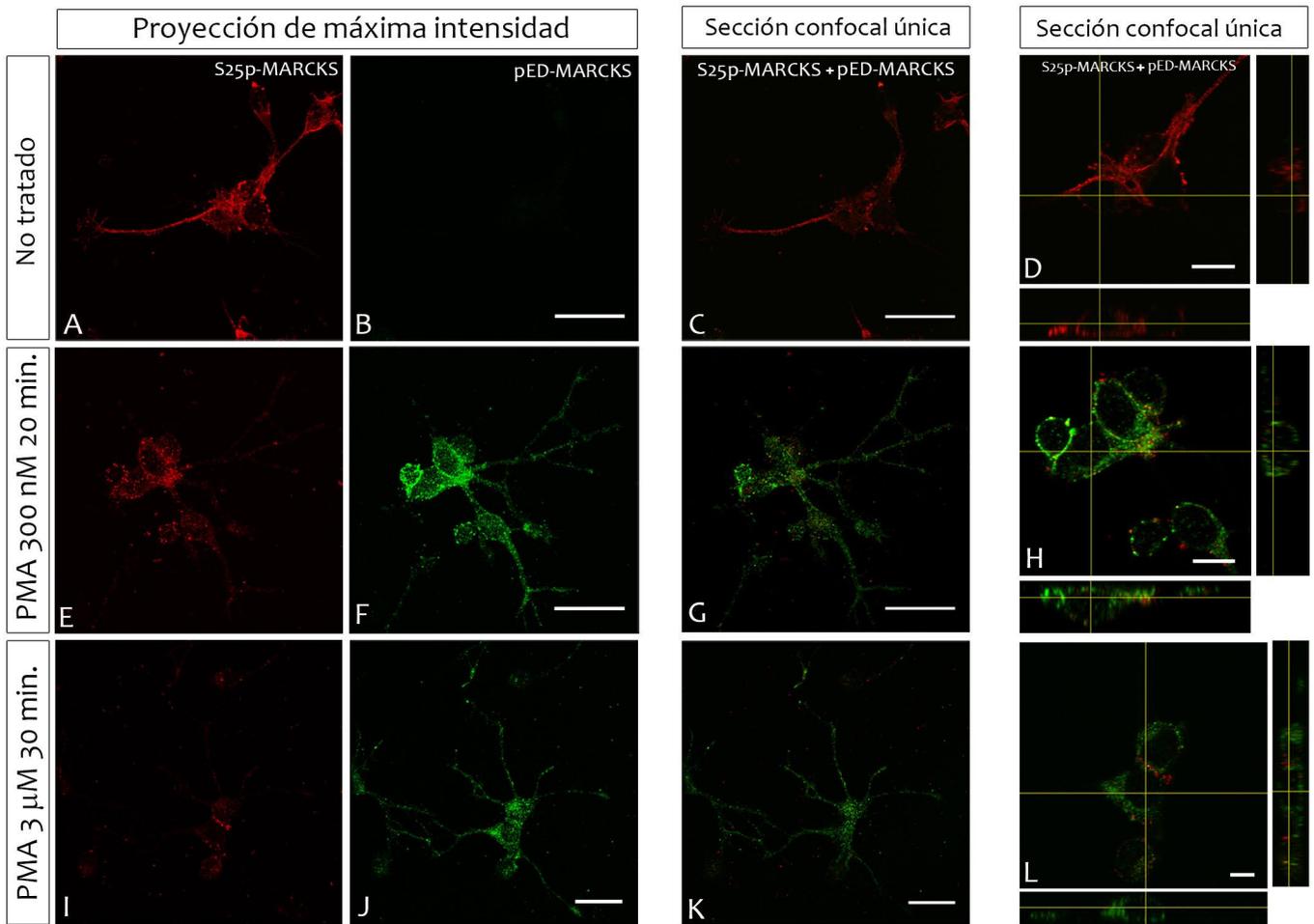


Figura 41: MARCKS fosforilado en el ED y en la S25 en neuronas de la retina en cultivo estimuladas con PMA. **(A-L)** Inmunodetecciones de pED-MARCKS y S25p-MARCKS en cultivos de neuroblastos de la retina de embriones de E8 mantenidos 3 div y tratados con diferentes concentraciones de PMA como se indica a la izquierda de cada fila de imágenes. Las mismas células se muestran en proyecciones de máxima intensidad, secciones confocales únicas y planos ortogonales. Barras: 10 μm. **(M)** Western-blots secuenciales pseudocoloreados de inmunodetecciones para MARCKS, pED-MARCKS y S25p-MARCKS de cultivos de neuroblastos de la retina de embriones de E8 tratados con PMA 3 μM durante 15 minutos. A la derecha se muestra la superposición de las inmunodetecciones.



Video 1: Reconstrucción 3D de células de la retina de E8 en cultivo. MARCKS se marca en verde y S25p-MARCKS en rojo. MARCKS se encuentra presente tanto en los neuroblastos como en glía de Müller, mientras que S25p-MARCKS solo está presente en neuroblastos. Ambas, MARCKS y S25p-MARCKS se localizan en acúmulos principalmente periféricos.

Video 2: Reconstrucción 3D de células de la retina de E8 en cultivo tratadas con PMA 300 nM durante 10 minutos. S25p-MARCKS se muestra en rojo y pED-MARCKS en verde. Se aprecia la reducción de S25p-MARCKS comparado con la situación no tratada (video 1). Además los acúmulos de S25p-MARCKS y pED-MARCKS no colocalizan.

total no presenta modificaciones en su ancho, lo que sugiere que existen otras variantes de la proteína que co-migrarían con S25p-MARCKS.

3.6) Evolución de las fosforilaciones en el ED y en la S25 de MARCKS al suprimir la estimulación con PMA

Nos preguntamos a continuación si existía una caída en la señal de pED-MARCKS y un aumento concomitante de S25p-MARCKS luego de remover la estimulación con PMA. Para responder esta pregunta cultivamos células de la retina de E8 durante 3 *div* y las tratamos durante 1 minuto con PMA 300 nM. Posteriormente, se removió el medio de cultivo, seguido de un lavado rápido con medio de cultivo sin suero y restituimos el medio de cultivo condicionado reservado al inicio del experimento. Analizamos mediante Western-blots e inmunofluorescencia los niveles de fosforilación en S25p-MARCKS y pED-MARCKS.

En estos experimentos apreciamos que un tratamiento de un minuto solo provoca un incremento muy leve en la cantidad de pED-MARCKS en los Western-blots (no así en las IFIs, resultado que podría atribuirse a diferencias en la sensibilidad de ambos procedimientos). Recordemos que los resultados presentados hasta ahora corresponden a tratamientos de entre 15 y 30 minutos. Sin embargo, luego de la remoción de la droga existe un aumento en la señal de pED-MARCKS en función del tiempo post tratamiento, al tiempo que la señal de S25p-MARCKS experimenta una disminución concomitante (figura 42 A). Luego de 60 minutos de remoción de la droga, la señal de S25p-MARCKS es extremadamente baja y como puede apreciarse en las imágenes de microscopia confocal de proyecciones de máxima intensidad, la misma se restringe a las zonas de contacto inter-celular en los neuroblastos agrupados en acúmulos (figura 42 B).

En otra serie de experimentos, con tiempos más prolongados de incubación con PMA 3 μ M y tiempos más prolongados de recuperación post tratamiento (7 y 24 horas luego de remover el PMA), observamos mediante IFIs que luego de un incremento inicial de pED-MARCKS como consecuencia de la estimulación con PMA, los niveles bajan levemente luego de 7 a 24 horas de removida la droga (figura 43 A-L). Sin embargo, en estos tiempos de cultivo no se llega a los niveles basales de pED-MARCKS encontrados antes de la estimulación con PMA. Los ensayos de western-blot muestran un descenso más importante de pED-MARCKS luego de remover la droga, en comparación con lo observado en las IFI, probablemente debido a diferencias de sensibilidad de las técnicas (figura 43 M). Por su parte, la fosforilación en la S25 luego de presentar una disminución inicial a los 30 minutos de tratamiento, comienza un proceso de recuperación luego de 7 a 24 horas de retirada la droga, aunque sin alcanzar los niveles existentes al inicio del tratamiento (figura 43 A, D, G, J y M). MARCKS total no mostró variaciones observables (no mostrado).

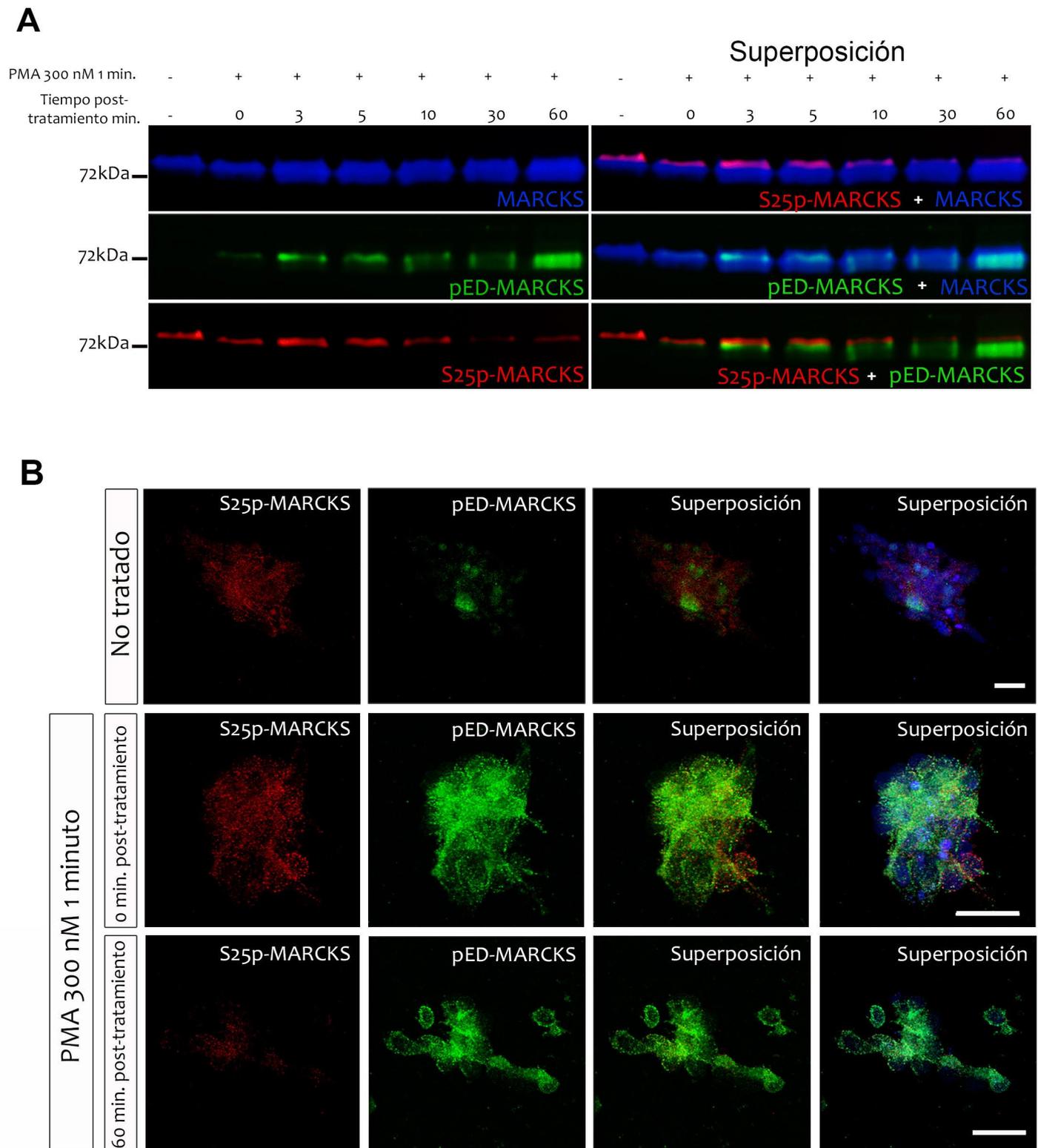
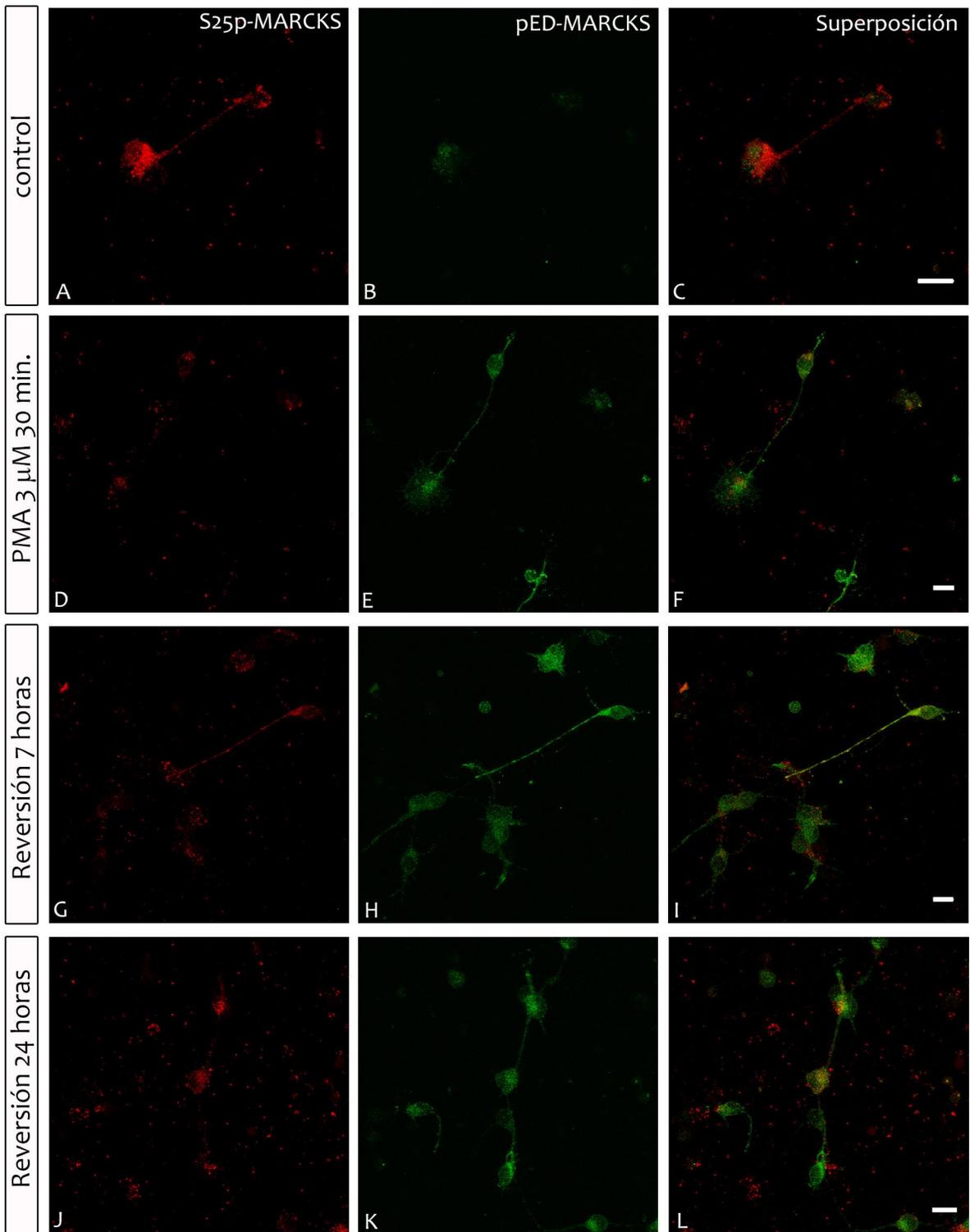


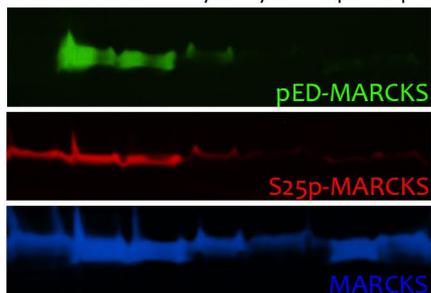
Figura 42: Persistencia de pED-MARCKS en neuroblastos de la retina en cultivo, luego del tratamiento con PMA. **(A)** Western-blots secuenciales seudocoloreados. Neuroblastos de la retina neural de embriones de pollo cultivados 3 div y luego tratados por un minuto con PMA 300 nM, o DMSO al 0.1% para los controles. Los cultivos fueron luego lavados en medio sin suero y mantenidos en medio de cultivo condicionado, sin PMA durante 0-60 minutos, como se indica en la parte superior de la figura. **(B)** Inmunodetección de S25p-MARCKS y pED-MARCKS en cultivos de neuroblastos de la retina no tratados, o tratados con PMA 300 nM durante 1 minuto e inmediatamente fijados, o tratados con PMA 300 nM por 1 minuto y luego cultivados en medio sin PMA durante 60 minutos. Las imágenes muestran proyecciones de máxima intensidad de microscopía confocal. Barras: 20 μ m.

Figura 43: Recuperación de la fosforilación en la S25 de MARCKS luego de la remoción de la estimulación con PMA. Imágenes de microscopía confocal, proyecciones de máxima intensidad de las inmunodetecciones de S25p-MARCKS y pED-MARCKS. **(A-C)** Células no tratadas. **(D-F)** Células tratadas con PMA 3 μ M durante 30 minutos. **(G-I)** Recuperación de la fosforilación 7 horas después de remover el PMA y cultivar las células en DMEM con suero. **(J-L)** Recuperación de la fosforilación 24 horas después de remover el PMA y cultivar las células en DMEM con suero. Barras: 10 μ m. **(M)** Western-blots secuenciales seudocoloreados de inmunodetecciones para pED-MARCKS, S25p-MARCKS y MARCKS de cultivos de neuroblastos de la retina de embriones de E8 tratados con PMA 300 nM o 3 μ M durante 30 minutos y luego incubados durante 7 a 24 horas sin PMA (reversión).



M

PMA 300 nM	-	+	-	+	-	+	-
PMA 3 μ M	-	-	+	-	+	-	+
Reversión	-	-	-	7h	7h	24h	24h



El conjunto de estos resultados muestra que PMA es un potente activador de PKC, considerando los altos niveles de fosforilación de su principal sustrato MARCKS, en neuroblastos de la retina embrionaria, y que existiría una gran persistencia de la activación de PKC que se mantiene horas después de la remoción de dicho estimulador. Por su parte, en estas condiciones la restitución de la fosforilación de S25p-MARCKS es sumamente lenta.

3.7) Comparación de los efectos de la citocalasina D y PMA sobre los estados fosforilados en el ED y en la S25.

Los tratamientos con PMA presentados en las secciones anteriores demostraron claramente que la fosforilación en el ED promueve la desfosforilación de la S25. Propusimos varias hipótesis que nos permitieran explicar este fenómeno y diseñamos diferentes aproximaciones experimentales para verificar algunas de ellas.

- 1) La fosforilación del ED promueve un cambio conformacional en MARCKS que expone el residuo de la S25 a las fosfatasas celulares.
- 2) La fosforilación del ED provoca la pérdida de interacción de MARCKS con un ligando no conocido, de manera que se expone el residuo de la S25 a las fosfatasas celulares.
- 3) La fosforilación en el ED induce la separación de los filamentos de actina, lo cual en sí mismo como ya fuera descrito, promueve la desfosforilación de la S25 por algún mecanismo que involucra las hipótesis expuestas en los literales 1 y 2.
- 4) La fosforilación del ED interfiere con interacciones de MARCKS intra o intercadena, exponiendo así la S25 a fosfatasas.
- 5) La activación de PKC o el propio tratamiento con PMA promueve la activación de una o varias fosfatasas celulares que determinan la desfosforilación del residuo de S25.
- 6) Dos o más de los mecanismos hipotéticos planteados están actuando de manera conjunta en la célula.

Decidimos entonces testar algunas de estas hipótesis en particular la 3 y 5. En esta sección evaluamos la hipótesis 3 y en la sección 3.8 la hipótesis 5.

Previamente habíamos demostrado que el desensamblado del citoesqueleto de actina de neuronas en cultivo mediante tratamientos con citocalasina D, promovían una desfosforilación de MARCKS en la S25 (Toledo y Arruti, 2009). Entonces, un fenómeno que tiene lugar a nivel de la interacción de actina con el ED de MARCKS produce alteraciones en un dominio aminoterminal, una región alejada del ED. Cabe preguntarse entonces si todos los eventos que tienen lugar en el ED, repercuten en el extremo amino terminal o se trata, en última instancia, del mismo fenómeno. Para tratar de responder esta pregunta, combinamos los tratamientos con citocalasina D

y PMA y comparamos la capacidad de inducir desfosforilación de ambos tratamientos por separado o en conjunto.

En primer lugar, con respecto al nivel de fosforilación del ED en cultivos de neuroblastos retinianos detectamos que sus niveles son bajos en las situaciones control y en los tratados con citocalasina D solamente (Figura 44 A). En cambio cuando se estimula con PMA solamente, o con PMA y citocalasina D, la fosforilación en el ED se incrementa. De hecho, los niveles alcanzados por la fosforilación del ED en los cultivos tratados con citocalasina D y PMA son mayores a los obtenidos cuando solo se estimula con PMA (figura 44 C).

Por otro lado, observamos que la capacidad de inducir la desfosforilación de la S25 es menor en los tratamientos con citocalasina D -al menos en las dosis y tiempos utilizados- que la desfosforilación provocada por la estimulación con PMA. Los tratamientos combinados mostraron niveles de desfosforilación del orden de los provocados por PMA solo, aunque con cierta variabilidad (Figura 44 B). Estos resultados sugieren que el o los mecanismos desencadenados como consecuencia de la activación de PKC son más eficientes en cuanto a su capacidad de promover la desfosforilación en la S25 que la despolimerización de actina. Esto sugeriría que ambos procesos recurren a mecanismos independientes, aunque dado que la suma de los tratamientos no tiene un efecto aditivo en la disminución de la fosforilación, podemos suponer también que ambos procesos de desfosforilación recurren parcialmente al mismo fenómeno, por ejemplo un cambio conformacional en el extremo aminoterminal.

3.8) Efectos de la inhibición de proteínas fosfatasas clásicas sobre la desfosforilación de S25p-MARCKS inducida por los tratamientos con PMA.

En dos situaciones fisiológicas distintas, como son la disociación de los filamentos de actina o la fosforilación del ED por PKC, pusimos en evidencia la ocurrencia de un fenómeno de rango amplio en MARCKS. En ambas situaciones, el fenómeno en común fue la resultante desaparición de la fosforilación en la S25, producto de la actividad de una fosfatasa de proteínas (PP). Hace ya varios años se demostró que los residuos de MARCKS fosforilados por quinasas dirigidas por prolina como cdc2 (Cdk1) o TPKII (Cdk5) eran desfosforilados por PP2A (Yamauchi et al., 1998). Estas evidencias alentaron la búsqueda de la o las posibles fosfatasas capaces de desfosforilar a MARCKS en la S25, en particular frente a la activación de PKC por PMA. De manera interesante, se ha demostrado la existencia de una relación entre la actividad de PKC y PP2A. En neuronas de la línea N27, la activación de PKC determina la fosforilación de la serina 566 de la subunidad B56δ de PP2A (Ahn et al., 2011). Nos planteamos entonces una hipótesis de trabajo en la cual proponemos que la activación de PKC por PMA en neuroblastos de la retina, provoca la fosforilación de alguna subunidad de PP2A y su activación, lo que a su vez

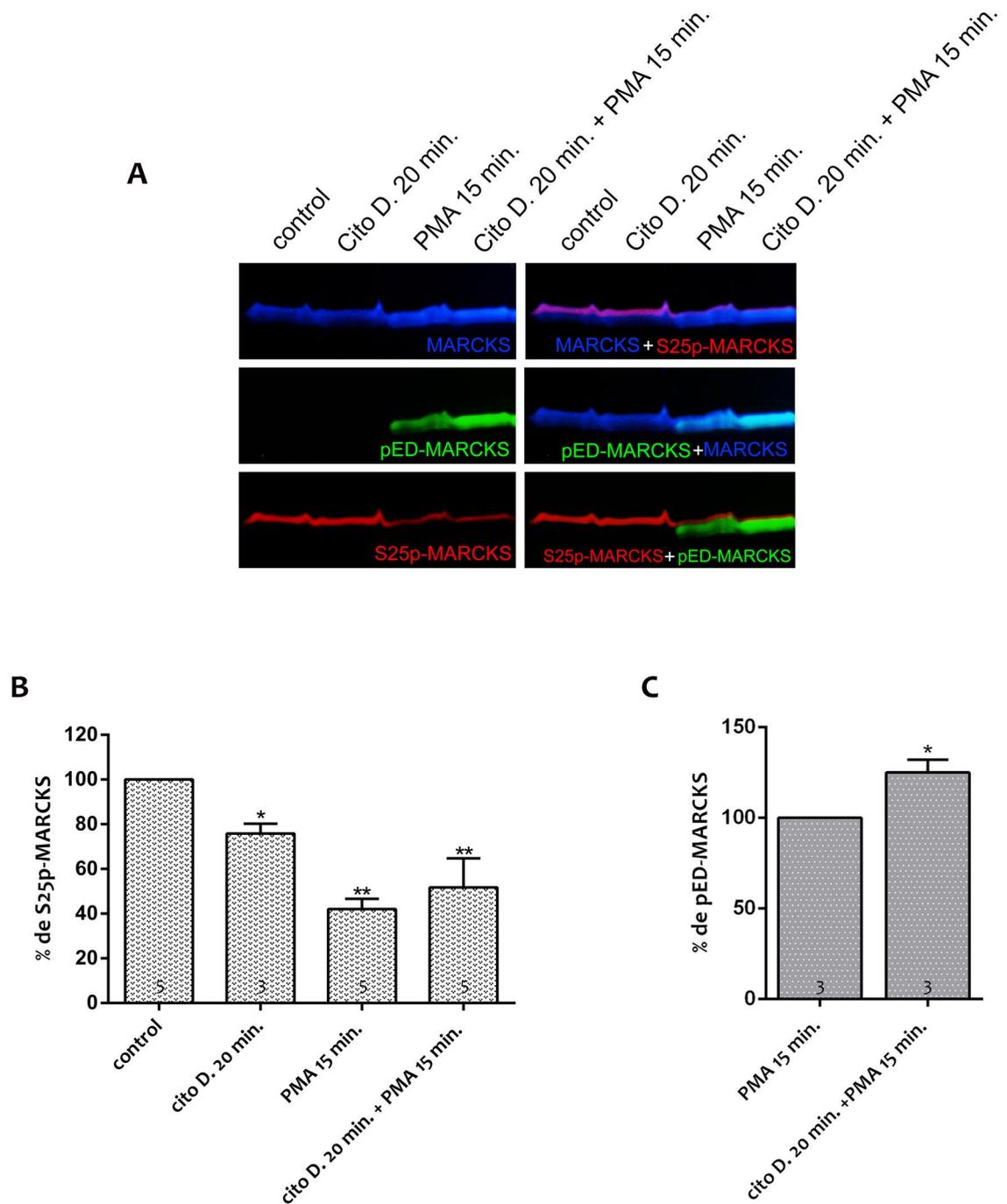


Figura 44: Reducción de la fosforilación en la S25 de MARCKS provocados por el desensamblado de actina con citocalasina D o la estimulación de PKC con PMA. Neuroblastos en cultivos fueron tratados con citocalasina D $2 \mu\text{M}$ durante 20 minutos, PMA $3 \mu\text{M}$ durante 15 minutos o citocalasina D durante 20 minutos y luego PMA durante 15 minutos. **(A)** Las células fueron luego lisadas y analizadas por western-blot. Las tres inmunodetecciones se muestran en colores diferentes en las imágenes de la izquierda. A la derecha se muestra la superposición de las inmunodetecciones de la izquierda. **(B y C)** Resultados del análisis densitométrico de los western-blot para la fosforilación en la S25 (B) y el ED (C). Los resultados se expresan como $\text{media} \pm \text{SEM}$, de experimentos independientes. * $p \leq 0.05$. La significancia estadística fue calculada con los test estadísticos no paramétricos Kruskal-Wallis. El número dentro de cada barra indica el número de experimentos independientes.

determina la desfosforilación de la S25 de MARCKS. Para testar dicha hipótesis, incubamos cultivos de neuroblastos con inhibidores de diferentes fosfatasa, entre ellos inhibidores de PP2A. Los inhibidores utilizados fueron: tautomycetina (inhibidor específico de PP1), ácido okadaico y caliculina (inhibidores de PP1 y PP2A) así como ciclosporina A y FK-506 (inhibidores de PP2B). Luego de tratar a las células con distintos inhibidores de fosfatasa, los estimulamos con PMA en presencia de los inhibidores. Analizamos posteriormente mediante Western-blots la fosforilación en el ED y en la S25 de MARCKS.

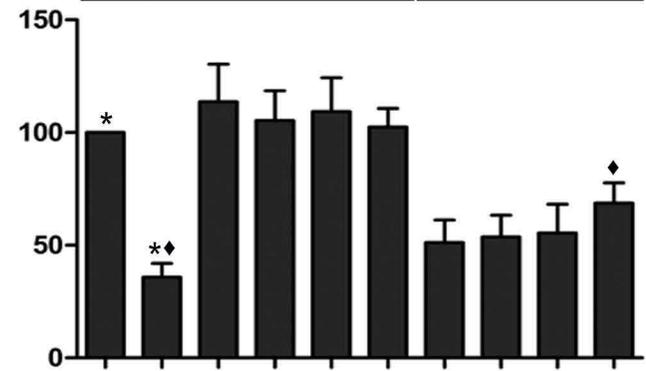
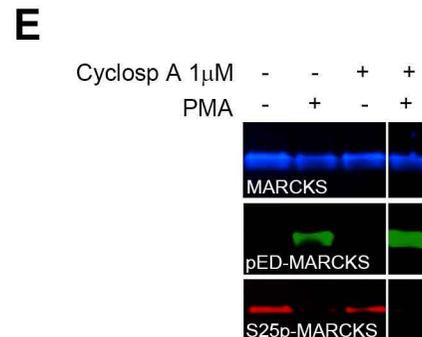
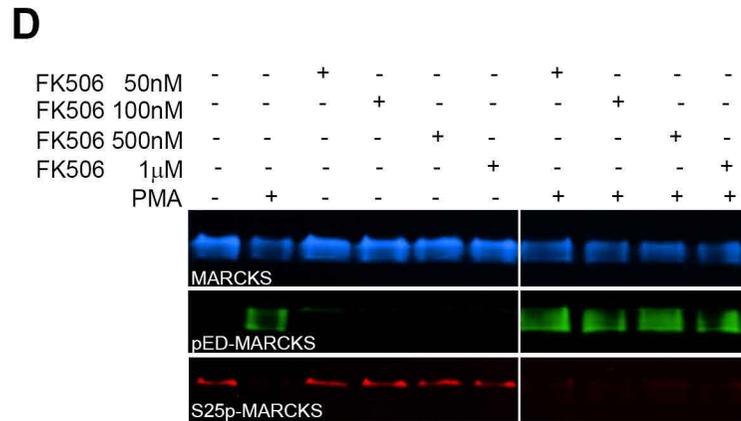
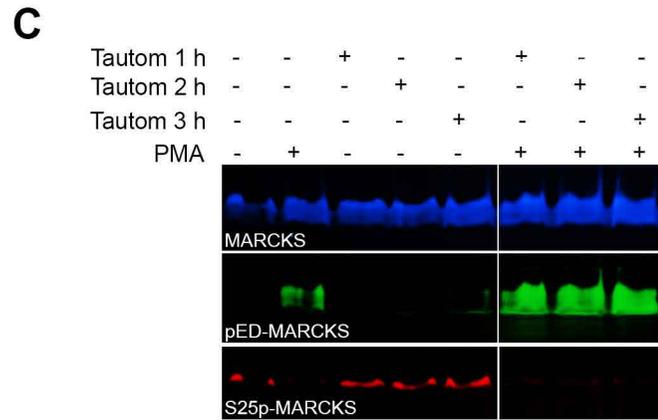
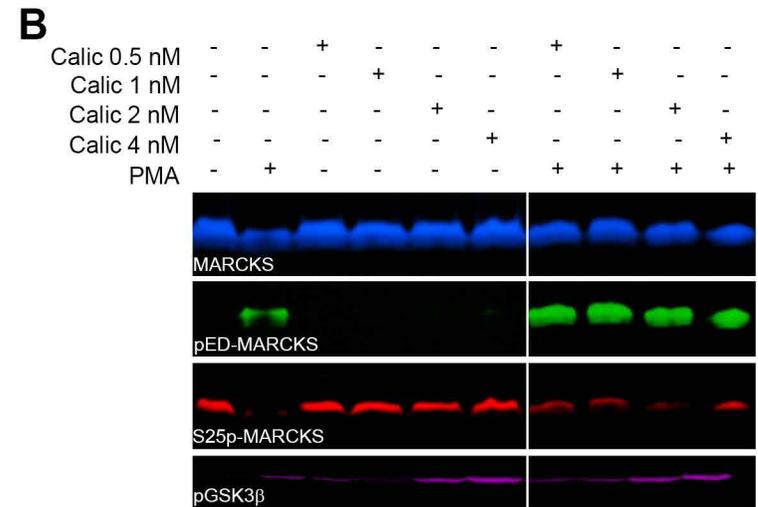
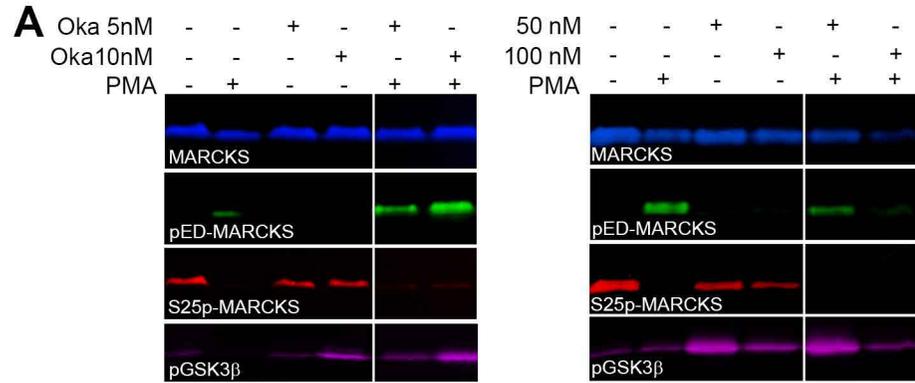
Realizamos en primera instancia los experimentos con ácido okadaico, un conocido inhibidor de PP1 (utilizado en altas dosis) y PP2A (utilizado en bajas dosis). Tratamientos con dosis de entre 100 nM y 1 μ M resultaron tóxicos para la célula. En estos experimentos no pudimos evidenciar un rescate de la desfosforilación de la S25 provocada por la estimulación con PMA (figura 45 A). Sin embargo, al considerar que estas dosis presentaban cierto efecto tóxico y que distintos tratamientos que promueven la apoptosis celular determinan una reducción de la fosforilación en la S25 (datos no publicados), realizamos nuevos tratamientos con dosis bajas y tiempos prolongados. Los tratamientos con ácido okadaico 5 y 10 nM no provocaron un aumento en el nivel de S25p-MARCKS en los neuroblastos tratados con PMA. Evidenciamos la actividad de la droga al detectar un sustrato de PP1 y PP2A, la enzima GSK-3 β . La fosforilación de la serina 9 de la GSK-3 β es una fosforilación inhibitoria que ya mencionáramos en el capítulo I de esta tesis. Algunos datos indican que las fosfatasa responsables la desfosforilación de la serina 9 de GSK-3 β son PP1 y PP2A (Hernández et al., 2010). De manera interesante, la actividad del inhibidor también fue evidenciada por el nivel de fosforilación del propio ED de MARCKS. Los cultivos tratados con ácido okadaico 5 y 10 nM por 4 horas y coestimulados con PMA muestran un incremento en la fosforilación del ED superior a la encontrada en los neuroblastos estimulados con PMA en ausencia de inhibidor (figura 45 A). Estas evidencias indican que el ED de MARCKS es desfosforilado por PP1 y/o PP2A.

Luego de evaluar estos resultados, decidimos intentar la inhibición de las mismas fosfatasa con la caliculina, un inhibidor más potente de PP1 y PP2A. Los tratamientos con caliculina, lograron revertir, al menos parcialmente, la desfosforilación de MARCKS en la S25. Pretratamientos con caliculina 0.5-4 nM durante 15 minutos y luego una estimulación con PMA 300 nM de 10 minutos, determinan una reducción de la fosforilación de S25 al 80% aproximadamente, respecto al no tratado, muy por encima del 20-50% detectado en presencia de PMA solamente (figura 45 B). El efecto inhibitor de la actividad de PP1 y PP2A por caliculina, fue evidenciado también por el claro incremento en la fosforilación del ED de MARCKS y de la serina 9 de GSK-3 β . De esta manera estos resultados sugieren que PP1 y/o PP2A podría ser responsable de la desfosforilación de MARCKS en la S25, ya que este inhibidor presenta dosis IC₅₀ muy similares para ambas fosfatasa.

Para discriminar entonces cuál de estas dos o si las dos fosfatasa actúan en la S25, empleamos un inhibidor específico de la PP1, la tautomocetina. Tratamientos de diferente duración (25 minutos a 24 horas) con dosis variables (100 nM a 1 μ M) de tautomocetina, no promovieron un incremento en la fosforilación de la S25 en los cultivos coestimulados con PMA. La actividad del inhibidor fue evidenciada por un incremento de la fosforilación del ED (figura 45 C). En los Western-blots de los tratamientos con este inhibidor se aprecia que la cantidad de pED-MARCKS en ausencia de PMA, es mayor que la hallada en los controles (sin PMA y sin tautomocetina), mostrando así la existencia de una alta tasa de recambio de la fosforilación en el ED en condiciones basales (sin estimulación exógena). Este incremento de la fosforilación del ED también se aprecia cuando se produce la coestimulación con PMA en presencia de tautomocetina. Estos resultados indicarían entonces que PP1 no desfosforila la S25 pero sí el ED de MARCKS, y tomados en conjunto con los resultados obtenidos con calcicolina nos permiten concluir que PP2A sería la fosfatasa responsable de la desfosforilación de MARCKS en la S25.

Por último, decidimos evaluar si PP2B (calcineurina) también es capaz de desfosforilar la S25. Para ello tratamos cultivos con dos inhibidores: FK-506 y ciclosporina A. En ninguna de las dosis analizadas (50 nM a 1 μ M) logramos inhibir la desfosforilación de la S25. Pusimos en evidencia la actividad de ambos inhibidores por el incremento en la fosforilación del ED de MARCKS como consecuencia de su estimulación con PMA (figura 45 D-E). Esto nos permite concluir que la PP2B no es capaz de desfosforilar la S25 pero sí el ED.

Figura 45: S25p-MARCKS en neuroblastos en cultivo tratados con PMA e inhibidores de fosfatasa. Western-blots secuenciales donde se muestran las inmunodetecciones para MARCKS, S25p-MARCKS, pED-MARCKS y GSK-3 β . Las células fueron cultivadas durante 3 *div* y tratadas con los inhibidores de fosfatasas en medio sin suero y luego estimuladas con PMA 300 nM durante 10 minutos. Se utilizó DMSO al 0.01% en los controles. **(A)** A la izquierda, células tratadas con ácido okadaico 5 y 10 nM durante 4 horas y luego 10 minutos con PMA en presencia de ácido okadaico. A la derecha, células tratadas con ácido okadaico 100 y 500 nM 120 minutos y luego PMA por 10 minutos. **(B)** Células tratadas con caliculina 0.5, 1, 2 y 4 nM durante 15 minutos y luego 10 minutos con PMA en presencia de inhibidor. Debajo se muestran la cuantificación de la fosforilación en la S25 de cuatro experimentos independientes. Los valores son presentados como la media \pm SEM, * $p\leq 0.05$. La significación estadística fue determinada utilizando los test no paramétricos Kruskal-Wallis y Wilcoxon-Man Whitney. **(C)** Células tratadas con tautomocetina 1 μ M durante 1, 2 y 3 horas y coestimuladas con PMA 300 nM los últimos 10 minutos. **(D)** Células tratadas con FK-506 50, 100, 500 nM y 1 μ M durante 15 minutos y luego coestimuladas con PMA 300 nM por 10 minutos en presencia de inhibidor. **(E)** Células tratadas con ciclosporina A 1 μ M durante 15 minutos y luego coestimuladas con PMA 300 nM por 10 minutos en presencia de inhibidor.



DISCUSIÓN

La proteína MARCKS fue identificada inicialmente como el principal sustrato de PKC en diferentes tipos celulares (Graff et al., 1989a; revisado en Arbusova et al., 2002). Más recientemente se identificaron otros sitios fosforilables por diversas quinasas, entre ellas las más destacables fueron las quinasas dirigidas por prolina (Yamauchi et al., 1998; Manenti et al., 1999). Estos resultados agregan un alto grado de complejidad a las posibilidades de regulación de la funcionalidad de esta proteína y aportan nuevas evidencias a la proposición de que MARCKS se ubica en posición nodal en el entrecruzamiento de diferentes vías de señalización celular. En este trabajo demostramos la ocurrencia de una fosforilación tejido específica de MARCKS en la S25 a cargo de Cdk5. Considerando todas estas posibilidades de regulación de las que es sujeto MARCKS y teniendo en cuenta además las evidencias que sugieren que la población de MARCKS fosforilada en la S25 presenta además fosforilaciones en otros residuos (Zolessi et al. 2001; Zolessi y Arruti, 2001b), nos propusimos estudiar en mayor profundidad cual es la relación entre la fosforilación de MARCKS en la S25 y las fosforilaciones clásicas que tienen lugar en el ED.

- **Fosforilación del ED de MARCKS durante el desarrollo normal de la retina neural.**

Nuestra primera aproximación consistió en evidenciar los niveles de fosforilación del ED durante el desarrollo normal de la retina neural. Con este fin, desarrollamos un sistema nuevo para comparar los niveles de fosforilación de MARCKS detectados mediante Western-blot que consistió en digitalizar las placas radiográficas y otorgarles falso color, para luego superponerlas. Este sistema nos permitió comparar de manera rápida la cantidad de proteína fosforilada en ambos residuos y contrastarlas con la cantidad de proteína total, obteniendo así información semi-cuantitativa de las proporciones de dichas proteínas. Así pusimos en evidencia que mientras pED-MARCKS estaba presente en bajas cantidades desde etapas tempranas del desarrollo hasta las más avanzadas, S25p-MARCKS mostró un incremento sostenido desde el inicio de la diferenciación neuronal, como ya fuera descrito (Zolessi y Arruti, 2001b). Se ha determinado que en neuronas en cultivo, sinaptosomas, y rodajas de hipocampo en cultivo, MARCKS es fosforilado en el ED en respuesta a esteres de forbol, despolarización y agonistas de glutamato (Wang et al., 1989; Robinson, 1991; Scholtz y Palfrey, 1991). En la retina embrionaria de pollo, pED-MARCKS mostró solamente un incremento leve en E4, donde fueron las inmunodetecciones sobre cortes las que permitieron identificar principalmente células mitóticas con señal. Estos resultados sugieren que posiblemente los niveles de fosforilación en el ED son normalmente bajos y aumentan rápidamente respondiendo a condiciones fisiológicas particulares de la célula, y que no es tan persistente como la fosforilación en la S25. Más

adelante en el desarrollo (E8-E10), mientras que pED-MARCKS se concentró solamente en las capas más internas de la retina, S25p-MARCKS mostró una localización más extensa en las capas de células que comienzan el proceso de diferenciación neuronal a partir de E4 (Zolessi y Arruti, 2004). Esto sugiere que, a diferencia de la fosforilación de MARCKS en la S25, que presenta un incremento sostenido durante el largo proceso de diferenciación neuronal, la fosforilación en el ED parece responder de manera rápida y transitoria a diferentes estados funcionales de la célula. Es conocido que la fosforilación en el ED torna "inactiva" a MARCKS provocando tanto su separación de los filamentos de actina como de los fosfolípidos de la membrana plasmática en el fenómeno conocido como "switch" electrostático (Arbuzova et al., 2002). En cambio, alguna característica particular del balance fosforilación/desfosforilación hacen que la fosforilación en la S25 sea más estable durante la diferenciación neuronal. Esto puede ser indicativo de que su rol radica en la regulación más fina de la actividad fisiológica de MARCKS, entre las que se podrían encontrar la interacción con otras moléculas o su susceptibilidad a otras fosforilaciones también regulatorias.

Las evidencias experimentales presentadas aquí son las primeras acerca de la presencia y localización de pED-MARCKS en la retina neural embrionaria. Solamente existen estudios previos realizados sobre cerebros de rata, los cuales demostraron claramente que los niveles de pED-MARCKS son bajos en la etapa embrionaria y aumentan en la vida postnatal (Hamada et al., 2003). Los autores proponen que si bien se encuentran presentes en el cerebro embrionario de rata tanto MARCKS como PKC λ , ϵ , δ y γ , en el tejido también se encuentran factores inhibidores de la fosforilación de MARCKS. Nosotros demostramos la presencia en etapas embrionarias de al menos dos PKC β y ζ capaces de fosforilar a MARCKS en el ED, pero de todas maneras en niveles bajos. Sin embargo, un estado funcional en donde claramente se incrementó la fosforilación fue en las mitosis. En dicha situación no solamente hay un incremento en la señal total de pED-MARCKS evidenciable por Western-blot (ostensible en la retina E4), sino que además hay un cambio en su distribución sub-celular, localizándose de manera difusa en el citoplasma y extendiéndose hasta los territorios cromosómicos.

- **Exclusión molecular de las fosforilaciones clásicas y no clásicas de MARCKS.**

La migración anómala que experimenta MARCKS en SDS-PAGE ha sido explicada históricamente con distintos argumentos, entre los que se encuentran su forma de bastón, naturalmente desplegada, el alto contenido en aminoácidos ácidos que impiden su correcta interacción con el SDS (Arbuzova et al., 2002). A su vez, las fosforilaciones alteran la movilidad electroforética de la proteína. En algunos trabajos se ha demostrado que la fosforilación *in vitro* de MARCKS por cdc2 reduce su movilidad electroforética, al tiempo que la fosforilación por

PKC parece no alterarla (Yamamoto et al., 1998). Los autores atribuyen estas diferencias a los sitios de fosforilación para ambas quinasas. En efecto, la separación mediante isoelectroenfoque de muestras de MARCKS inmunoprecipitadas a con el Acm 3c3 muestra el carácter heterogéneo de las bandas reconocidas por este anticuerpo y por un anticuerpo anti MARCKS total. Solo las bandas más ácidas representadas por 4 o 5 bandas son reconocidas por este anticuerpo, existiendo un número mucho mayor de polipéptidos y de naturaleza más básica reconocidos por el anticuerpo anti MARCKS total (Zolessi y Arruti, 2001). Mediante RT-HPLC y MALDI-TOF se pudo evidenciar que el Acm 3c3 reconoce una mezcla con distintos niveles de fosforilación, encontrándose variantes fosforiladas en al menos tres residuos de serina (Ser 44, 92 y 99) además de la S25 (Zolessi et al., 2004). Pueden encontrarse, entonces, múltiples combinaciones de la fosforilación en la S25 con al menos una de las fosforilaciones en los otros residuos. Nosotros encontramos que la movilidad electroforética relativa de S25p-MARCKS es menor a la de pED-MARCKS. Aludiendo a la misma hipótesis que estos autores, podemos suponer que dado que el sitio de fosforilación por Cdk5 es distinto de los sitios de fosforilación por PKC, entonces tiene lugar un cambio en la movilidad electroforética. Esta diferencia también podría deberse a que otras modificaciones postraduccionales (miristilación, etc), podrían estar presentes en una variante de MARCKS y no en otras. De hecho estas diferencias en migración y el no solapamiento encontrado en las bandas nos permitieron concluir que ambas fosforilaciones son mutuamente excluyentes, conclusión que se ve apoyada también por las inmunodetecciones *in situ*. El anticuerpo utilizado para la detección de pED-MARCKS es un anticuerpo comercial obtenido mediante la inmunización de conejos con fosfo-péptidos sintéticos correspondientes a las secuencias cercanas a las serinas 152 y 156 de MARCKS de rata. En el ED existen al menos tres serinas (152, 156 y 163 en rata; 123, 127 y 134 en el pollo) que pueden ser fosforilables por PKC (Graff et al., 1989b; Hartwig et al., 1992), por lo tanto no podemos descartar que coexistan en MARCKS fosforilaciones a nivel de la S25 y al menos una serina del DE (S134), la cual no está siendo detectada por el anticuerpo. Por otro lado, también podríamos haber encontrado solapamiento de ambas bandas en el Western-blot aunque las fosforilaciones sean excluyentes, ya que la combinación de distintas modificaciones postraduccionales en la proteína podría haber determinado la misma migración relativa aunque se tratase de moléculas diferentes de MARCKS, pero este no fue el caso.

- **La activación de PKC en la retina neural provoca la desfosforilación de la S25 de MARCKS.**

El PMA es un ester de forbol, conocido como promotor tumoral así como un activador de PKC. La exposición de células a PMA tiene como resultado un incremento inicial en la actividad de PKC seguido de una regulación negativa de la actividad de esta quinasas. Es capaz de inducir la redistribución de actina y los cambios morfológicos

celulares consecuentes, lo cual se ha asociado a la motilidad celular vinculada a procesos metastáticos (Yokoyama et al., 1998; Larsson, 2006). Al estimular la actividad de PKC mediante la aplicación de PMA a retinas aisladas se produjo un incremento inmediato de la fosforilación en el ED de MARCKS, de manera evidente para las dosis de 300 nM y 3 μ M de PMA. De manera concomitante, encontramos un fenómeno sumamente interesante como es la desfosforilación del residuo de S25 de MARCKS, en particular en los tratamientos con 3 μ M de PMA encontramos una desaparición casi total de S25p-MARCKS. En los tratamientos sobre las células aisladas en cultivo, los efectos fueron evidentes para tiempos más cortos (15 minutos) y dosis más bajas de PMA (300 nM). Este fenómeno puede explicarse si consideramos las barreras difusionales a las que se enfrenta la droga en las retinas enteras para acceder a todas las células, mientras que en cultivo la misma puede acceder a todas las células por igual ya que el medio de cultivo se encuentra en contacto con todas ellas. Estos resultados nos estarían indicando que la exclusión subcelular y molecular que discutiéramos más arriba, tiene sustento en que la fosforilación del ED determina la desfosforilación de la S25, por lo que ambas fosforilaciones no pueden coexistir. Habíamos descrito previamente, cómo la disociación de los filamentos de actina del ED promovidos por el desensamblaje del citoesqueleto de actina, determinaba la desfosforilación de la S25 (Toledo y Arruti, 2009). De esta manera, un fenómeno que tiene lugar en una región alejada de la S25 (aproximadamente 100 aminoácidos) repercute en el grado de fosforilación de la misma, es decir un fenómeno de rango amplio, hasta ahora no descrito para MARCKS. En el presente trabajo presentamos la segunda evidencia de un fenómeno de esas características y los eventos que subyacen pueden ser los mismos o no, si bien el resultado de ambos es la desfosforilación de la S25.

- **Identificación de la fosfatasa que desfosforila a MARCKS en la S25.**

El nivel de fosforilación de las proteínas se modula por el balance entre las actividades de quinasas y fosfatasas. En células eucariotas las fosforilaciones tienen lugar a nivel de tres residuos aminoácidos principalmente: serina, treonina y tirosina, siendo las primeras las más numerosas. Para desfosforilar estos aminoácidos se han encontrado aproximadamente 137 fosfatasas (Shi, 2009). Si bien el número de fosfatasas parece relativamente bajo en relación a las quinasas (530), existe una enorme variedad de fosfatasas producto de la asociación de diferentes subunidades reguladoras con las catalíticas. Entre los miembros más conocidos de la familia de las protein-fosfatasas (PP) se encuentran PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5 y PP6 (Shi, 2009).

En particular en MARCKS, se ha determinado que tanto PP1, como PP2A y PP2B están vinculados con la desfosforilación del ED (Clarke et al., 1993; Seki et al., 1995). En nuestros experimentos inhibimos la actividad de

las fosfatasa PP1 y PP2A mediante tratamientos con ácido okadaico y caliculina, a PP1 con tautomocetina y a PP2B mediante tratamientos con ciclosporina A y FK-506. Solo obtuvimos inhibición de la desfosforilación de la S25 de MARCKS provocada por la estimulación de PKC, cuando tratamos a los neuroblastos con caliculina. Si bien demostramos la actividad de todos los inhibidores utilizados mediante controles apropiados entre los que se encontraba la propia fosforilación del ED, solamente la caliculina demostró inhibir la desfosforilación de la S25 provocada por los tratamientos con PMA. Otros autores han utilizado tanto ácido okadaico y caliculina para tratar de inhibir a PP1 y PP2A, pero solo se obtuvieron resultados con la caliculina, probablemente porque se trata de un inhibidor más fuerte (Shiraishi et al., 2006). Es conocido por los resultados de Yamamoto y cols. que PP2A es la fosfatasa responsable de desfosforilar a MARCKS cuando es fosforilada por quinasas dirigidas por prolina, como es el caso de S25, por lo que los resultados expuestos en esta tesis, están en concordancia con los de Yamamoto y cols. obtenidos con experimentos *in vitro* (Yamamoto et al., 1995). Para promover la desfosforilación de la S25, el PMA podría actuar de diversas maneras entre las que proponemos: 1) los tratamientos con PMA pueden determinar un cambio conformacional en la proteína producto de la fosforilación en el ED que permita su desfosforilación por PP2A, 2) el PMA podría inducir la inactivación de Cdk5, 3) el PMA podría actuar directamente o indirectamente sobre las fosfatasas activándolas. No contamos con evidencias que nos permitan descartar la primera hipótesis propuesta. La naturaleza desplegada de MARCKS ha hecho imposible hasta el momento los estudios conformacionales de grandes segmentos de la proteína, por lo que no contamos con evidencias acerca de la repercusión de fosforilaciones en el ED sobre el extremo aminoterminal de la proteína. En el presente se están llevando a cabo estudios sobre la conformación del extremo aminoterminal de MARCKS que contiene la S25 para obtener información acerca de las perturbaciones que tiene a nivel local, la fosforilación de la S25 (Tinoco y cols. datos no publicados).

Por otra parte, la cinética de desaparición de la fosforilación en la S25 como consecuencia de la estimulación de PKC, resultó mucho más rápida que la obtenida al tratar los neuroblastos con drogas inhibitorias de Cdk5, por lo que podemos suponer que la actividad de Cdk5 no se ve afectada de manera ostensible o evidenciable por nuestros métodos, por el tratamiento con PMA. Por tanto debemos buscar otra explicación para la desaparición de la fosforilación. Existen, sin embargo, algunas evidencias- que ya hemos mencionado- que indican la capacidad de PMA de activar a PP2A. La activación de PKA o PKC determina la fosforilación de la subunidad B56 δ , la cual activa a PP2A (Ahn et al., 2007, 2011; Zhang et al., 2007). La fosfatasa 2A es expresada de manera ubicua en células eucariotas y está constituida por varias subunidades, una C (catalítica), una A ("scaffolding") y varias B (reguladoras) que determinan tanto la actividad de la enzima como la especificidad de sustrato. La subunidad B56 δ es una de las posibles subunidades reguladoras de PP2A, expresada en altos niveles en el sistema nervioso, y su función es regulada por fosforilaciones. En los trabajos mencionados, la estimulación de células con PMA

promovió una fosforilación importante (hasta 3.5 veces mayor a los no estimulados) de la subunidad B56 δ , lo cual determinó un incremento en la actividad de PP2A (Ahn et al., 2011). En nuestros experimentos no tenemos evidencia de que sea la fosforilación en la misma subunidad lo que determina un incremento en la actividad de PP2A, ya que B56 δ es fuertemente regulada en su patrón temporal y espacial de expresión y, en lo que sabemos, muy mal conocida en la retina neural embrionaria de pollo (Nagase et al., 1997). De todas formas, estos resultados son sugerentes de la posible vinculación entre la actividad de PKC y PP2A en el tejido nervioso.

Todos los inhibidores estudiados aquí provocaron un claro aumento en la fosforilación del ED en concordancia con los datos existentes acerca de que PP1, PP2A y PP2B eran capaces de desfosforilar a MARCKS en el ED (Clarke et al., 1993; Seki et al., 1995). En nuestros cultivos neuronales, demostramos que tanto la inhibición de PP1, PP2A y PP2B, determinan un incremento en la fosforilación del ED, lo cual está en concordancia con los resultados de estos autores (Clarke et al., 1993; Seki et al., 1995). No obstante, resulta sumamente interesante que en presencia del inhibidor calcicolina, los niveles basales de la fosforilación de la S25 no se incrementan como sí lo hacen los del ED. Esto indicaría que en condiciones normales la tasa de recambio de la fosforilación en el ED es mucho mayor que la de la S25, fosforilación que parece ser mucho más estable, como lo indican varios resultados expuestos en esta tesis y otros hallazgos del laboratorio.

Nota: Los resultados presentados en este capítulo son parte del artículo publicado Toledo A, Zolessi FR, Arruti C (2013) A Novel Effect of MARCKS Phosphorylation by Activated PKC: The Dephosphorylation of Its Serine 25 in Chick Neuroblasts. PLoS ONE 8(4): e62863.

CAPITULO IV

Modificaciones en la localización de MARCKS y reorganización del citoesqueleto de actina, consecuentes a la activación de PKC en fibroblastos y glía de Müller

Con el objetivo de analizar si la dinámica de MARCKS observada frente a la estimulación con PMA es propia de las neuronas, tal como lo es la fosforilación en la S25, o si responde a un fenómeno general en distintos tipos celulares, estudiamos los eventos que tienen lugar como consecuencia de tratamientos con PMA, en un tipo celular no neuronal de la retina como es la glía de Müller, y en células no neurales, fibroblastos de la dermis, también de embrión de pollo.

RESULTADOS

4.1) Efecto de la estimulación de PKC con PMA en el citoesqueleto de actina en fibroblastos y células de Müller en cultivo.

El ED de MARCKS interactúa con filamentos de actina generando puentes cruzados a nivel cortical de las células, modulando de esta manera la organización del citoesqueleto de actina (Hartwig et al., 1992; Arbuzova et al., 2002). Además, se ha propuesto que esta proteína es capaz de secuestrar PIP₂, el cual es a su vez un importante regulador del citoesqueleto de actina (Laux et al., 2000; Arbuzova et al., 2002). En ambos casos, tanto en la regulación por interacción directa como en la regulación indirecta, la fosforilación del ED por PKC compite negativamente y los inhibe. Sin embargo, excluyendo algunos datos obtenidos en células del sistema inmune, no existen datos en la bibliografía que establezcan claramente la vinculación entre los estados fosforilados de MARCKS y la reorganización del citoesqueleto de actina en células. Considerando estas evidencias, nos propusimos evaluar los efectos que tendría la fosforilación del ED, sobre la organización del citoesqueleto de actina en células diferentes a las neuronas, en donde no pudimos evidenciar alteraciones ostensibles en la organización de los microfilamentos. Elegimos en este caso fibroblastos y células gliales de Müller, células grandes con una morfología completamente diferente a las neuronas, en las que el estudio de la organización del citoesqueleto de actina se ve simplificado a la hora de evaluar cambios pequeños, debido a su gran tamaño. Realizamos entonces, cultivos de fibroblastos de dermis dorsal de embriones de 8 días de desarrollo, mantenidos

3 *div*, así como también cultivos de glía de Müller mantenidos 20 *div* (para asegurar la muerte de la mayoría de los neuroblastos y obtener un cultivo enriquecido en células gliales). En estas condiciones tanto los fibroblastos como las células de Müller tienen morfología similar, son células extendidas de gran tamaño, sin presentar lamelipodios o filopodios en ausencia de estimulación cuando están estacionarias. Las células de Müller, en particular, cuando son mantenidas en cultivo, adquieren una morfología muy distinta a la que tienen en la retina. Son células muy grandes con núcleos de entre 10 y 20 μm de diámetro, lo cual las hace fácilmente distinguibles de los neuroblastos retinianos en cultivo, únicamente basándose en evidencias morfológicas. Estimulamos estos cultivos con PMA 300 nM y 3 μM por tiempos variables como se indica en cada figura y evidenciamos mediante IFI la localización de MARCKS y pED-MARCKS así como la organización de la F-actina, utilizando microscopía confocal. En las células no tratadas, tanto en fibroblastos como en células de Müller, MARCKS se localiza en acúmulos periféricos de membrana localizados en el dominio basal así como en el dominio apical de las células. Llamativamente, en las células de Müller asociadas en colonias, MARCKS se concentra preferentemente en la periferia celular en la zona de contacto célula-célula (figura 46 D, video 3). En los fibroblastos raramente encontramos esta asociación en colonias celulares y por tanto no fue evidente una acumulación similar de MARCKS. Por su parte pED-MARCKS, al igual que lo observado en las neuronas, presentó una señal baja en células no tratadas y se evidenció notoriamente solo luego de la estimulación con PMA. La actina se concentra en cables o gruesas fibras de estrés en las células no tratadas, exhibiendo una distribución similar en fibroblastos y células de Müller (Figuras 46 y 47, video 3).

La estimulación con PMA tanto en las dosis más bajas (300 nM) como en los tiempos más breves utilizados (15 minutos), provocó un incremento marcado en la fosforilación del ED de MARCKS en ambos tipos celulares, tal como fuera observado en la células de la retina (figuras 46 N, R y 47 Q, U). Esta variante fosforilada demostró tener una localización más central respecto a la variante no fosforilada en las situaciones control, acumulándose en el citoplasma de las células especialmente en la región perinuclear, como se puede apreciar claramente en las secciones ortogonales (figura 46 K y R, video 4). De hecho, MARCKS total se concentró, luego de la estimulación con PMA, en la región perinuclear, como se observa en las imágenes de la figura 47, si bien mantuvo, aunque en menor medida, su localización en la periferia de la célula. En algunos casos el tamaño de los acúmulos, sobre todo en la región perinuclear, fue mayor al de los acúmulos periféricos (figura 47 I y M).

PMA provocó importantes cambios de la forma celular, así como el reordenamiento del citoesqueleto de actina en ambos tipos celulares, pero especialmente en la glía de Müller. Mientras que en los controles el citoesqueleto de actina se organiza principalmente en fibras de tensión, en las células tratadas aparecían estructuras periféricas ricas en cables cortos de actina (F-actina marcada con faloidina) similares a lamelipodios pero carentes de los

Figura 46: Redistribución de MARCKS en células de Müller en cultivo tratadas con PMA. Secciones confocales únicas de inmunodetecciones de MARCKS, pED-MARCKS y marcado de F-actina con faloidina. **(A-G)** Células de Müller no tratadas. Se muestran secciones confocales únicas a nivel basal (A-C) y medio (D-F). **(G-T)** Células tratadas con PMA 3 μ M durante 30 minutos. Inmunodetección de MARCKS, pED-MARCKS y actina como se indica en cada imagen. J y Q muestran planos ortogonales de las células de la misma fila. Barras: 10 μ m.

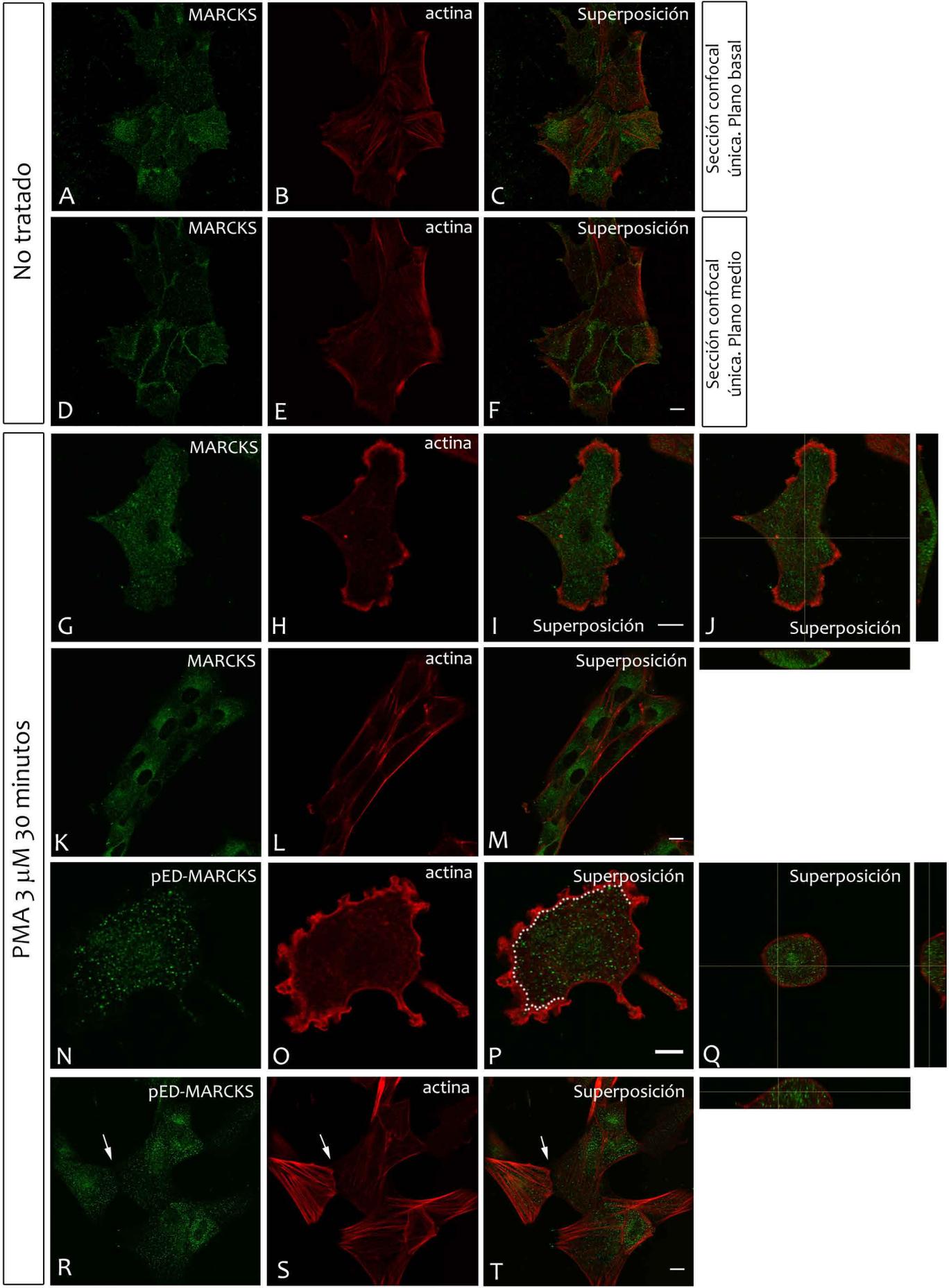
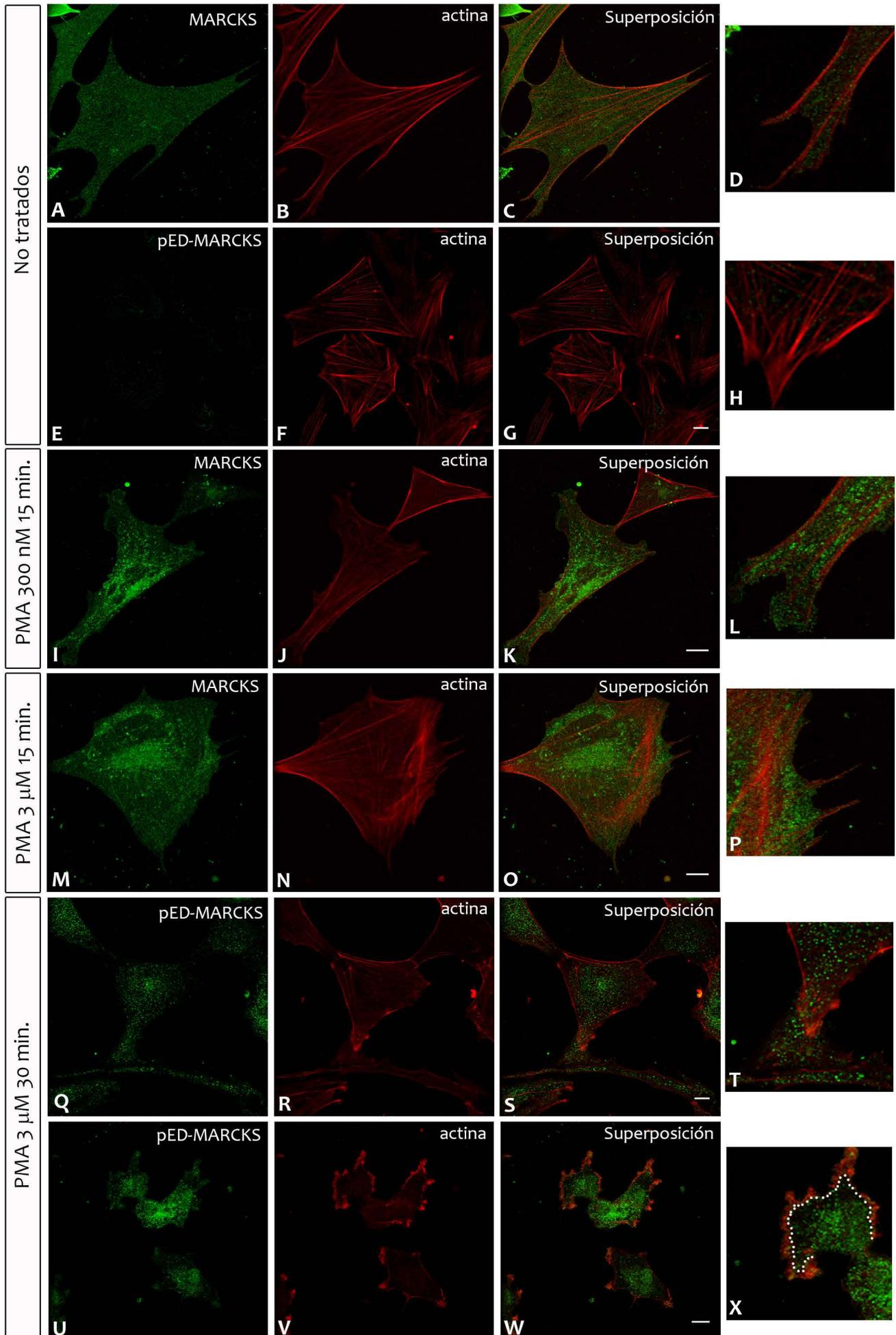


Figura 47: Redistribución de MARCKS en fibroblastos embrionarios en cultivo tratados con PMA. Secciones confocales únicas de inmunodetecciones de MARCKS y marcado de F-actina con faloidina. **(A-H)** Fibroblastos no tratados. **(I-L)** Fibroblastos tratados con PMA 300 nM durante 15 minutos. **(M-P)** Fibroblastos tratados con PMA 3 μ M durante 15 minutos. **(Q-X)** Fibroblastos tratados con PMA 3 μ M durante 30 minutos. D, H, L, P, T y X corresponden a ampliaciones de regiones seleccionadas de la imagen contigua. Barras: 10 μ m.





Video 3: Animación de barridos confocales en el plano z de cultivos de células de Müller de retina neural de E8. En verde se muestra MARCKS y en rojo los filamentos de actina (faloidina-TRITC). Se observan varias células asociadas en una colonia. Los límites celulares son distinguibles por una acumulación de parches de MARCKS. El citoesqueleto de actina se organiza principalmente en gruesos cables de actina.

Video 4: Animación de barridos confocales en el plano z de cultivos de células de Müller de retina neural de E8 tratadas con PMA 3 μM , 30 minutos. En verde se muestra pED-MARCKS y en rojo los filamentos de actina (faloidina-TRITC). Se aprecia la alteración en la forma celular así como una pérdida de los cables de actina, si se compara con las células del video 3. Existe un incremento de la señal de pED-MARCKS que se localiza en parches citosólicos principalmente.

Video 5: Reconstrucción 3D de cultivos de células de Müller de retina neural de E8 tratadas con PMA 3 μM , 30 minutos. En verde se muestra MARCKS y en rojo los filamentos de actina (faloidina-TRITC). Se observa la pérdida de cables de estrés y la aparición de estructuras ricas en actina en la periferia celular, tales como “ruffles” de membrana.

radios de actina característicos de estos últimos (figura 46 H, I, O y S). Esta acumulación de estructuras periféricas de actina fue acompañada de una pérdida de fibras de estrés en el citoplasma de las células. No todas las células tratadas en los cultivos presentaban este fenotipo, en el caso de los fibroblastos muchos de ellos conservaron sus cables de actina inalterados, sin embargo la aparición de células con estructuras altamente dinámicas de actina periférica fue mayor en los tratados que en los controles (figuras 47 U-X). Por su parte, las células de Müller presentaron una mayor frecuencia de células con esta morfología. En el caso de las células asociadas en colonias, fenómeno mucho más frecuente en la glía de Müller, se observa cómo las células de la periferia pierden la organización de sus cables de actina y desarrollan en cambio, estructuras altamente dinámicas de actina en su periferia, al tiempo que las células del interior de la colonia permanecen con los cables de actina estables. En estos cultivos, no se encontraron alteraciones en la organización de otros elementos del citoesqueleto como los microtúbulos (datos no mostrados).

Al analizar en mayor detalle la localización de MARCKS y pED-MARCKS en los cultivos tratados, evidenciamos una disminución de MARCKS total, así como prácticamente la ausencia de pED-MARCKS, en las regiones ricas en actina altamente dinámica, tanto en fibroblastos como en células de Müller (figura 46 P, 47 X y 48, líneas punteadas). Sin embargo, cuando el tratamiento con PMA no provocó cambios sustanciales en el citoesqueleto pero sí en la concentración de MARCKS en la región perinuclear, algunos parches de la proteína se mantuvieron en la cercanía a los cables de actina presentes en los filopodios más delgados de la célula (figura 47 L y P).

Estos resultados indican claramente que además de determinar un importante incremento de la fosforilación en el ED de MARCKS, los tratamientos con PMA sobre fibroblastos y células de Müller, determinan una relocalización de MARCKS hacia la región perinuclear así como una importante reorganización del citoesqueleto de actina.

4.2) Relocalización de MARCKS como consecuencia de su fosforilación por PKC

La reorganización de MARCKS que observáramos en las células tratadas con PMA hacia la región perinuclear, sugirió que podría estar ocurriendo una translocación a organelos o vesículas de membrana de importante concentración en esta región de la célula. En macrófagos en cultivo, se ha demostrado la translocación de MARCKS a los lisosomas luego de su fosforilación por PKC (Thelen et al., 1991). Con el objetivo de determinar a qué región celular tenía lugar la relocalización de MARCKS luego de su fosforilación en el ED, realizamos estimulaciones con PMA y luego inmunolocalizamos MARCKS o pED-MARCKS y marcamos con sondas los lisosomas (Lysotraker), retículo endoplásmico y vesículas (DiOC₆ y DiOC₁₈) (Terasaki et al., 2001).

PMA 3 μ M 30 minutos

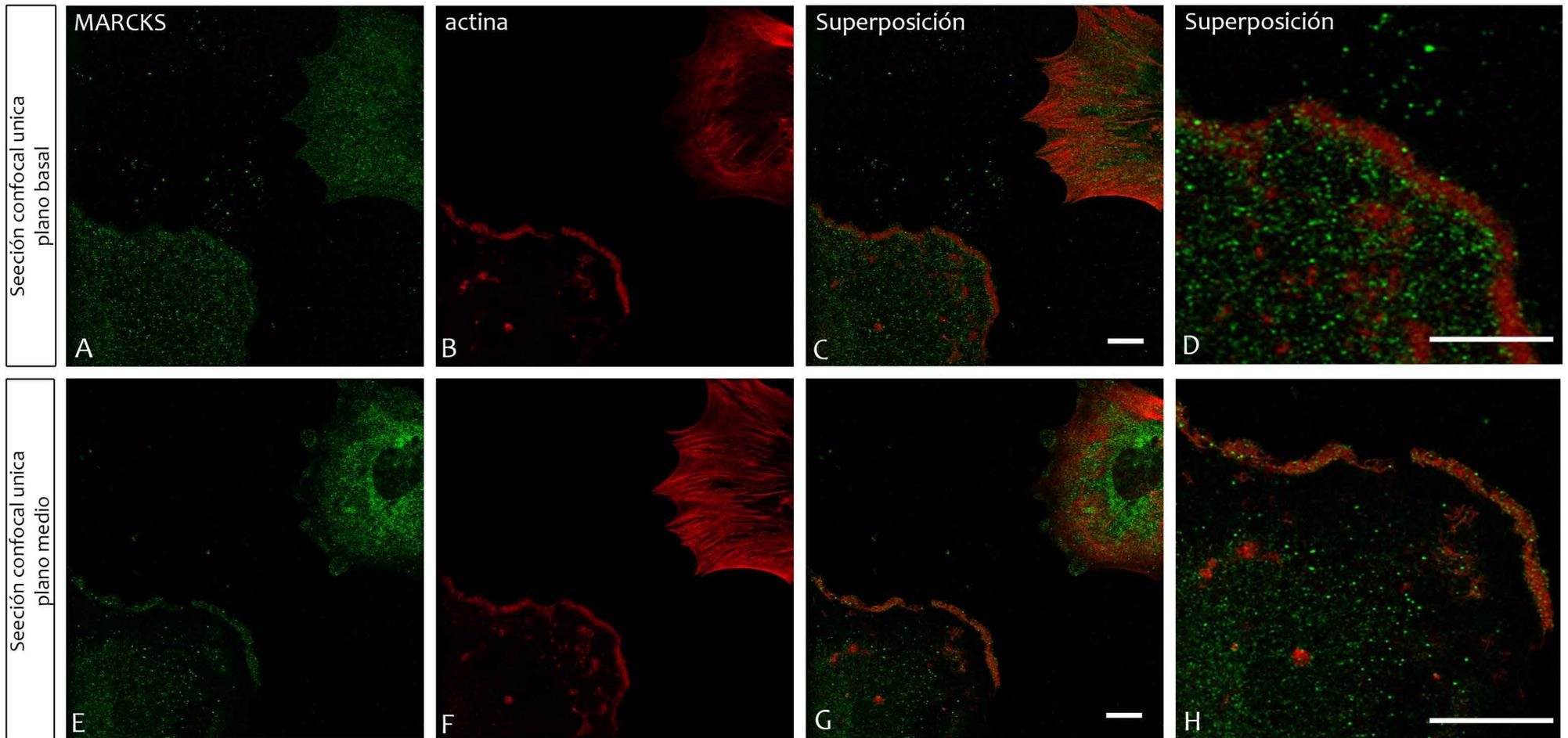
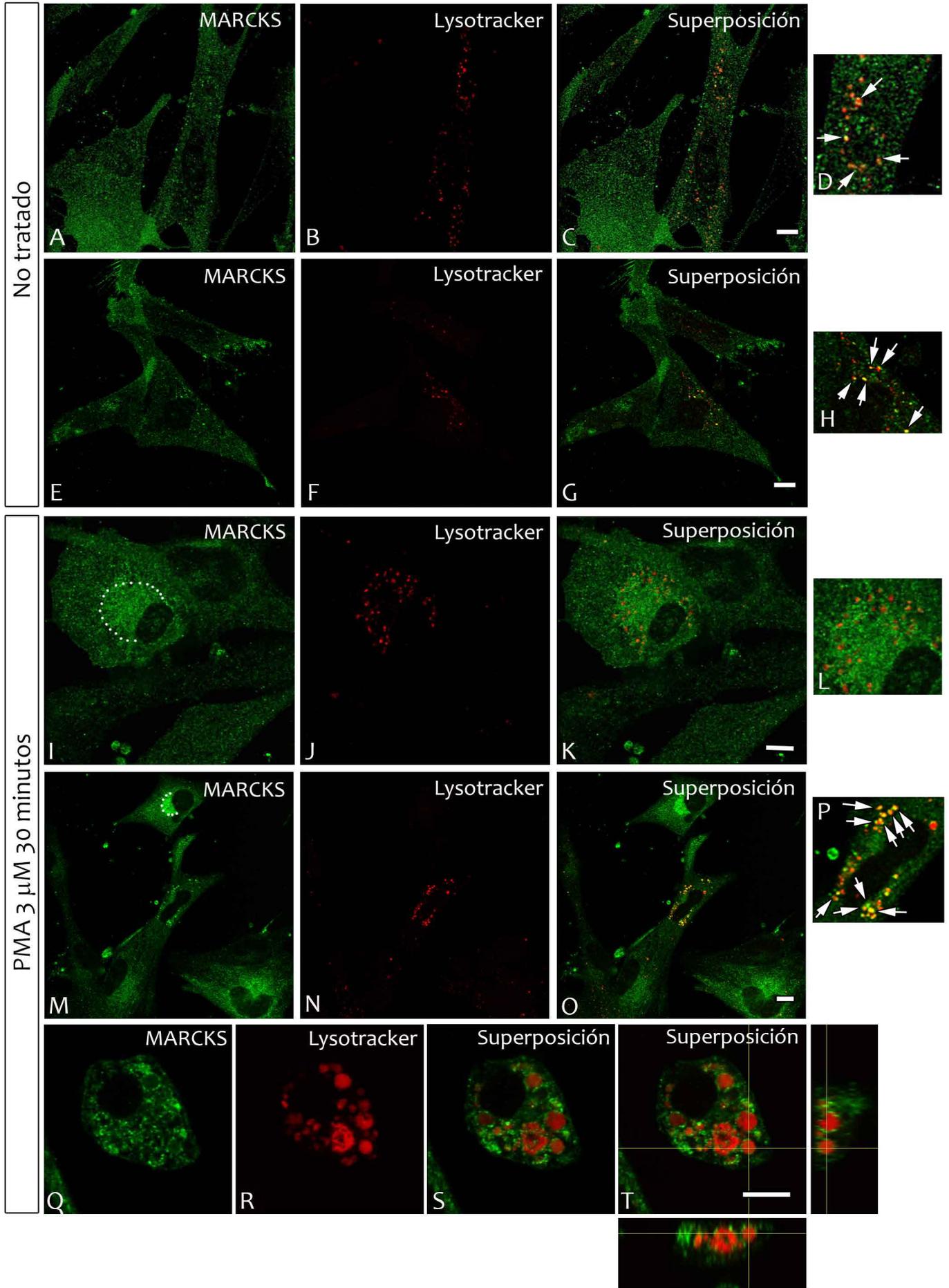


Figura 48: Alteraciones en el citoesqueleto y redistribución de MARCKS en células gliales de Müller tratadas por 30 minutos con PMA 3 μ M. Se muestran imágenes de microscopía confocal, secciones confocales únicas a nivel basal (A-D) o en la zona media de las células (E-H). Se aprecia en el margen inferior derecho una célula con la formación de una región de actina muy dinámica en la periferia producto del tratamiento con PMA. En el margen superior derecho se aprecia una célula sin alteraciones en el citoesqueleto de actina ni en la organización de MARCKS. Las imágenes D y H son ampliaciones de la célula inferior izquierda para apreciar la disminución de MARCKS en la zona de actina dinámica periférica. Barras: 10 μ m

Figura 49: Redistribución de MARCKS en fibroblastos embrionarios en cultivo en relación a compartimientos internos de membrana. Secciones confocales únicas de inmunodetecciones de MARCKS y marcado de lisosomas con LysoTracker. **(A-H)** Fibroblastos no tratados. Las flechas indican puntos de colocalización. **(I-T)** Fibroblastos tratados con PMA 3 μ M durante 30 minutos. **(Q-T)** Imágenes de un fibroblasto apoptótico con importantes vesículas lisosomales y MARCKS en su periferia. A la derecha se presentan secciones ortogonales de la misma célula. Las imágenes D, H, L y P corresponden a ampliaciones de regiones seleccionadas de la imagen contigua. Barras: 10 μ m.



En las células sin tratar, el marcado de los lisosomas mostró variabilidad en cuanto al número y tamaño de vesículas, tanto en fibroblastos como en células de Müller. De todas maneras pudimos distinguir un patrón vesicular en la periferia del núcleo principalmente compuesto por vesículas lisosomales de diferente tamaño. En estas condiciones encontramos algunos acúmulos de MARCKS, únicamente en algunas de las células observadas, asociados a los lisosomas (figura 49 A-H). Luego de los tratamientos con PMA observamos una concentración de MARCKS en la región perinuclear, pero solamente algunos acúmulos de la proteína mostraron colocalización con las vesículas lisosomales, por lo que podemos concluir que la fosforilación de MARCKS en el ED induce en estas células, solo una relocalización parcial de MARCKS hacia estos compartimientos (figura 49 I-P). Únicamente en células con características apoptóticas, encontramos una relocalización de MARCKS casi total hacia la periferia de estas vesículas de gran tamaño (figura 49 Q-T).

Considerando estos resultados que demostraban solamente una translocación parcial, nos preguntamos si cuando MARCKS no se encuentra asociada a vesículas lisosomales, permanece soluble en el citosol de la región perinuclear o se encuentra asociada a otros compartimientos de membrana. Para responder esta pregunta, marcamos células fijadas con las sondas lipofílicas DiOC₆ (no mostrado) y DiOC₁₈, que presentan afinidad por membranas internas, principalmente vesículas de transporte y cisternas del retículo endoplásmico.

En las células sin tratar, las estructuras marcadas con esta sonda se acumulan preferentemente en la periferia del núcleo, en el centro de las células. Por su parte, como mencionáramos, MARCKS se localiza en la periferia celular, superficie basal y apical de la célula, preferentemente; al tiempo que pED-MARCKS es muy escasa, casi ausente de estas células. En esta situación la señal de MARCKS no colocalizó con las estructura DiOC₁₈ positivas (figuras 50 A-D y 51 E-H).

Luego de la estimulación con PMA encontramos que algunos de los parches perinucleares de MARCKS se asocian a la periferia de unas estructuras vesiculares DiOC₁₈ positivas (figuras 50 E-R). También pED-MARCKS se localizó en la periferia de alguna de estas vesículas, indicando una translocación parcial a compartimientos de membrana (figura 52 D-L y 51 Q-T, flechas). Sin embargo encontramos una enorme cantidad de parches no asociados con ninguna de las estructuras identificadas por lo que se podría tratar de MARCKS citosólico. De manera paralela, constatamos que la estimulación con PMA promueve la reorganización de las estructuras internas de membrana DiOC₁₈ positivas en algunas de las células observadas. Mientras que en las células no tratadas estas estructuras se concentraban en la región central de la célula, luego de la estimulación se localizan en un área mayor de superficie, es decir que se extienden en la célula. Esto podría responder al reordenamiento del citoesqueleto que tiene lugar como consecuencia del tratamiento con PMA.

Figura 50: Redistribución de MARCKS en fibroblastos embrionarios en cultivo y su relación con compartimientos internos de membrana. Secciones confocales únicas de inmunodetecciones de MARCKS y marcado de membranas internas con DiOC18 y LysoTracker. **(A-D)** Fibroblastos no tratados. **(E-R)** Fibroblastos tratados con PMA 3 μ M durante 30 minutos. Se muestran diferentes superposiciones como se indica en cada imagen. Las flechas marcan sitios en donde MARCKS se localiza en la periferia de estructuras vesiculares marcadas con LysoTracker o DiOC18. Las imágenes D, H y L corresponden a ampliaciones de regiones seleccionadas de la imagen contigua. Barras: 10 μ m.

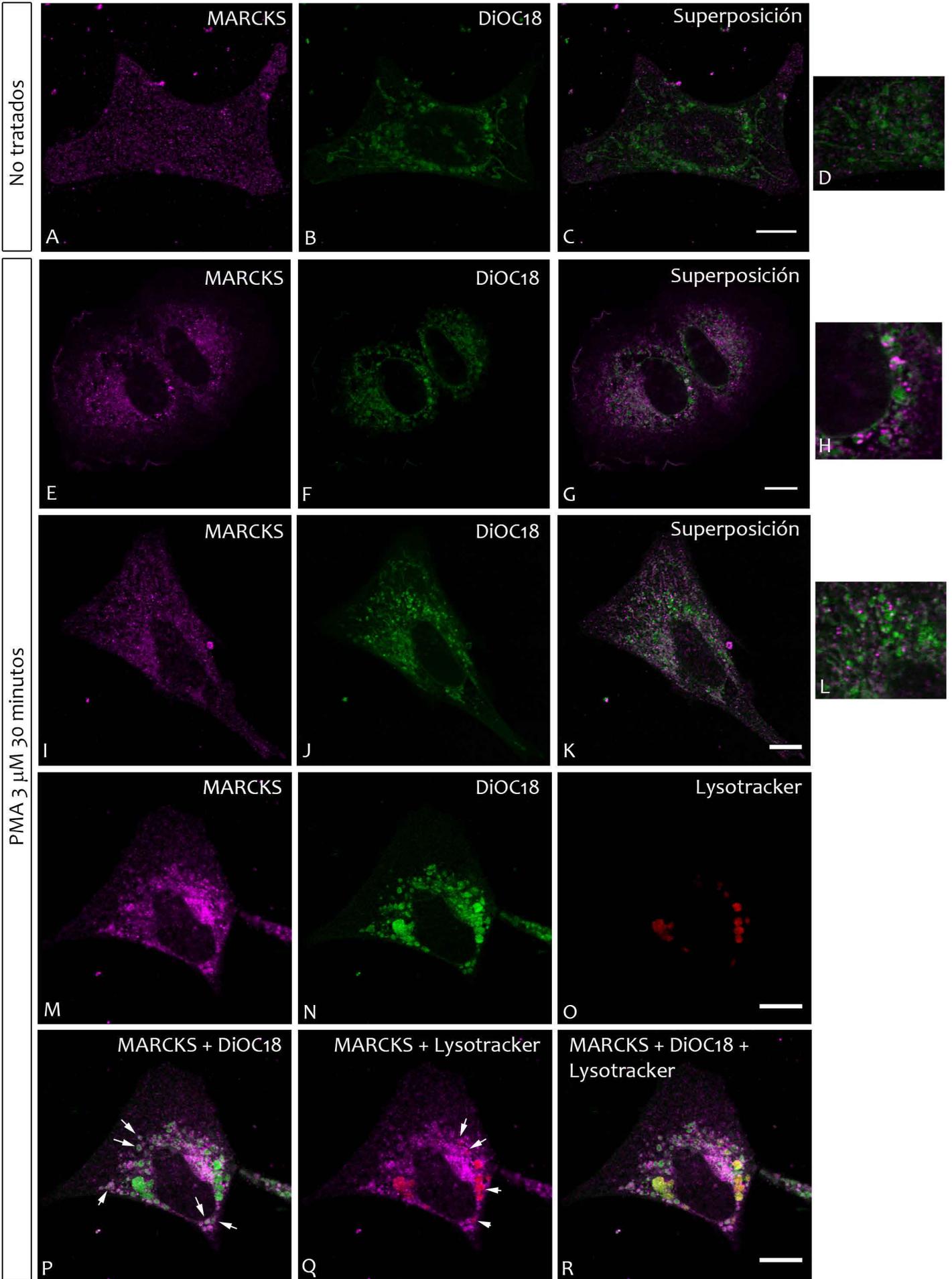


Figura 51: Asociación parcial de MARCKS y pED-MARCKS con lisosomas y sistemas membranosos internos en glía de Müller en cultivo. **(A-L)** Células no tratadas. **(M-X)** Células tratadas con PMA 3 μM 30 minutos. Se muestran secciones confocales únicas de inmunodetecciones de pED-MARCKS, MARCKS y marcado de lisosomas con Lysotracker, sistemas internos de membrana con DiOC₁₈ y ADN con verde metilo. La cuarta columna de fotos corresponde a ampliaciones de las imágenes contiguas. Las flechas indican sitios de colocación de MARCKS o pED-MARCKS con los marcadores utilizados. Barras: 10 μm (A-W), 5 μm (X).

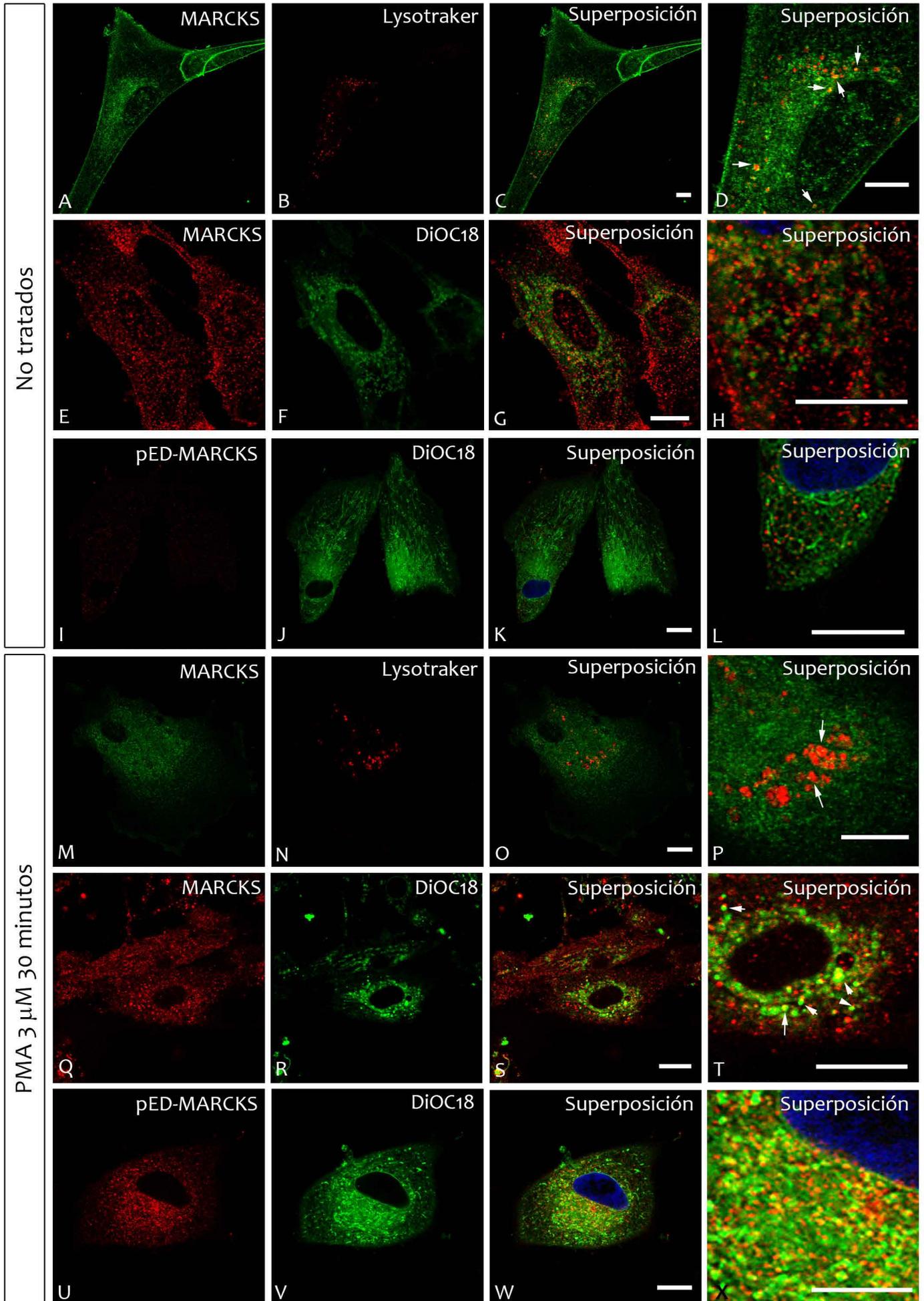
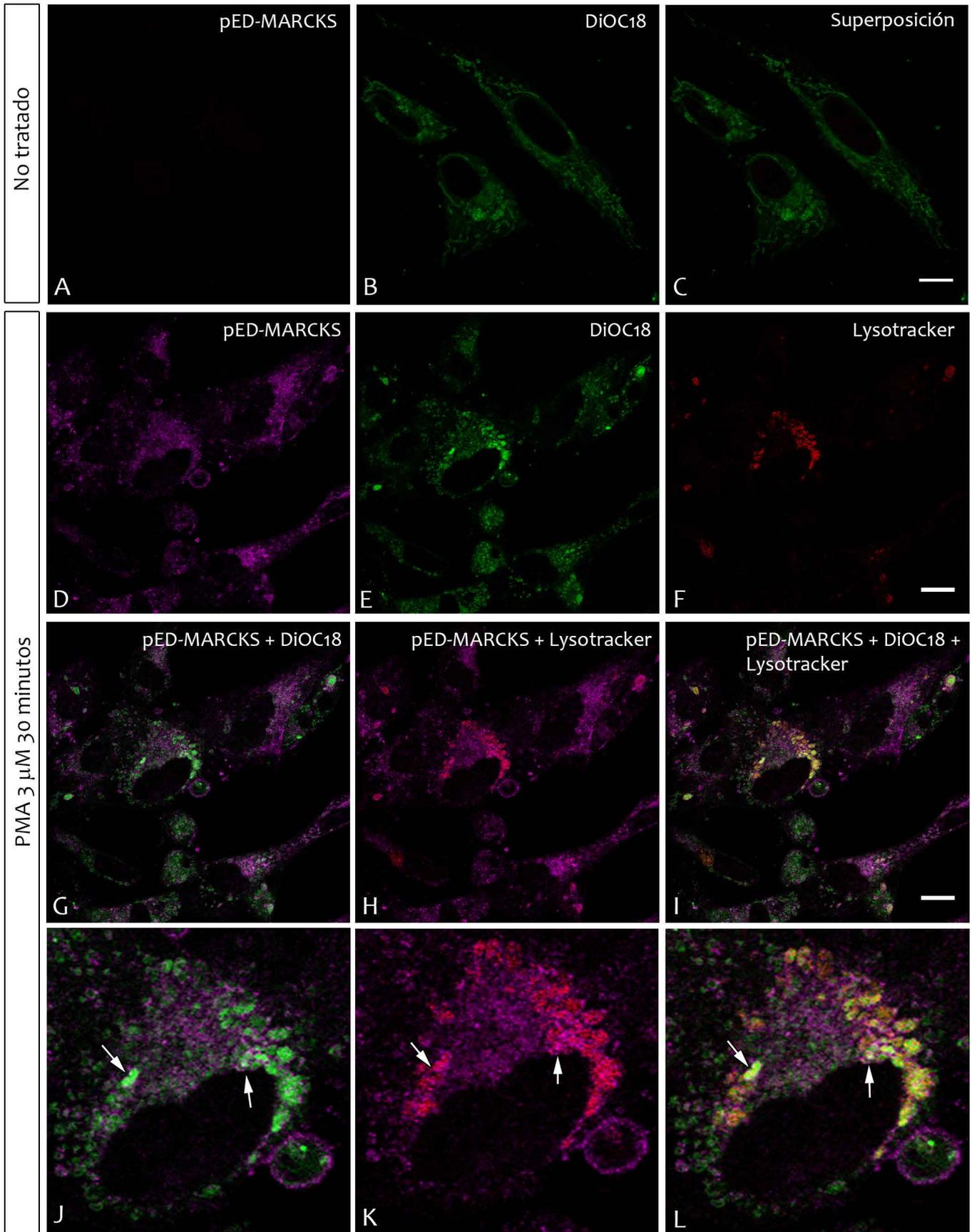


Figura 52: Localización de pED-MARCKS en fibroblastos embrionarios en cultivo en relación a compartimientos internos de membrana. Secciones confocales únicas de inmunodetecciones de pED-MARCKS y marcado de membranas internas con DiOC18 y LysoTracker. **(A-C)** Fibroblastos no tratados. **(D-L)** Fibroblastos tratados con PMA 3 μ M durante 30 minutos. Se muestran diferentes superposiciones como se indica en cada imagen. Las flechas marcan sitios de colocalización Barras: 10 μ m.



Estos resultados sugieren que la fosforilación de MARCKS en el ED promueve su translocación al citosol y su asociación parcial con vesículas tales como lisosomas o vesículas de transporte de diversa naturaleza.

4.3) Reversión de la fosforilación en el ED de MARCKS luego de suprimir la estimulación con PMA.

Analizamos también el curso temporal de la fosforilación y desfosforilación del ED luego de la remoción del PMA. Para ello, al igual que lo realizado en células de la retina, removimos el medio de cultivo de los fibroblastos, realizamos un lavado de 2 minutos con medio sin suero y aplicamos la droga por 1 minuto. Luego de este tiempo removimos el medio de cultivo con la droga, realizamos un lavado de 2 minutos y repusimos el medio con suero. Lisamos las células inmediatamente después de remover la droga, 0, 30, 60, 90, 120 y 190 minutos más tarde y analizamos la cantidad de pED-MARCKS mediante Western-blot (figura 53).

En estos experimentos encontramos que, a diferencia de lo observado en células de la retina, la desfosforilación en el ED decae rápidamente luego de remover el PMA. Una hora después de remover la droga, los niveles de la fosforilación retornaron a los valores basales.

4.4) Comparación de los efectos de la citocalasina D y PMA sobre la citoarquitectura de fibroblastos y células de Müller.

Como mencionáramos en la Introducción, el ED de MARCKS es capaz de interactuar con la membrana plasmática y con los filamentos de actina, de manera no excluyente. En cambio, tanto la fosforilación en el ED por PKC como la interacción con CaCAM promueven su separación de la membrana plasmática y su relocalización en el citosol, así como su separación de los filamentos de actina. En la sección previa describimos cómo la activación de PKC promueve no solamente la fosforilación del ED de MARCKS sino también la reorganización del citoesqueleto de actina (este último evento no es atribuible con estas evidencias únicamente a la fosforilación del ED). Ahora bien, vale preguntarse si la reorganización, o desorganización, del citoesqueleto de actina también promueve la relocalización de MARCKS, desde la periferia al citosol celular. Para contestar esta pregunta realizamos tratamientos con citocalasina D para desensamblar el citoesqueleto de actina de fibroblastos. En el caso de las células de Müller estas demostraron ser sumamente sensibles a los tratamientos con citocalasina D; tiempos hasta 15 veces menores a los utilizados con los fibroblastos provocaron la separación de las células del

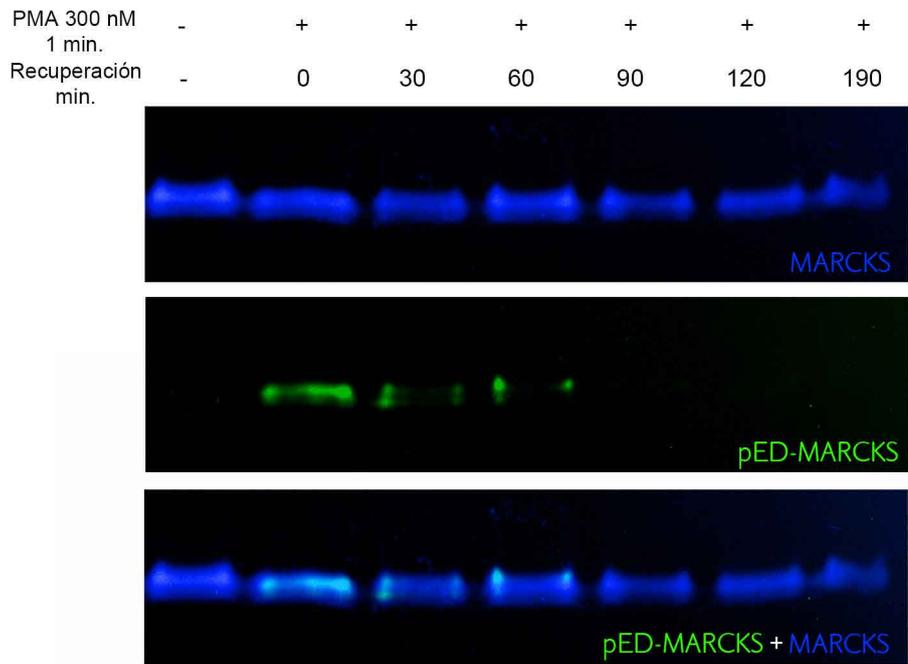
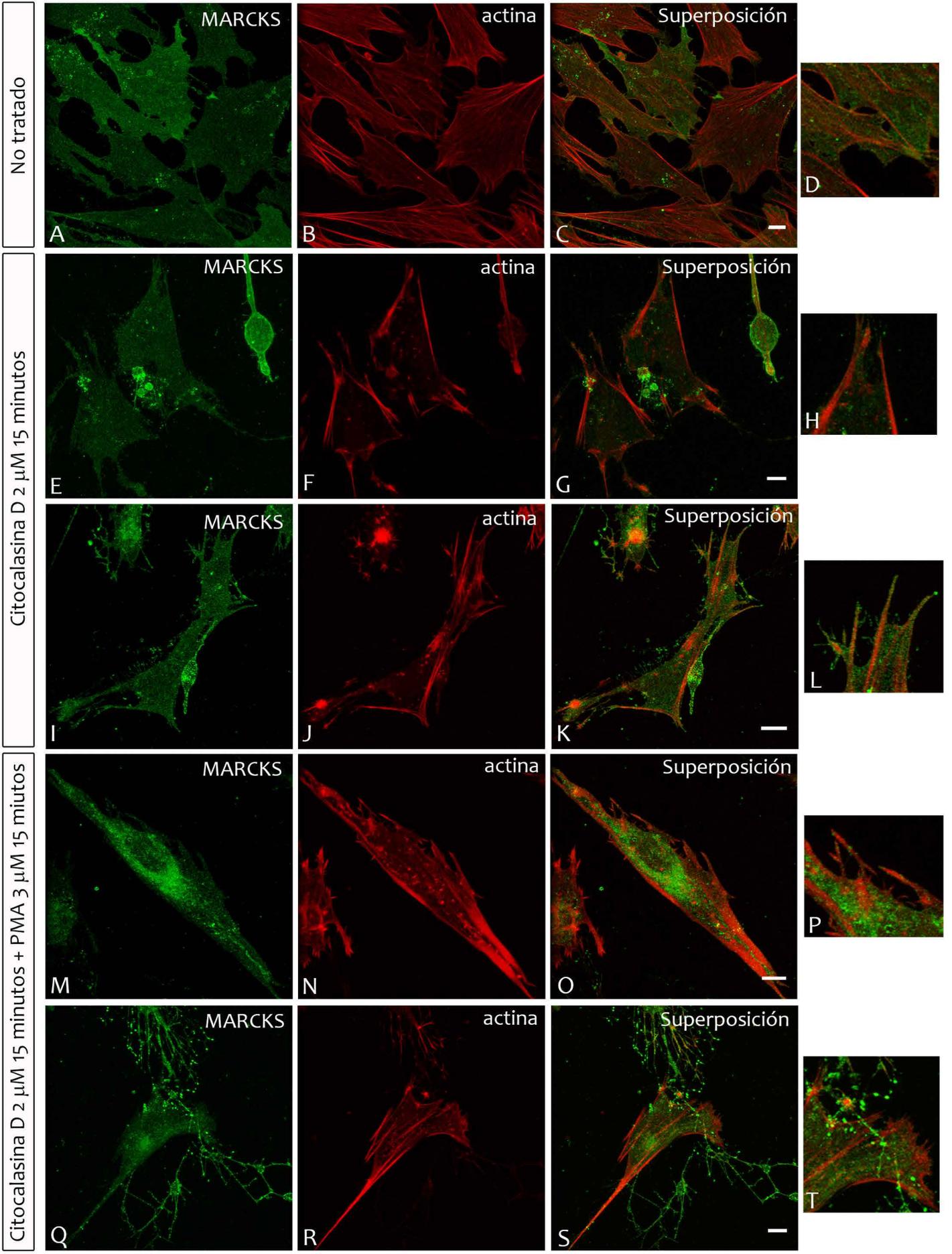


Figura 53: Recuperación de los cultivos de fibroblastos luego de la remoción de la estimulación con PMA. Cultivos de fibroblastos fueron tratados con PMA 300 nM durante 1 minuto en medio de cultivo sin suero, luego la droga fue removida y se restituyó el medio de cultivo con suero. Las células fueron lisadas y analizadas por Western-blot. Se muestran las inmunodetecciones de MARCKS y pED-MARCKS en distintos colores. La superposición de ambas inmunodetecciones se muestra en la última imagen.

Figura 54: Reorganización de la distribución de MARCKS frente a la disrupción del citoesqueleto de actina en fibroblastos embrionarios de pollo en cultivo. Secciones confocales únicas de inmunodetecciones de MARCKS y detecciones de F-actina con faloidina. **(A-D)** Cultivos no tratados. **(E-L)** Cultivos tratados con citocalasina D 2 μM durante 15 minutos. **(M-T)** Cultivos tratados con citocalasina D 2 μM durante 15 minutos y posteriormente con PMA 3 μM durante 15 minutos. La última columna de fotos corresponde a ampliaciones de una región seleccionada de la superposición. Barras: 10 μm .



sustrato y su consiguiente pérdida. Por este motivo elegimos a los fibroblastos para continuar con los experimentos. En estas condiciones, hay una modificación ostensible de la forma celular (arborización), con la aparición de varicosidades y estructuras muy aguzadas en la periferia celular, así como una total pérdida de los cables de actina (figura 54 F y J). En cambio, no observamos alteraciones en los niveles de fosforilación del ED ni tampoco una relocalización evidente de la proteína total, que en estas condiciones permaneció principalmente en la periferia celular. La asociación de MARCKS con la membrana se conservó incluso en zonas de retracción citoplásmica en las que permanecía solo un cable de actina y la membrana plasmática rodeándolo (figura 54 L). Por tanto, pudimos apreciar que la disrupción del citoesqueleto de actina, la pérdida de fibras de estrés o la desorganización del citoesqueleto cortical, no determina modificaciones ostensibles en la localización de MARCKS en los fibroblastos, como si ocurre con la fosforilación en el ED.

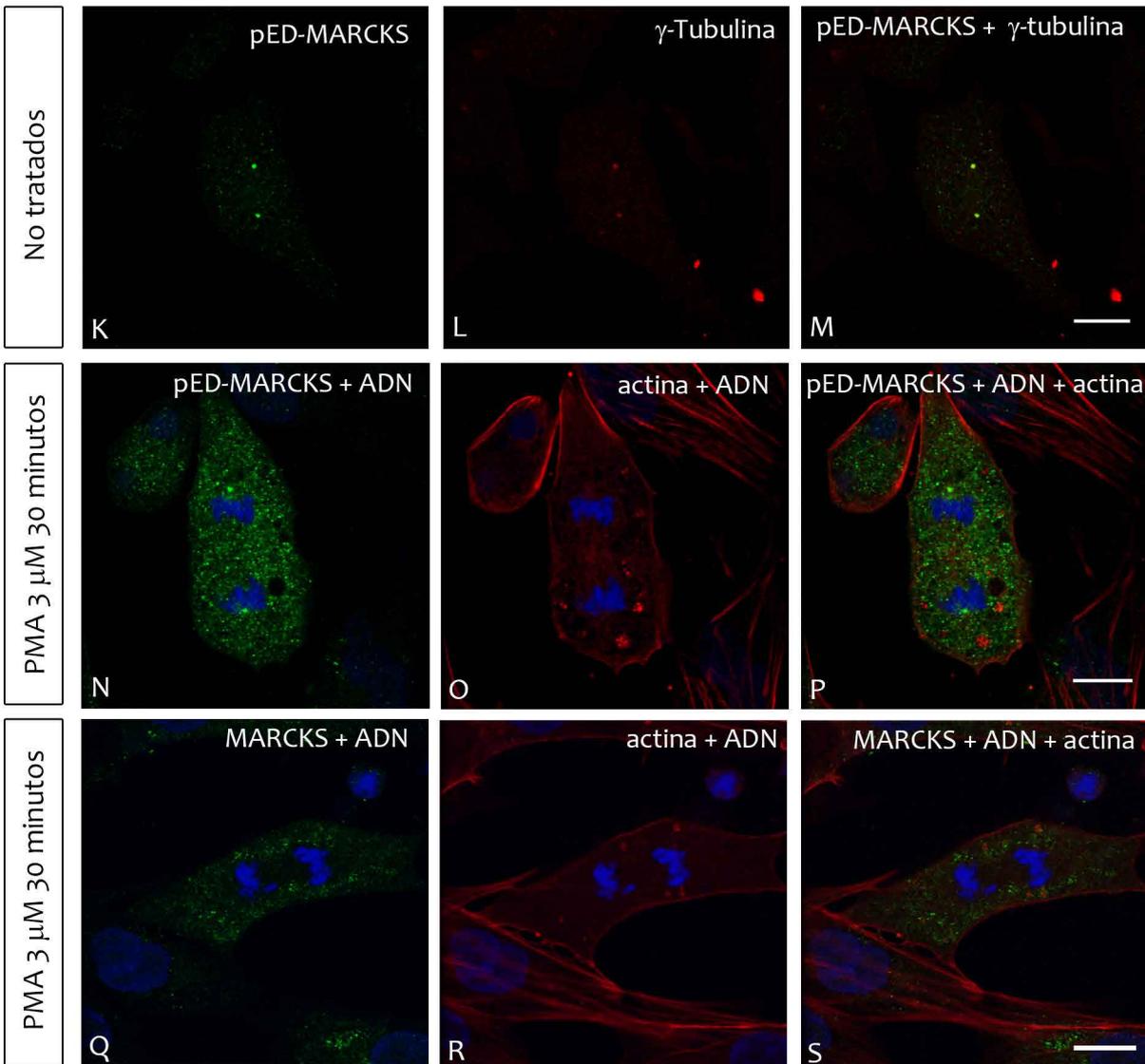
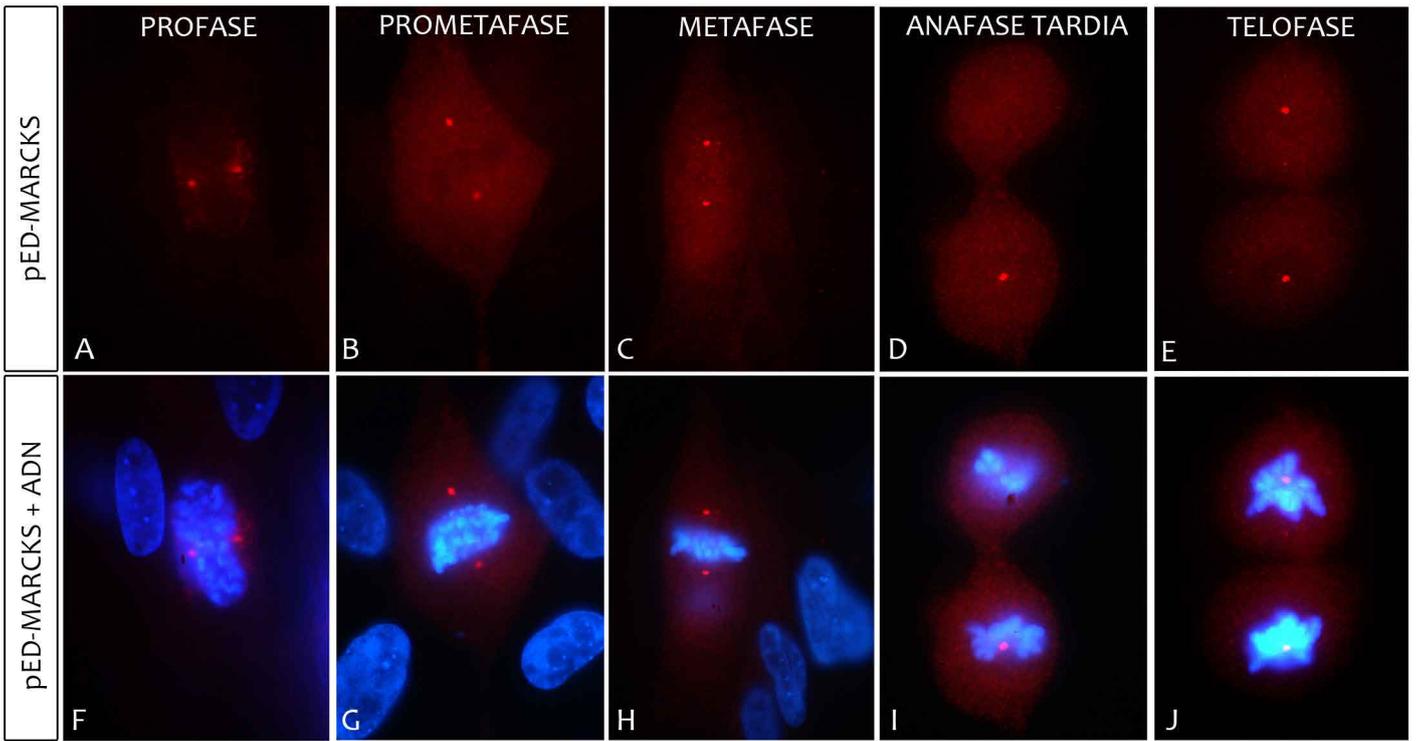
Cuando combinamos los tratamientos con citocalasina y PMA observamos alteraciones en el emplazamiento subcelular de MARCKS relocalizada hacia la región perinuclear, efecto típico de los tratamientos con PMA solo, con su relocalización a la región perinuclear (figura 54 M-T).

4.5) Localización de pED-MARCKS en fibroblastos y células de Müller en mitosis.

Durante los experimentos de estimulación con PMA, nos encontramos con un fenómeno llamativo, tanto en los cultivos no estimulados como en los cultivos tratados con PMA. Durante la mitosis, encontramos un aumento importante de la fosforilación del ED que se localiza en parches citosólicos y se encuentra enriquecido en dos puntos claramente emplazados a un lado del núcleo (en profase temprana) o a ambos lados de los cromosomas en etapas más avanzadas de la mitosis (figura 55 A-J, video 6). Esta asociación la pudimos evidenciar desde etapas tempranas como profase hasta la telofase mitótica. La localización de pED-MARCKS observada durante la mitosis claramente nos sugirió la asociación de esta proteína con los centrosomas. Para confirmar esta conjetura realizamos el marcado de la γ -tubulina, un componente del centrosoma celular. Tanto en los controles como en los tratados no encontramos colocalización de MARCKS o pED-MARCKS con la γ -tubulina durante la interfase (no mostrado). Sin embargo, durante la mitosis existe una clara colocalización de pED-MARCKS con la γ -tubulina. Vale destacar sin embargo que la mayor parte de pED-MARCKS se localiza en el citosol durante la mitosis, y solo una pequeña fracción de la misma se localiza, de manera muy compacta en el centrosoma (figura 55 K-P, video 6). En esta región celular no se detecta actina, la cual se mantiene principalmente en el córtex celular y luego en el anillo contráctil durante la citocinesis (figura 55 N-P). Sin embargo no podemos descartar que la señal del anticuerpo anti-pED-MARCKS, observada en estas inmunodetecciones sea una señal inespecífica

producto de la reacción cruzada del anticuerpo con un antígeno enriquecido en esta etapa del ciclo celular en los centrosomas. No encontramos este enriquecimiento para la proteína total, la cual se presentó principalmente en el citosol de la célula, sin mostrar enriquecimiento perinuclear (figura 55 Q-S, video 7).

Figura 55: Localización de pED-MARCKS en los centrosomas de fibroblastos en mitosis. **(A-J)** Imágenes de epifluorescencia de la inmunodetección de pED-MARCKS y marcado nuclear con Hoechst 33342. Fibroblastos en diferentes etapas de la mitosis, como se indica arriba de cada imagen. **(K-M)** Imágenes de microscopía confocal, secciones confocales únicas de inmunodetección de pED-MARCKS y γ -tubulina como marcador de centrosomas. **(N-P)** Imágenes de microscopía confocal, secciones confocales únicas de inmunodetección de pED-MARCKS, detección de actina con faloidina y ADN con verde metilo en fibroblastos en cultivo tratados con PMA 3 μ M, 30 minutos. **(Q-S)** Imágenes de microscopía confocal, secciones confocales únicas de inmunodetección de MARKCS y detección de actina con faloidina y ADN con Hoechst 33342 en fibroblastos en cultivo tratados con PMA 3 μ M 30 minutos. Barras: 10 μ m.





Video 6: Reconstrucción 3D de cultivos de células de Müller de retina neural de E8. En verde se muestra pED-MARCKS y en rojo los filamentos de actina (faloidina-TRITC). Se muestra una célula mitótica (anafase-telofase) en el centro del campo, en donde hay un incremento importante de pED-MARCKS en el citoplasma celular y un enriquecimiento en los polos del huso mitótico.

Video 7: Reconstrucción 3D de cultivos de células de Müller de retina neural de E8. En verde se muestra MARCKS y en rojo los filamentos de actina (faloidina-TRITC). Se muestra una célula mitótica (anafase-telofase) en el centro del campo. Se observa un incremento en la cantidad de MARCKS en el citosol, si observarse un enriquecimiento en los polos del huso (comparar con video 6).

DISCUSIÓN

En el capítulo III describimos cómo la estimulación de neuroblastos retinianos con PMA provoca la fosforilación de MARCKS en el ED, su consiguiente translocación al citosol y la desfosforilación en la S25. En este capítulo, evaluamos los efectos de la misma estimulación en células embrionarias carentes de la fosforilación en la S25 de MARCKS, como son los fibroblastos y la glía de Müller. Estos tipos celulares nos permitieron además, dada la morfología adoptada en cultivo, el análisis más detallado de la reorganización del citoesqueleto de actina y la asociación de MARCKS con vesículas citosólicas de distinta naturaleza.

- **La estimulación de PKC promueve la reorganización de los microfilamentos en fibroblastos y células de Müller.**

En la literatura pueden encontrarse numerosos ejemplos acerca de los efectos de la estimulación con PMA en diferentes tipos celulares. Se ha postulado que el principal responsable de los cambios observados en la reorganización del citoesqueleto de actina frente a tratamientos con PMA es PKC, aunque se conoce que PMA también estimula a las proteínas quimerinas, reguladoras de GTPasas vinculadas al citoesqueleto (Larsson, 2006). Los efectos de la estimulación son muy variados y responderían, entre otras cosas, al pool de moléculas de señalización, entre ellas PKC la principal molécula estimulada por este activador, que expresa determinado tipo celular al momento del tratamiento (Larsson, 2006). La formación de “ruffles” de membrana y la desaparición de los cables de actina de las fibras de estrés, son cambios provocados por PMA conocidos en distintos tipos celulares, los cuales inducen un aumento de la cinemática celular. Sin embargo, en líneas celulares cancerosas, los efectos de PMA son completamente opuestos reduciendo la motilidad y por tanto la invasividad celular (Yokoyama et al., 1998). En estos tipos celulares, concentraciones del orden de $10^{-7}M$ de PMA son capaces de inducir un pico de actividad de PKC pocos minutos después de la activación y una inhibición total luego de 1 hora de tratamiento. La estimulación promueve una pérdida total de los cables de actina y un reordenamiento de los filamentos de actina en la periferia, similar a lo observado en las células de Müller de embriones de pollo en este trabajo. En nuestro trabajo, no analizamos si este fenotipo promueve una pérdida o estimulación de la movilidad celular, pero comparando nuestros resultados con los de Yokoyama y cols, quienes evidenciaron que el tratamiento con PMA inhibe la motilidad celular en matrigel, sospechamos que estos eventos también pueden tener lugar en las células de Müller. Esta conjetura se sustenta en el hecho de que si bien se observa la formación de estructuras dinámicas de fibras cortas de actina en la periferia, no encontramos estructuras características de

una célula en migración como un gran lamelipodio orientado en un polo de la célula u otras características indicativas de la configuración polarizada de una célula en movimiento.

De manera similar a lo observado en las células de Müller en nuestros experimentos, en células MDCK, las cuales adquieren un fenotipo polarizado en confluencia, MARCKS se concentra en la periferia celular, y la estimulación con PMA promueve su translocación al citosol así como la pérdida de las fibras de estrés (Vääräniemi et al., 1999). En cambio, cuando las células son cultivadas a baja densidad evitando que se formen contactos célula-célula, los tratamientos con PMA promueven el fenómeno opuesto, la extensión de las células y la formación de fibras de estrés, similar a lo que ocurre en linfocitos, células que no establecen contactos intercelulares (Vääräniemi et al., 1999). Estos resultados vinculan la respuesta de la célula a la estimulación con PMA y los contactos inter-celulares. Estos podrían ser comparables a los resultados obtenidos en nuestros experimentos con los fibroblastos, los cuales presentan muy pocos contactos intercelulares y si bien no muestran un incremento en la presencia de actina cortical o de fibras de estrés, prácticamente no muestran alterada su organización del citoesqueleto de actina.

Algunas líneas celulares cancerosas como las B16 F1 o B16 F11 se diferencian únicamente en su capacidad invasiva, y por tanto en su capacidad de migración. Estas expresan la misma cantidad de MARCKS pero en la línea con la mayor invasividad existen mayores niveles de fosforilación de MARCKS en el ED, dada una actividad reducida de la fosfatasa responsable de desfosforilar el ED (Chen y Rotenberg, 2010). La sobreexpresión de la variante mutante en el ED de MARCKS que emula el estado de máxima fosforilación, transforma el fenotipo poco invasivo en un fenotipo altamente invasivo, por tanto la sola presencia de MARCKS es capaz de mediar respuestas celulares tan complejas como la disociación del sustrato y la migración celular. De manera similar, la expresión de una variante no fosforilable en el ED impide los reordenamientos del citoesqueleto que tienen lugar frente a la estimulación por PKC, nuevamente remarcando la importancia de MARCKS en fenómenos de reordenamiento del citoesqueleto frente a la activación de PKC (Morash et al., 2005). Estos resultados podrían sugerir que la activación de PKC que determina el reordenamiento del citoesqueleto, ejerce sus efectos a través de MARCKS, quién sería la principal responsable del fenotipo observado en los cultivos tratados. En apoyo de esta conjetura, se encuentran las evidencias de la desaparición casi total de MARCKS de la zona de actina dinámica que se ensamblan en la periferia celular en nuestros cultivos. Esto podría indicar que la formación de estructuras altamente dinámicas de actina está asociada con la separación de MARCKS de la membrana plasmática. ¿Qué mecanismos podrían mediar la reorganización de los filamentos de actina corticales frente al desplazamiento de MARCKS al citosol? Para intentar explicar este fenómeno debemos recurrir a los dos mecanismos propuestos por los que MARCKS regula la dinámica de actina (Arbuzova et al., 2002). Primero, la presencia de MARCKS asociada

a la membrana permite generar puentes cruzados de actina que aportan rigidez al citoesqueleto cortical. Su separación determinaría la posibilidad de aumentar la flexibilidad del citoesqueleto cortical, posiblemente mediado por la actividad de otras proteínas reguladoras de actina (Uribe y Jay, 2009). Por otro lado, MARCKS jugaría un papel indirecto en la regulación de la dinámica de actina ya que al separarse de los fosfolípidos de membrana haría accesible a PIP_2 para su hidrólisis por PLC. El DAG y el IP_3 generado pueden activar distintas cascadas de señalización intracelular que determinen la reorganización de la actina (Laux et al., 2000; Wang et al., 2001; Yamaguchi et al., 2009).

Nuestros resultados acerca de la cinética de desfosforilación de MARCKS en neuroblastos (descritos en el capítulo anterior) y en fibroblastos (descritos en el presente capítulo) contrastan con los obtenidos por Pena y cols. 1986. Estos autores demuestran que la estimulación de fibroblastos 3T3 con PBT2 (forbol 12,13-dibutirato) provoca un rápido incremento de la fosforilación de una proteína de 80kDa (MARCKS), la cual decae rápidamente (vida media de 2 minutos) luego de la remoción de la estimulación. En nuestros experimentos en fibroblastos, en cambio, encontramos una caída en el nivel de pED-MARCKS a la mitad entre 30 minutos y 1 hora luego de la remoción del PMA, mientras que en los neuroblastos esta caída no tuvo lugar luego de 24 horas de recuperación. Estos resultados indican que la regulación de la dinámica de fosforilación de MARCKS es específica del tipo celular.

- **La fosforilación de MARCKS en el ED promueve su translocación al citoplasma y su asociación parcial con lisosomas y vesículas de membrana.**

Nuestros experimentos de estimulación con PMA demostraron claramente que existe una extensa redistribución de MARCKS desde las regiones periféricas al citoplasma y a organelos presentes en el mismo. Tiempo atrás ya se había demostrado que la estimulación de PKC promueve la fosforilación de ED de MARCKS y su translocación a lisosomas (Allen y Aderem, 1995a), autofagosomas (Kopitar-Jerala y Turk, 2007) y gránulos de secreción (Li et al., 2001). Por otro lado la estimulación con LPS de células epiteliales promueve su translocación al citoplasma en asociación a compartimientos endosomales (marcados con el antígeno EEA1) (Mancek-Keber et al., 2012). Sin embargo, nuestros resultados muestran solo una colocalización parcial de MARCKS con organelos tales como los lisosomas. Pero incluso, a pesar de tratarse de un fenómeno parcial que dista de la translocación total que describen otros autores, es interesante preguntarse qué mecanismo media la translocación específica de MARCKS a estos compartimientos. Hasta el momento no se han expuesto resultados que permitan elaborar una hipótesis al respecto. Algunos trabajos de Spizz y Blackshear demuestran que la cathepsina B (proteasa lisosomal) puede clivar a MARCKS en diferentes sitios. Estos autores proponen que MARCKS tiene un motivo KEE(L,V)Q de translocación al lisosoma, aunque no demuestran claramente su presencia dentro de dichos organelos (Spizz y

Blackshear, 1997). Un mecanismo alternativo propuesto es la translocación a lisosomas basado en un grupo de aminoácidos con carga positiva, similar al mecanismo empleado para la penetración de péptidos a las células, entre ellos los péptidos antimicrobianos (Mancek-Keber et al., 2012). La autofagia también podría jugar un papel en la translocación de MARCKS a los lisosomas si bien su colocalización no ha sido demostrada. Por tanto, son necesarios nuevos experimentos para el completo entendimiento de este fenómeno. Entre ellos, los que permitan establecer si MARCKS se asocia a la cara externa de los lisosomas ya sea por inserción de su ácido mirístico o por interacción electrostática de alguna región de su cadena aminoacídica.

Otro fenómeno interesante que pudimos observar es la reestructuración de organelos con membrana luego de la estimulación con PMA. La estimulación, que como mencionamos más arriba, genera rearrreglos en el citoesqueleto de actina, promueve además, tanto en fibroblastos como en la glía de Müller, un aumento en el área ocupada por los organelos DiOC₁₈ positivos. Mientras que en la mayoría de las células no tratadas se circunscriben a la región perinuclear, en las células estimuladas aparecen ocupando un área mayor. Esto podría estar relacionado a la vinculación entre el citoesqueleto y los complejos de membrana internos. Es conocida la vinculación tanto del retículo endoplásmico como del aparato de Golgi con el sistema microtubular, de hecho tanto la localización como la dinámica y organización en cisternas y sacos de estos organelos depende estrechamente de la organización de los microtúbulos en la célula (Lowe, 2011; de Forges et al., 2012), pero también, aunque en menor medida, dependen de los filamentos de actina (Egea et al., 2006). En oligodendrocitos en cultivo, justamente la estimulación con PMA que promueve un reordenamiento del citoesqueleto de actina provoca una extensión del territorio ocupado por la red trans Golgi (TGN) (Baron et al., 1999).

- **La integridad del citoesqueleto de actina no determina el emplazamiento subcelular de MARCKS.**

La localización y las interacciones de MARCKS a nivel de la membrana, son indudablemente determinantes en su rol fisiológico (Douglas et al., 1997). La interacción de MARCKS con las membranas depende de la interacción electrostática del ED con los fosfolípidos ácidos de membrana y de la inserción del residuo de ácido mirístico aminoterminal (Ramsden, 2000; Arbuzova et al., 2002). Sin embargo, no existen evidencias suficientes que permitan descartar la existencia de otros elementos que determinen su localización en la membrana, más precisamente su concentración en determinadas regiones de la membrana como por ejemplo los sitios de contacto ricos en vinculina y talina (Thelen et al., 1991). En este sentido, otros componentes celulares tales como los filamentos de actina, pueden jugar un rol determinante en el emplazamiento subcelular de MARCKS y por tanto en la regulación de su función. La relevancia de la organización del citoesqueleto de actina en la organización de MARCKS no ha sido explorada en profundidad.

Con el objetivo de aportar evidencias en este aspecto, exploramos los efectos del desensamblaje del citoesqueleto de actina sobre la localización subcelular de MARCKS y su capacidad de respuesta a tratamientos de estimulación con PMA. En estos experimentos tratamos cultivos de fibroblastos y células de Müller con citocalasina D y valoramos la localización de MARCKS mediante IFI. La desorganización del citoesqueleto de actina determinó cambios importantes en la forma celular pero no alteró la organización de MARCKS en agrupamientos asociados a la membrana con una distribución homogénea. Esto sugiere que si bien MARCKS interactúa con la membrana y con los filamentos de actina a través de su ED, el mecanismo responsable de su localización no involucraría a la actina. Incluso fue notoria la conservación de la presencia de MARCKS en regiones de membrana colapsada que rodeaban un cable grueso de actina. En estas mismas regiones, ante un tratamiento con PMA se evidencia la desaparición de MARCKS, lo que indica claramente que el grado de fosforilación del ED es determinante de la localización. En células de glioma murino C6, la disrupción del citoesqueleto determinó un incremento de la interacción de MARCKS con la membrana evaluado mediante fraccionamiento subcelular (Douglas et al., 1997). Este aspecto no fue analizado en nuestros experimentos, pero juzgando por las IFI no existen cambios evidentes en la cantidad ni en la localización de MARCKS en la membrana. Estos autores proponen que la liberación del ED de MARCKS de su interacción con actina, permite tener una interacción más estable con la membrana. Sin embargo, otros autores han mostrado que la interacción con actina no compite con la interacción con la membrana plasmática (Aderem, 1992). Por otra parte, constatamos que la disrupción del citoesqueleto no condicionó o afectó en ninguna manera la respuesta a la estimulación con PMA, observándose el mismo grado de relocalización de MARCKS desde la periferia hacia la región perinuclear y niveles similares, evaluados por IFI, de fosforilación en el ED. Estos resultados nos permiten concluir, además, que la organización del citoesqueleto de actina cortical o las fibras de estrés no alteran el acceso de PKC al ED de MARCKS. Por tanto a partir de estos resultados podemos concluir que la fosforilación de MARCKS en el ED tiene la capacidad de determinar la localización de MARCKS en la membrana, mientras que el citoesqueleto de actina, no. En experimentos realizados en blastómeras de *Xenopus*, se demostró que una variable no mutabilizable de MARCKS se asocia a la membrana pero se transloca al citosol cuando se desensambla el citoesqueleto de actina con citocalasina D (Iioka et al., 2004). Estos resultados están apuntando a un rol, aunque parecería no ser determinante, de la integridad del citoesqueleto de actina cortical en la asociación de MARCKS con la membrana. Tal vez una diferencia importante de estos experimentos con los nuestros, es que la interacción con la membrana en estos experimentos en *Xenopus* solo dependería del ED, tanto mediante su interacción con la membrana plasmática como mediante su asociación con los filamentos de actina. Ante la ausencia del ácido mirístico, la sola interacción con la membrana no es suficiente para mantenerla anclada a la membrana, y necesita de la asociación a la actina cortical. En presencia del ácido mirístico, la interacción con actina podría ser no determinante o secundaria en el

posicionamiento de MARCKS en la membrana. Cabe preguntarse qué ocurre con las moléculas de MARCKS que se encuentran normalmente desmiristoladas en la célula, ¿pueden interactuar con la membrana gracias a la actina?

o **¿Un nuevo rol fisiológico de MARCKS durante la mitosis?**

Los análisis por IFI de la localización de pED-MARCKS en fibroblastos y células de Müller, mostraron claramente que existe una señal muy fuerte para pED-MARCKS, la cual se muestra claramente incrementada en células mitóticas sin estimular con PMA. Además, encontramos una clara acumulación de pED-MARCKS en los centrosomas, aunque no evidenciamos este enriquecimiento de MARCKS en las mismas regiones. Mientras que MARCKS total presenta una distribución extensa en el citoplasma de la célula, incluyendo los cromosomas, pED-MARCKS presenta también una distribución en todo el citoplasma celular y una clara acumulación a nivel de los centrosomas. Estos fueron identificados por la presencia de γ -tubulina, lo que indica de manera inequívoca la concentración de pED-MARCKS en los centrosomas. Esta localización se mantuvo a lo largo de todo el proceso mitótico, desde la profase hasta la telofase. La identidad de pED-MARCKS en esta región particular de la célula debe ser confirmada por otros métodos, como por ejemplo al separar mediante citometría de flujo las células en mitosis, o mediante un tratamiento que detenga a las células en cultivo que se encuentran en esta etapa del ciclo, para su posterior análisis por Western-blot.

En ovocitos de ratón se encontró un enriquecimiento similar de pED-MARCKS en regiones ricas en γ -tubulina y pericentrina, dos marcadores de centrosomas (Michaut et al., 2005). La concentración de pED-MARCKS en esta región puede indicar que aquí se concentra alguna de las PKCs capaces de fosforilar a MARCKS. Resulta más difícil imaginar un escenario en el que la fosforilación de MARCKS en la membrana plasmática determine su translocación particular al centrosoma. En ovocitos de ratón, varias PKC se localizan en el huso mitótico, pero llamativamente solo PKC ζ activa está presente en los polos del huso (Baluch et al., 2004), mientras que en células de linaje eritroleucémico (MEL) PKC θ presentó una translocación masiva hacia los polos del huso mitótico durante la mitosis (Passalacqua et al., 1999). Mediante inmunodetecciones *in situ* podríamos identificar la PKC que localiza en los centrosomas en las células de Müller y fibroblastos embrionarios de pollo y eventualmente inhibir su actividad mediante el uso de fármacos específicos. Pero, ¿qué papel juega PKC en el centrosoma? Se ha demostrado que la presencia de PKC β II y su interacción con la proteína organizadora del centrosoma, pericentrina, es vital para el normal anclaje de los microtúbulos y la formación del huso mitótico (Chen et al., 2004). Por otro lado, existen varias moléculas responsables de la regulación de la dinámica de los microtúbulos que son blanco de PKC (Volkov et al., 2001; Nakhost et al., 2002). Sin embargo, no existen evidencias sólidas que

vinculen a MARCKS con los microtúbulos o moléculas vinculadas al anclaje de microtúbulos en los centros de organización de microtúbulos (MTOCs) como el centrosoma. La ausencia de actina en dichas estructuras además torna difícil la especulación acerca de las posibles funciones de MARCKS en este lugar, al menos con los datos disponibles hasta el momento. Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se publicó un artículo que claramente demuestra cómo la reducción transitoria de la expresión de MARCKS en células hepáticas estrelladas determina una deslocalización de la γ -tubulina y de la quinasa Aurora-B, descondensación de los cromosomas, así como un enlentecimiento en la progresión de la mitosis, sugiriendo un rol regulatorio de MARCKS en este proceso (Rombouts et al., 2012). Si bien no se propone un mecanismo, los autores sugieren que la fosforilación de MARCKS constituiría un mecanismo de coordinación de la modulación fina de la dinámica de microfilamentos y microtúbulos. El hallazgo de un enriquecimiento similar de pED-MARCKS en centrosomas de otros tipos celulares refuerza estas evidencias y sugieren que es un fenómeno general y no se encuentra restringido a un tipo celular.

Considerando en conjunto los resultados obtenidos luego de estimular PKC con PMA en neuroblastos, fibroblastos y células de Müller, encontramos que claramente la respuesta tiene una estrecha relación con el tipo celular estimulado. Tanto en lo que refiere a cambios en la forma celular, la reorganización del citoesqueleto, o el destino de las moléculas de MARCKS translocadas al citosol, se encontraron variaciones en los tres tipos celulares analizados. Esto puede responder a varios factores, entre ellos diferencias en el pool de moléculas de PKC así como de proteínas participantes en diferentes cascadas de señalización, presentes en cada tipo celular. Sin embargo, no podemos descartar en este punto que siendo MARCKS el principal sustrato de PKC en las células, las diferencias observadas se deban a distintos eventos de regulación postraduccional de la que MARCKS es sujeto en estos tipos celulares. Es decir, la combinatoria de distintas fosforilaciones puede resultar en diferentes respuestas celulares frente a una misma estimulación. Aquí solamente consideramos la presencia de una fosforilación presente únicamente en neuroblastos, como es la fosforilación en la S25, pero es conocida la presencia de varias fosforilaciones cuyos moduladores de la actividad de MARCKS no han sido estudiadas hasta el presente. Por este motivo, consideramos que un análisis comparativo más profundo de la coexistencia de diferentes variantes fosforiladas de MARCKS en estos tipos celulares, podrían aportar más información a este complejo fenómeno de regulación postraduccional de la actividad de esta proteína naturalmente desplegada.

APENDICE I: Generación de un anticuerpo policlonal anti-MARCKS

Para generar el anticuerpo policlonal de conejo Polo 52 que nos permitió detectar a la proteína MARCKS de pollo, se generó la proteína recombinante para inmunizar conejos. La proteína completa fue generada acoplada a un tag de Histidina. Para ello, la secuencia completa de MARCKS obtenida del plásmido pBC12/pCMV-60k, generosamente cedido por el Dr. P. Blackshear, fue subclonada en el vector de expresión pET 28b. Este plásmido fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* de la cepa HMS 174. Luego de su crecimiento las bacterias fueron lisadas por métodos estándar y 1,5-2mg de la proteína recombinante fueron purificados por afinidad utilizando una columna HisTrap HP5 (GE Healthcare, USA). Este procedimiento fue realizado por la Unidad de Proteínas Recombinantes del Instituto Pasteur de Montevideo (<https://www.pasteur.edu.uy/upr>).

MARCKS recombinante obtenida por el proceso antes descrito, fue utilizada para producir un suero anti-MARCKS mediante protocolos clásicos de inmunización. Brevemente, un conejo fue inmunizado con varias inyecciones intradérmicas utilizando un total de 500µg de MARCKS en adyuvante de Freund, seguido de dos reinoculaciones de 300 µg de MARCKS en inyecciones intramusculares luego de 30 y 54 días de la primera inmunización. El sangrado para la obtención del anticuerpo se realizó en el día 65. El anticuerpo fue producido en el Servicio de Biotecnología del Polo Biotecnológico de Pando, Universidad de la República (<http://www.polotecnologico.fq.edu.uy/>).

Caracterizamos en nuestro laboratorio el anticuerpo producido, para lo cual realizamos Western-blots de muestras de retina embrionaria de pollo de E12, separadas en SDS-PAGE (gel de separación de acrilamida al 10%) y electrotransferidas a una membranas de nitrocelulosa (figura 56). Detectamos a MARCKS utilizando anticuerpos de inmunoreactividad conocida: Acm 3C3, Mct y Martin D202D87, y lo comparamos con la inmunoreactividad del anticuerpo generado, denominado Polo 52. El anticuerpo generado detecta una banda de peso molecular relativo de 72 kDa aproximadamente. La migración relativa es similar a las de las bandas detectadas por los otros anticuerpos. MARCKS se caracteriza por presentar una migración anómala presentando un peso molecular aparente mayor al real, y además migra de forma difusa generando una banda gruesa. Todas estas características fueron evidenciadas con el anticuerpo Polo 52.

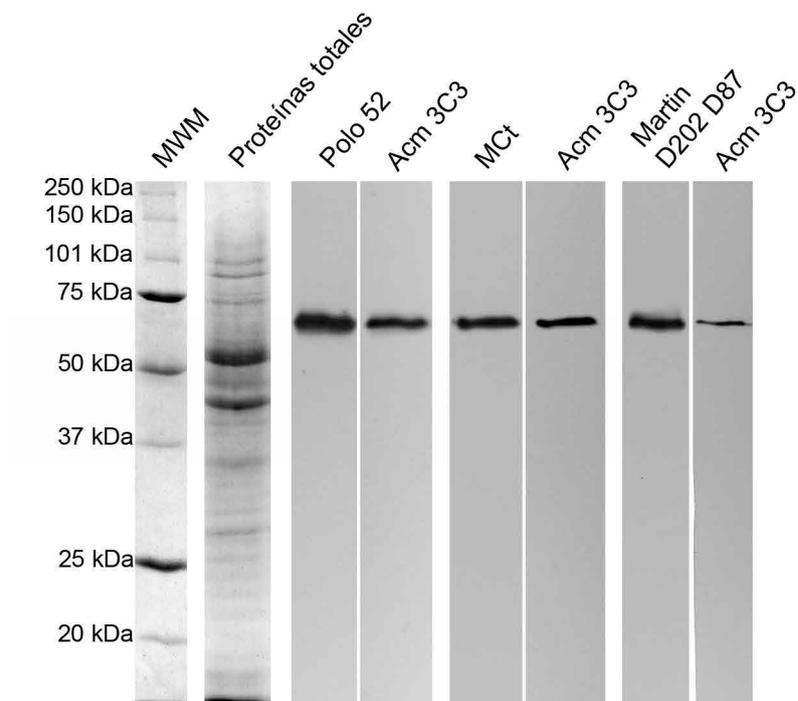


Figura 56: Caracterización mediante Western-blot de la inmunoreactividad del anticuerpo policlonal Polo 52. 10 μ g de proteínas de muestras de retina embrionaria de pollo de E12 fueron separadas mediante SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Se muestra el perfil de proteínas totales de la muestra teñidas con Ponceau S y las inmunodetecciones secuenciales utilizando el anticuerpo Polo 52 y otros anticuerpos que también detectan la proteína MARCKS (Acm 3C3, Mct, Martin D202D87). Observar que el anticuerpo Polo 52 solo detecta una banda de aproximadamente 70 kDa al igual que los otros anticuerpos utilizados como control.

APENDICE II: Transducción de neuroblastos retinianos con HSV-1

Dentro de los objetivos originales de este trabajo se encontraba la sobreexpresión de MARCKS y de variantes mutantes de MARCKS en la serina 25. Con este fin, generamos vectores herpéticos basados en el virus del herpes simplex tipo I (HSV-1) para su uso en la transducción de cultivos primarios de células de la retina embrionaria de pollo. Lamentablemente la sobreexpresión de MARCKS por este sistema en los neuroblastos en cultivo resultó tóxico para las células. No obstante consideramos que la aproximación técnica empleada podría ser de utilidad para responder preguntas en el campo de la neurociencia. Por este motivo, desarrollamos aquí el procedimiento empleado. Esta parte del trabajo fue realizada con la colaboración de Mabel Berois, Andrea Blanc y Lorena Tomé de la Sección Virología de la Facultad de Ciencias.

La expresión de proteínas exógenas en cultivos primarios, y en particular en cultivos primarios neuronales, presenta un número importante de desventajas y limitaciones, entre ellos la alta tasa de variabilidad en el porcentaje de células transfectadas y la mortalidad de los métodos clásicos basados en fosfato de calcio o liposomas catiónicos (lipofección). Sin embargo los métodos de transducción han sido perfeccionados para su uso tanto *in vivo*, como en cultivos primarios. Varios vectores virales basados en adenovirus, herpes virus y lentivirus han sido utilizados con este fin (Jerusalinsky et al., 2012). El virus HSV-1 pertenece a la familia Herpesviridae. Contiene un genoma en forma de ADN lineal, de aproximadamente 152kb que codifica 80 proteínas virales (Jacobs et al., 1999). El ciclo de vida del HSV-1 dura de 18 a 20 horas y comprende: reconocimiento de proteínas de superficie del virus por receptores celulares, fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula, liberación de la cápside en el citosol, transporte a través de microtúbulos hacia los poros nucleares, liberación y circularización del genoma viral dentro del núcleo, transcripción de genes virales, traducción de proteínas virales, ensamblaje de los viriones y por último, salida de la célula de las partículas maduras (Jacobs et al., 1999). El genoma del virus no se integra al genoma del huésped por lo que no existe riesgo de afectar funciones del huésped por mutagénesis insercional (Vicario y Schimmang, 2003).

En particular, la transducción basada en HSV-1 con el sistema amplicón, utiliza vectores que contienen solo el 1% del genoma viral, son defectivos en su replicación y por tanto necesitan de un virus “helper”. Estos vectores presentan secuencias no codificantes del HSV-1: la secuencia de origen de replicación (*ori*) y la de encapsidación (*pac*). Estas dos secuencias son suficientes para soportar la replicación del amplicón y la encapsidación de los productos de replicación de tipo concatémero en viriones, pero requieren para ello la colaboración de virus “helper”. Estos virus helper presentan la capacidad de encapsidar los concatémeros pero son defectivos en su replicación, aunque son capaces de aportar todas las proteínas estructurales del virus (Fraefel, 2002; Fraefel et al.,

componentes de la partícula viral pero su genoma no puede ser encapsidado, pEBH-CIP27 aporta un componente básico de la capside y el amplicón presenta la estructura indicada en la imagen 57, es decir que contiene el o los genes de interés y promotores virales tipo HSV y la secuencia de encapsidación.

Para la cosecha de las partículas virales, las células fueron sonicadas y centrifugadas para descartar los restos celulares, a 3500 rpm por 10 minutos. Las partículas fueron concentradas por ultracentrifugación 3 horas a 20.000 rpm sobre un colchón de sacarosa al 25% en HBSS. El pellet de partículas virales se resuspendió en 100 μ l de HBSS y se procedió a su titulación en células Vero 2.2 antes de utilizarlas en los cultivos de retina.

ii.3 Transducción de cultivos neuronales

Se realizaron cultivos de retina neural de embriones de 8 días de desarrollo (ver Materiales y Métodos) sobre laminillas previamente tratadas con poliomitina. Cultivamos aproximadamente 1×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos y sembramos 5 μ l de partículas virales HSV-MARCKS-IRES-EGFP (4×10^5 UT/ml) o HSV-IRES-EGFP (7×10^5 UT/ml). Extrajimos laminillas a las 3, 6, 9 y 24 horas de tratamiento, fijamos las células y las observamos al microscopio de fluorescencia. Las células transducidas con HSV-IRES-EGFP (control) no mostraban sufrimiento celular ni se evidenciaron efectos tóxicos. Aproximadamente 20 células por campo presentaban fluorescencia que se extendía tanto en el soma como en las prolongaciones, incluso alcanzando conos de crecimiento y filopodios (Figura 59). Lamentablemente las células transducidas con HSV-MARCKS-IRES-EGFP presentaban muy bajos niveles de fluorescencia y mostraban un fenotipo apoptótico con núcleo picnótico, para todos los tratamientos realizados. Las neuronas transducidas no presentaban prácticamente crecimiento neurítico indicando un claro sufrimiento celular inducido por la sobreexpresión de MARCKS.

ii.4 Transducción de una línea celular de glioma.

Para determinar si este efecto apoptótico es particular del tipo celular neuronal, o si en cambio, nuestra construcción induce apoptosis en distintos tipos celulares por alguna causa desconocida, realizamos el mismo protocolo de transducción sobre una línea celular de glioblastoma humano (Gli36) (Kashima et al., 1995). En estos casos observamos el mismo efecto que sobre los neuroblastos, hubo un descenso en la intensidad de fluorescencia de EGFP y un menor número de células transducidas respecto a los controles (HSV-IRES-EGFP). Por otro lado, pudimos determinar mediante inmunodetección con un anticuerpo específico para MARCKS de pollo, que las células transducidas expresaban MARCKS de pollo y que la misma se acumulaba en acúmulos citoplasmáticos irregulares sugiriendo la formación de agregados (Figura 60).

ii. 5 Consideraciones finales.

A la fecha, varios trabajos han demostrado la transducción de neuronas con diferentes proteínas. Por ejemplo este sistema fue utilizado con éxito para sobreexpresar FGF2 en células madre de manera de inducir su diferenciación hacia el linaje neuronal y los resultados son mejores al tratamiento con FGF2 recombinante soluble (Vicario y Schimmang, 2003). Actualmente este tipo de aproximaciones presenta un alcance mayor ya que se están empleando estas construcciones en terapia génica para tratar enfermedades del sistema nervioso tanto genéticas como neurodegenerativas, así como en neuroprotección (Jerusalinsky et al., 2012).

Teniendo estos antecedentes en cuenta, intentamos abordar la problemática de la transfección de cultivos primarios, utilizando esta aproximación experimental. Las células retina neural embrionaria en cultivo mostraron ser fácilmente transducibles con la construcción que contenía únicamente EGFP. Sin embargo, la sobreexpresión de MARCKS determinó la apoptosis de este tipo celular demostrando que esta aproximación, en estas condiciones, no es útil para nuestros fines. Este efecto no deseado podría deberse a la formación de acúmulos citoplasmáticos de la proteína. Recordemos que la construcción tiene aproximadamente 7500 pb y que el sistema de replicación del virus copia dicha construcción hasta completar las 150.000 pb del genoma viral, es decir aproximadamente 20 copias de MARCKS, que a su vez están reguladas por promotores virales fuertes como HSV-1 IE4/5. Teniendo en cuenta esta hipótesis, las alternativas pueden ser colocar promotores más débiles o inducibles, o introducir ADN chatarra en la construcción de manera de reducir en número de copias de MARCKS disponibles para la transducción en la célula. Este tipo de construcciones permite además la inserción de secuencias promotoras que modulen la cantidad o el momento en el cual se da la expresión del gen de interés, contribuyendo de esta manera a la versatilidad del sistema (Vicario y Schimmang, 2003).

No obstante y a pesar de los resultados negativos relativos a nuestro objetivo inicial, consideramos que este sistema constituye una herramienta sumamente interesante para la expresión de proteínas exógenas en cultivos primarios. Más aun, como lo muestran las imágenes de las figuras 59 y 61, la expresión de proteína fluorescente en neuronas es de suma utilidad para abordar problemas que involucren análisis estructurales de la neurona, ya sea durante el desarrollo o como respuesta a diferentes tratamientos. La expresión de EGFP permite individualizar neuronas y analizar detalles muy finos de la morfología de los arboles dendríticos y las terminales axónicas.

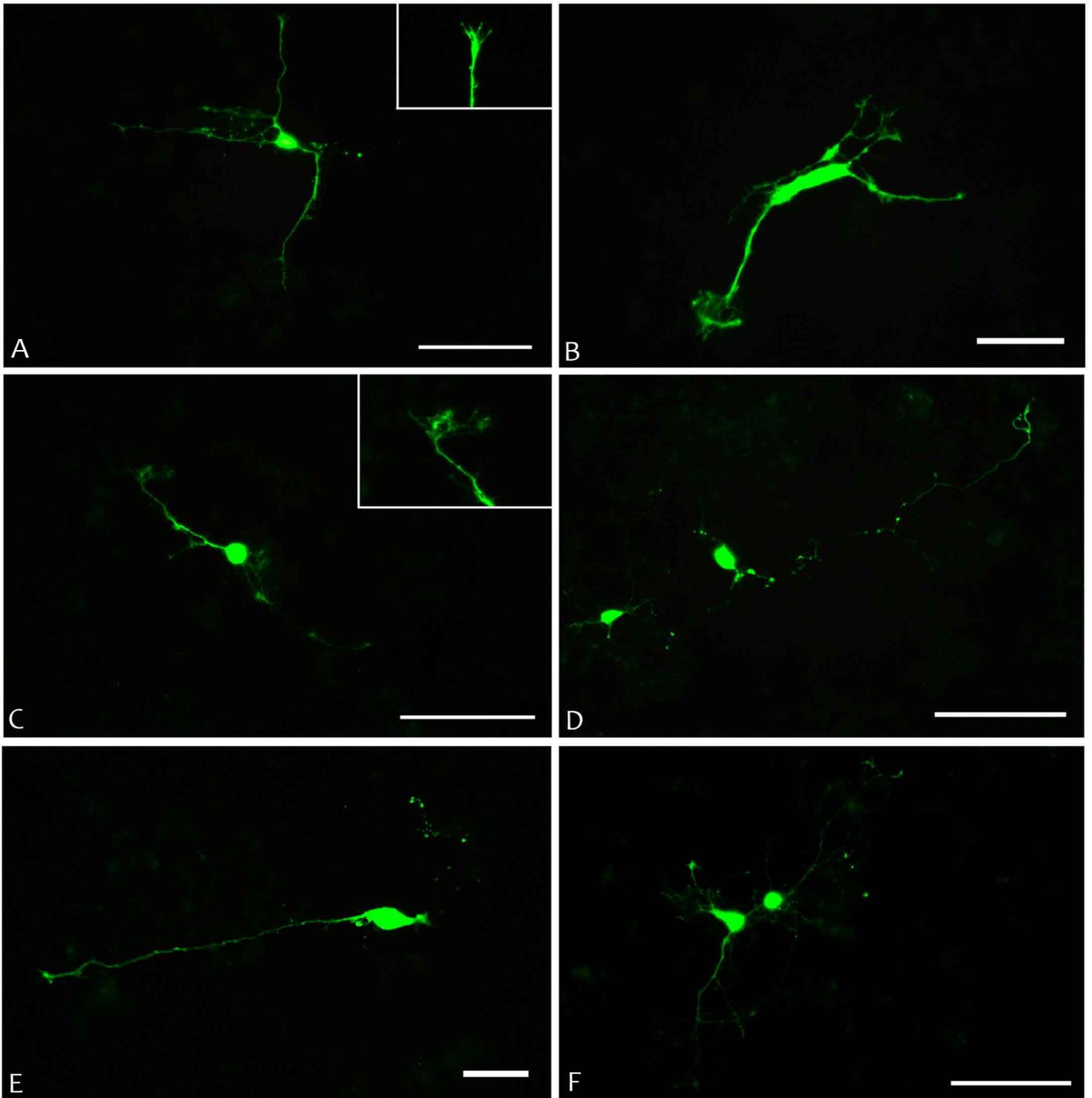


Figura 59: Cultivos de neuroblastos retinianos transducidos con virus HSV1-IRES-EGFP. Imágenes de epifluorescencia. En el borde superior derecho de las imágenes A y C se muestran ampliaciones de conos de crecimiento en donde se aprecia la señal de EGFP incluso en las prolongaciones más delgadas. Barras: 50 μm .

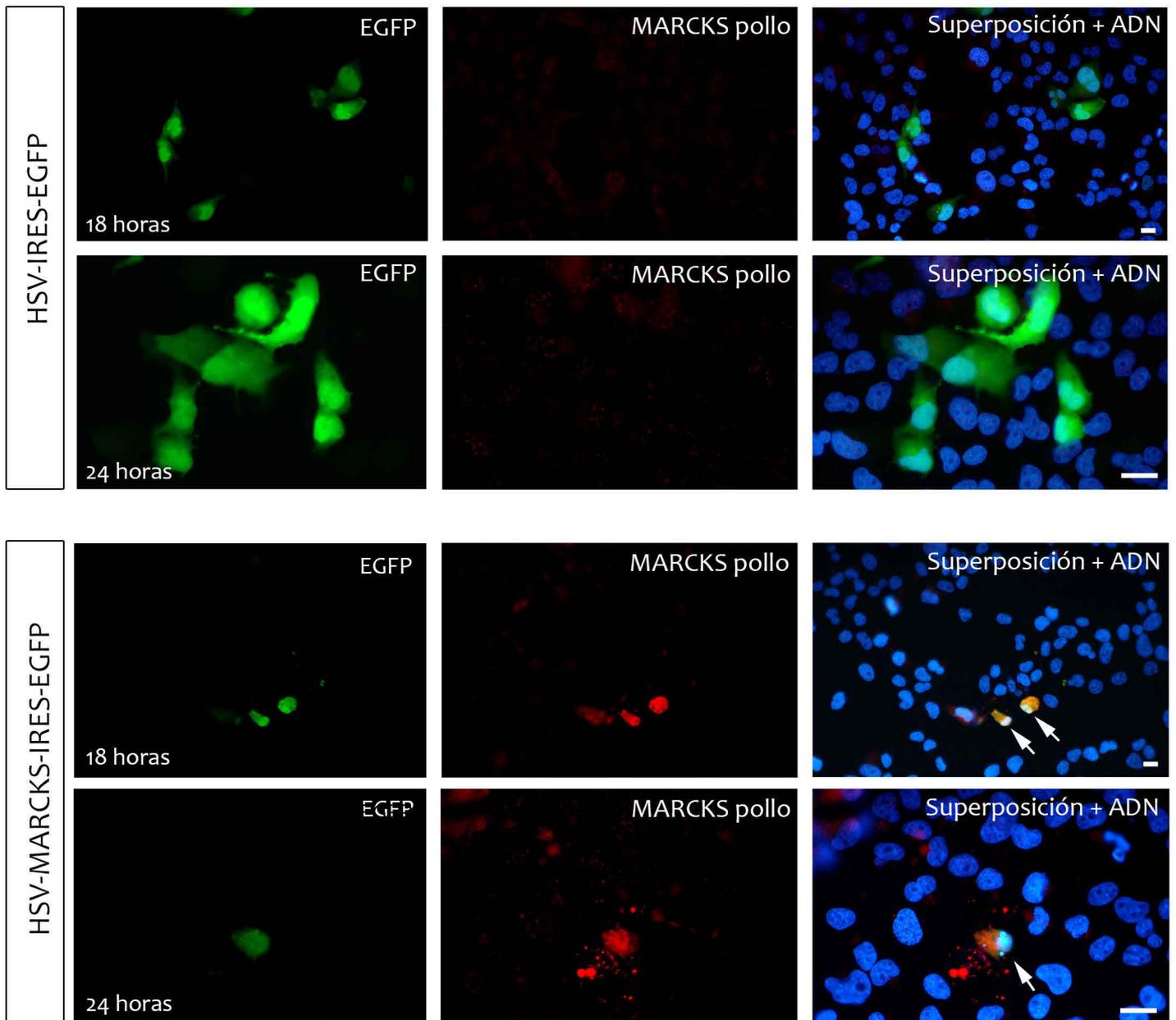
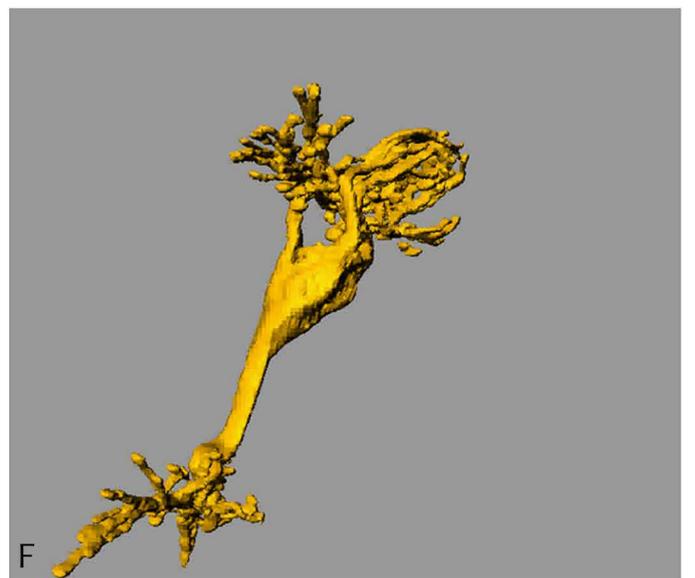
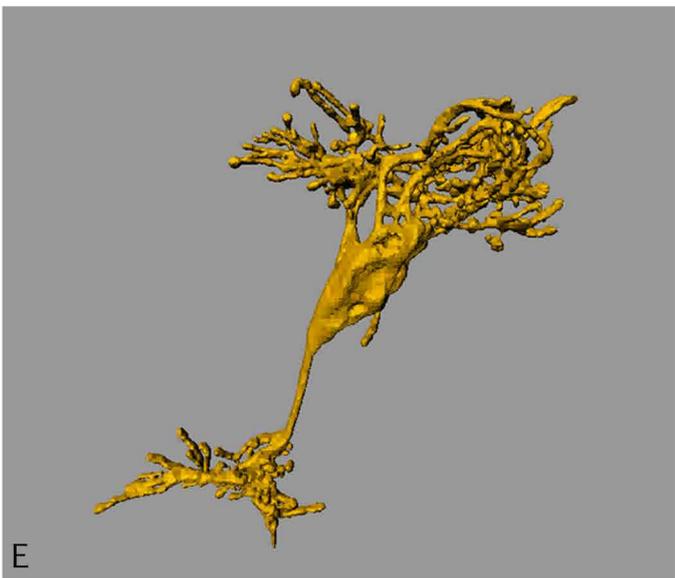
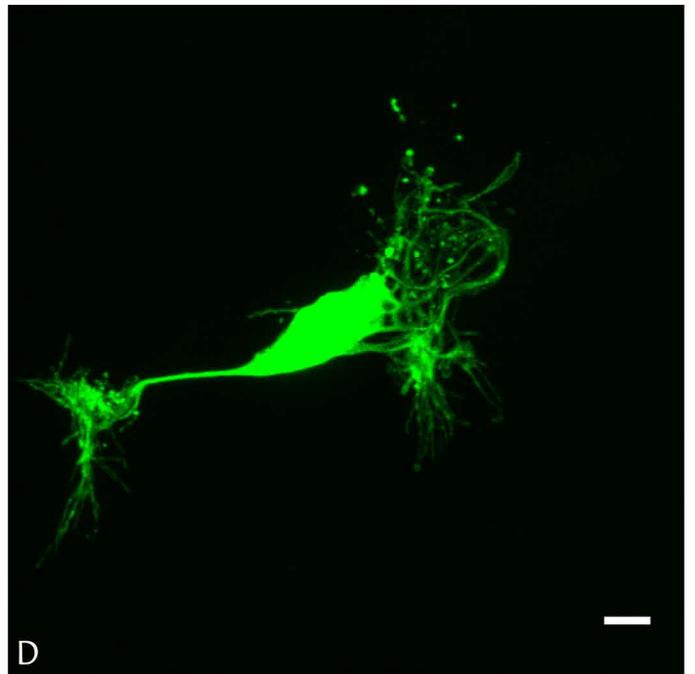
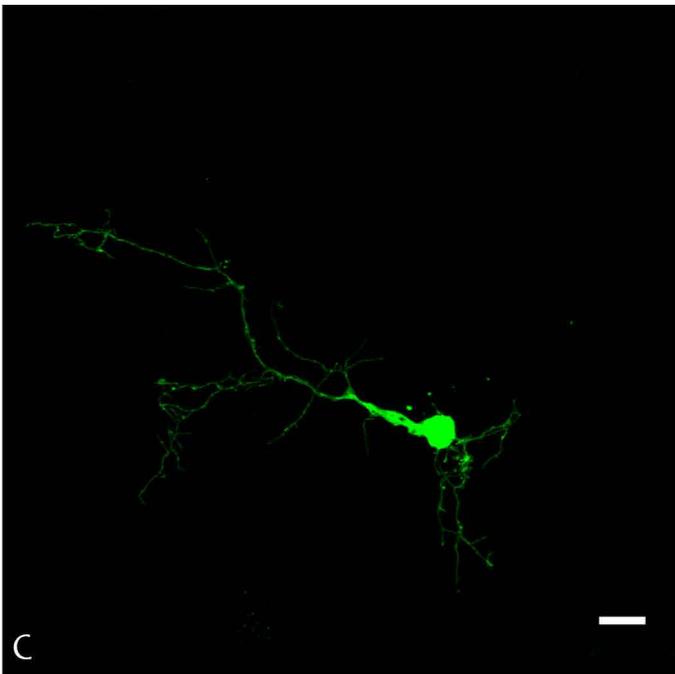
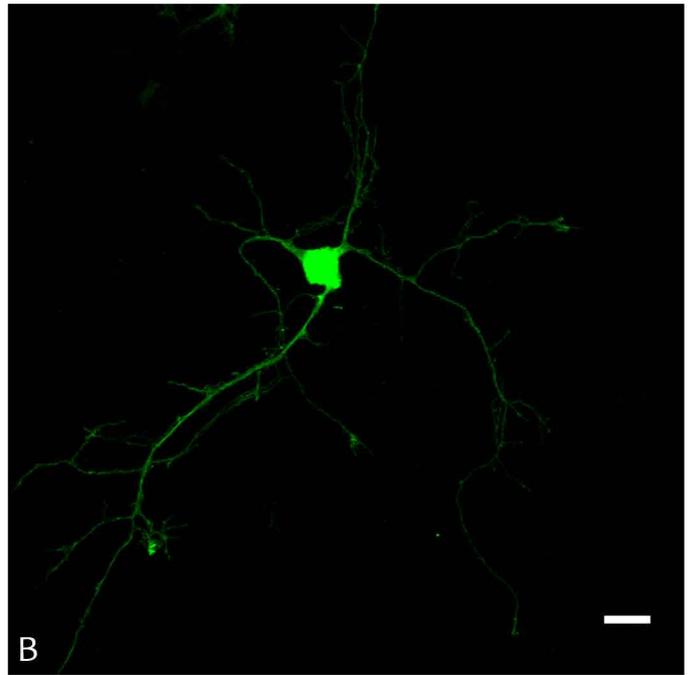
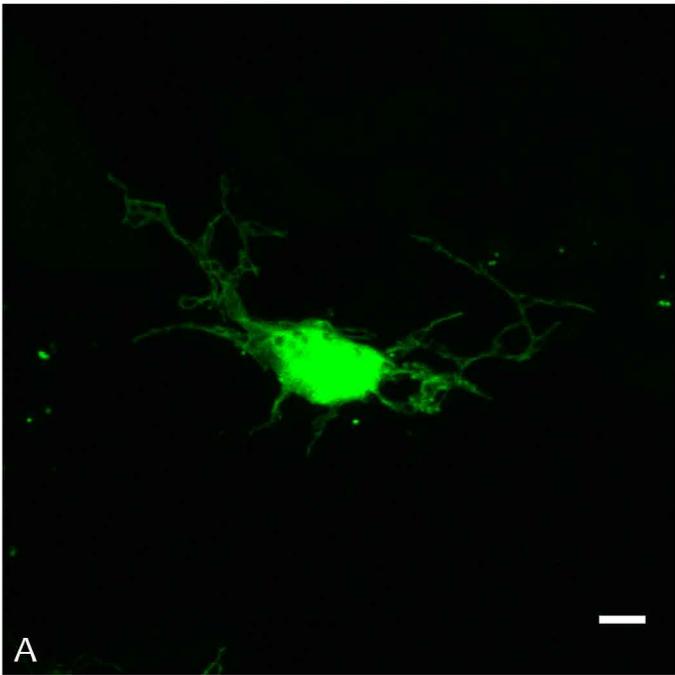


Figura 60: Transducción de partículas virales HSV1-MARCKS-IRES-EGFP en cultivos celulares de glioblastoma humano. Se muestran imágenes de epifluorescencia de cultivos transducidos con las partículas virales control (HSV1-IRES-EGFP) luego de 18 y 24 horas, en donde se aprecian elevados niveles de fluorescencia en EGFP. Estas células no expresan MARCKS reconocibles por el anticuerpo que detecta la variante de pollo. Las células transducidas con HSV1-MARCKS-IRES-EGFP muestran bajos niveles de fluorescencia de EGFP. Se parecía además la presencia de acúmulos citoplasmáticos de MARCKS reconocido con el anticuerpo Polo 52. Estas células además presentan el núcleo compactado. Barras: 100 μ m.

Figura 61: Cultivos de neuroblastos retinianos transducidos con HSV-1-IRES-EGFP. **(A-D)** Imágenes de epifluorescencia de diferentes tipos neuronales transducidos con este procedimiento. La señal de EGFP se extiende hasta las prolongaciones neuronales más delgadas. **(E-F)** Diferentes vistas de una reconstrucción 3D del fotorreceptor que se muestra en la figura D. Barras 20 μm .



CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

A lo largo de los cuatro Capítulos de esta Tesis hemos presentado los resultados del trabajo experimental, los hemos discutido y hemos ido planteando algunas preguntas y emitiendo hipótesis y conjeturas acerca de mecanismos. En esta última parte deseamos realizar una síntesis globalizadora de algunos antecedentes, conclusiones y perspectivas abiertas por este trabajo.

Es conocido que MARCKS es una proteína que ocupa una posición nodal en el cruce o diálogo entre diferentes cascadas de señalización intracelular. Es capaz de ser fosforilada por diferentes enzimas, puede interactuar con la membrana plasmática y con CaCAM, y puede también ser clivada por catepsinas. Sin embargo, el resultado de estos cambios o cómo estos se traducen en un efecto a nivel celular, no son conocidos. Tampoco es conocido cómo se regula de manera diferencial la actividad de esta proteína en tejidos neurales y no neurales. ¿Por qué es distinta la actividad de MARCKS en un tejido y en otro? ¿Dependen estas funciones particulares del pool de interactores moleculares presentes en cada tejido? ¿Depende de modificaciones postraduccionales específicas de cada tejido o de la combinación resultante de algunas de dichas modificaciones? Un posible acercamiento a las respuestas a estas preguntas consiste en la búsqueda de interactores moleculares tejido específicos de la proteína y de modificaciones postraduccionales tejido específicas. En relación a este último punto, un hallazgo sumamente importante fue la identificación de una modificación tejido específica de MARCKS: la fosforilación de MARCKS en la S25 durante la diferenciación neuronal. Pero, ¿qué enzima es responsable de esta fosforilación? ¿por qué tiene lugar únicamente en el tejido nervioso durante su diferenciación? ¿cómo se regula espacial y temporalmente esta fosforilación? Algunas de estas preguntas dieron origen al trabajo de este proyecto de tesis doctoral. Inicialmente determinamos que la S25 de MARCKS se localiza en una secuencia consenso para quinasas dependientes de ciclina, de las cuales Cdk5 es la única con actividad en células postmitóticas. Ensayos farmacológicos realizados utilizando inhibidores específicos de Cdk5, nos permiten concluir que Cdk5 es la quinasa responsable de la fosforilación de la S25. Además encontramos que no es necesaria una fosforilación previa de MARCKS por GSK-3 β para que ocurra la fosforilación en la S25. Tanto la quinasa como el sustrato se localizan en los mismos tejidos, siendo particularmente abundantes en el tejido neural. En la retina neural ocupan las mismas capas pero a nivel subcelular, se localizan en parches de localización cercana pero no idéntica. Existen otros tejidos, sin embargo, en donde están presentes ambas proteínas pero no tiene lugar la fosforilación. Constituye este un problema para ser resuelto en el futuro: ¿Cdk5 presenta actividad en el tejido corneano o en el cristalino del pollo? ¿Están presentes alguno de sus activadores conocidos o depende de otros? Si se demuestra que la quinasa es activa ¿alguna molécula interactora inhibe la fosforilación al enmascarar la serina 25? Estas y otras preguntas podrían ser

respondidas mediante inmunodetección *in situ* o mediante Western-blots buscando los activadores de Cdk5. Además, experimentos *in vitro* de MARCKS y Cdk5 purificadas, pueden contribuir a identificar si la sola presencia de estas proteínas determina su fosforilación o si algún inhibidor presente en estos tejidos puede inhibirla.

Luego de identificar la quinasa responsable de la fosforilación nos preguntamos cómo se regula esta fosforilación. Para empezar investigamos si algún elemento de la matriz presentado como sustrato a las células determina su activación. En este punto identificamos que la laminina es un factor promotor de la fosforilación en la S25 en etapas iniciales pero no en etapas más avanzadas de la diferenciación neuronal en cultivo. ¿Cómo? Planteamos como hipótesis basándonos en referencias bibliográficas que la laminina promueve la transcripción de los activadores conocidos de Cdk5. Estudios de los niveles de expresión de Cdk5 y sus activadores, tanto mediante RT-PCR como mediante western-blots podrían contribuir a la dilucidación de este punto. Por otro lado, no podemos descartar que la adhesión a la laminina promueva reordenamientos importantes en el córtex celular que activen la señalización que determina la fosforilación de la S25. De ser así, el cultivo de neuroblastos en suspensión y su estimulación con péptidos RGD que modulan la activación de las vías de señalización activadas por el reconocimiento de las integrinas a la laminina, no debería inducir la fosforilación de la S25 ya que no existiría una reestructura del córtex celular en estas condiciones. Mucho nos ha sido posible desentrañar al combinar informaciones provenientes de los estudios hechos en retinas en desarrollo, tanto *in situ* como en experimentos con células aisladas. Pero es cierto que la complejidad del microambiente que van encontrando las células retinianas durante su diferenciación amerita que otras moléculas sean estudiadas.

Además de los factores componentes de la matriz extracelular nos preguntamos si factores neurotróficos solubles que también son capaces de asociarse con la matriz tienen la capacidad de activar la fosforilación de la S25. En estas condiciones determinamos que IGF-1 promueve un aumento de la fosforilación en neuroblastos recién explantados, pero es ineficiente en promover aumentos de la fosforilación cuando los neuroblastos en cultivo han avanzado más en su diferenciación, al igual que lo que ocurre con la laminina. No encontramos en este caso evidencias que vinculasen la actividad de Cdk5 con IGF-1 ¿presenta esta enzima mayor actividad en neuronas estimuladas con IGF-1? De ser así ¿qué cascadas de señalización están operando en este proceso? Aquí nuevamente estudios *in vitro* y ensayos farmacológicos similares a los utilizados en la primera parte de este trabajo pueden aportar información acerca de este punto.

Reflexionamos además que una aproximación que nos podría guiar al esclarecimiento de la importancia de esta fosforilación era la identificación de sus posibles interactores moleculares. Considerando esto, abordamos la búsqueda de posibles interactores mediante western-blots y MALDI-TOF de proteínas co-inmunoprecipitadas con S25p-MARCKS. Identificamos varios posibles interactores que de manera interesante presentan vinculación con el

citoesqueleto de actina, ya sea en la organización del citoesqueleto o en la vinculación de la actina con los contactos célula-célula o célula-sustrato. En relación a esto, habíamos descrito ya en trabajos previos la dependencia de la fosforilación en la S25 con el establecimiento de los contactos célula-célula y célula-sustrato, pero no hemos podido establecer una relación inversa, es decir qué papel juega S25p-MARCKS en el establecimiento de dichos contactos.

Luego de identificar la quinasa responsable y algunos eventos que disparan la fosforilación en la S25, nos preguntamos cómo se regula el estado fosforilado de MARCKS durante la diferenciación de la retina. Como mencionamos a lo largo de la tesis, trabajos de varios autores muestran que esta proteína puede ser blanco de múltiples fosforilaciones y que diferentes estados fosforilados de la proteína pueden coexistir en una población celular, sugiriendo la existencia de una posible modulación compleja de la fisiología de la proteína. Aquí describimos que la fosforilación clásica de MARCKS en el ED por PKC presenta niveles relativamente bajos durante las primeras etapas de la histogénesis de la retina y presenta algunos incrementos puntuales respondiendo posiblemente a condiciones fisiológicas particulares de la célula. Por su parte, nuestro grupo previamente describió que la fosforilación de la S25 se incrementa a medida que progresa la diferenciación celular en la retina y alcanza valores máximos cuando este tejido desarrolla el patrón histológico propio de la retina adulta. Tenemos entonces dos fosforilaciones que tienen dinámicas completamente diferentes durante el desarrollo por lo que nos preguntamos cual podía ser la relación entre ambas. Resultó muy sorprendente el hallazgo de que la estimulación de la fosforilación en el ED determina una pérdida concomitante y muy rápida de la fosforilación en la S25. Esto podría sugerir interacciones de rango amplio en la proteína, como demostráramos su existencia previamente, o un mecanismo diferente. Los experimentos realizados con inhibidores de las fosfatasas clásicas celulares nos permitieron determinar que la activación de PKC promueve la desfosforilación a cargo de la fosfatasa PP2A. No podemos inferir a partir de estos resultados si PKC activa a PP2A, como fuera sugerido por otros autores, o si la fosforilación del ED provoca cambios conformacionales en la proteína que exponen el sitio fosforilado a la fosfatasa que se encuentra activa en condiciones normales. Respecto a esto algunos hallazgos previos de nuestro laboratorio refuerzan esta hipótesis. Cuando se despolimeriza la actina en neuroblastos en cultivo, tiene lugar la desfosforilación de la S25 de MARCKS. Esto podría indicar que la separación de la actina del ED traería aparejadas modificaciones a nivel de la estructura del extremo amino de la proteína, exponiendo así el residuo de la S25 a la actividad de fosfatasas. Un fenómeno similar, podría tener lugar cuando el ED es fosforilado por PKC. También podríamos especular que ocurre un evento de disociación de algún interactor que proteja el acceso de la fosfatasa al sitio fosforilado. Los experimentos realizados no nos permiten dirimir esta incógnita. Diversas aproximaciones que pueden ir desde la expresión de MARCKS mutante en los sitios de fosforilación del ED hasta complejos estudios de la estructura de MARCKS mediante NMR de gran poder, podrían responder algunas de estas dudas.

Por otro lado, ¿existen interacciones de rango amplio pero en sentido contrario? Es decir, ¿la fosforilación del extremo aminoterminal (S25) altera o modifica la capacidad de MARCKS de interactuar con CaCAM o ser fosforilada por PKC? Estas preguntas podrían ser respondidas mediante experimentos con las proteínas purificadas. Utilizando S25p-MARCKS purificado, se podría analizar la cinética de fosforilación del ED en presencia de PKC activa y compararla con la cinética de fosforilación de MARCKS no fosforilada en la S25. Experimentos análogos pueden utilizarse para determinar el posible efecto de la fosforilación en la S25 y la interacción del ED con CaCAM.

Avanzando un poco más en los efectos de la fosforilaciones de MARCKS a nivel celular, quisimos evidenciar las repercusiones de dichas fosforilaciones sobre la organización del citoesqueleto de actina. Para cumplir dicho objetivo, nos vimos limitados en el análisis de estas características celulares en los neuroblastos retinianos ya que se trata de células pequeñas. Por dicho motivo, decidimos analizar otros dos tipos celulares: uno glial y otro conjuntivo. Estos tipos celulares presentan la ventaja de ser células de gran tamaño y adoptar conformaciones extendidas en cultivo, y además poseen la particularidad de no presentar la fosforilación en la S25. ¿Qué efectos tiene la estimulación de la PKC en estas células? ¿qué ocurre con el principal sustrato de PKC, MARCKS? En estas células la activación de PKC promueve la reorganización del citoesqueleto de actina y de membranas internas así como profundos cambios en la forma celular. Ninguno de estos eventos pudo ser evidenciado en neuroblastos. ¿Se trata de eventos que dependen de la regulación diferencial de estados fosforilados de MARCKS en neuroblastos y fibroblastos y glía, o depende de otras características particulares de la célula? Un estudio comparativo más detallado de las variantes fosforiladas de MARCKS en estos tipos celulares puede constituir una estrategia para aproximarnos a dilucidar algunas características de la fisiología de esta proteína. Conjeturamos que la presencia de la fosforilación en la S25 de MARCKS en neuroblastos modula su actividad, aunque desconocemos cómo. Un sistema sumamente útil para determinar la funcionalidad de esta fosforilación lo constituirían justamente los fibroblastos y las células de Müller. ¿Qué ocurre cuando se sobreexpresa en estas células una variante de MARCKS constitutivamente fosforilada en la S25? En condiciones sin estimulación, ¿cambia la morfología de la célula? Y cuando se estimula con PMA, ¿responden de la misma manera que las células que no expresan este mutante?

Ahora bien, describimos al menos dos vías que propician la fosforilación en la S25 de MARCKS por Cdk5, pero, ¿cuál es el efecto a nivel celular de un incremento de la fosforilación de la S25? En nuestros experimentos en cultivo sobre laminina o con células tratadas con IGF-1 evidenciamos algunos cambios como una mayor adhesión al sustrato y crecimiento neurítico. Sin embargo, no podemos establecer ningún vínculo directo entre la actividad de S25p-MARCKS y estos fenómenos, por lo que desconocemos hasta el momento la relevancia funcional de esta

fosforilación. Esta pregunta podría ser respondida expresando variantes mutantes de la serina 25, por ejemplo mutantes en donde no se pueda dar la fosforilación (sustituyendo la serina por alanina o asparagina) o mutantes que emulen un estado de máxima fosforilación (sustituyendo la serina por ácido glutámico). Esta expresión podría lograrse transfectando cultivos celulares o también electroporando embriones de pollo. Esta segunda aproximación podría ser útil a la hora de evaluar cómo repercute el estado fosforilado de MARCKS en el proceso histogénico de la retina. En este trabajo intentamos abordar este problema realizando transfecciones en cultivos de neuroblastos retinianos utilizando el sistema de LipofectaminaTM y fosfato de calcio. Lamentablemente no logramos transfectar un número importante de células y obtuvimos elevados niveles de muerte celular. Los cultivos de neuroblastos de la retina son extremadamente sensibles a distintos tratamientos, tal vez se podrían buscar alternativas como el uso de líneas celulares u otros sistemas de introducción de genes. En este trabajo también describimos el uso de vectores virales de tipo herpes virus simplex tipo 1. En este caso el sistema demostró ser muy eficiente para transducir neuronas y lograr una expresión importante de EGFP pero resultó altamente apoptogénico cuando se introducía el gen de MARCKS. Atribuimos este efecto al elevado número de copias del gen de interés que porta este sistema. Tal vez una alternativa viable a este sistema lo constituyan los lentivirus que solo introducen una copia del gen de interés.

En resumen, nos enfrentamos a un fenómeno complejo de regulación de la dinámica de un elemento del citoesqueleto en el contexto del proceso de diferenciación neuronal. En particular, una de las proteínas participantes de este proceso - MARCKS- se encuentra en un punto nodal de varias vías de señalización y su actividad en la célula posiblemente responda a la integración de todas estas señales que convergen en esta proteína. Por este motivo probablemente su actividad no sea solamente una, sino que puede modular eventos diferentes en función de sus residuos fosforilados. Consideramos que el ahondar en el estudio de este tipo de procesos celulares básicos, puede aportar información fundamental para la comprensión de fenómenos más complejos que van desde la migración celular, extensión neurítica, desarrollo del sistema nervioso hasta la actividad del cerebro adulto vinculada a los fenómenos de plasticidad neuronal.

BIBLIOGRAFÍA

- Aderem, A. (1992). The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell* 71, 713–716.
- Aderem, A.A., Albert, K.A., Keum, M.M., Wang, J.K., Greengard, P., y Cohn, Z.A. (1988a). Stimulus-dependent myristoylation of a major substrate for protein kinase C. *Nature* 332, 362–364.
- Aderem, A.A., Marratta, D.E., y Cohn, Z.A. (1988b). Interferon gamma induces the myristoylation of a 48-kDa protein in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6310–6313.
- Adler, R. (1987). Nature and nurture in the differentiation of retinal photoreceptors and neurons. *Cell Differentiation* 20, 183–188.
- Adler, R., y Hatlee, M. (1989). Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. *Science* 243, 391–393.
- Ahn, J.-H., Kim, Y., Kim, H.-S., Greengard, P., y Nairn, A.C. (2011). Protein kinase C-dependent dephosphorylation of tyrosine hydroxylase requires the B56 heterotrimeric form of protein phosphatase 2A. *PLoS One* 6, e26292.
- Ahn, J.-H., McAvoy, T., Rakhilin, S. V., Nishi, A., Greengard, P., y Nairn, A.C. (2007). Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2979–2984.
- Aigner, L., y Caroni, P. (1993). Depletion of 43-kD growth-associated protein in primary sensory neurons leads to diminished formation and spreading of growth cones. *The Journal of Cell Biology* 123, 417–429.
- Albert, K.A., Nairn, A.C., y Greengard, P. (1987). The 87-kDa protein, a major specific substrate for protein kinase C: purification from bovine brain and characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7046–7050.
- Allen, L.A., y Aderem, A. (1995a). Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts. *The EMBO Journal* 14, 1109–1121.
- Allen, L.H., y Aderem, A. (1995b). A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 182, 829–840.
- Arbuzova, A., Schmitz, A.A.P., y Vergères, G. (2002). Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *The Biochemical Journal* 362, 1–12.
- Arpitha, P., Gao, C.Y., Tripathi, B.K., Saravanamuthu, S., y Zelenka, P. (2013). Cyclin-dependent kinase 5 promotes the stability of corneal epithelial cell junctions. *Molecular Vision* 319–332.
- Arruti C. y Zolessi F.R. (2001) “Neurogénesis en la retina: variantes fosforilados de MARCKS”; en neurogénesis: Aspectos celulares y moleculares del desarrollo neural embrionario. Eds.: Carri, Goya, Rovasio. Inst. IMBICE y Ac. Nal. Cs. Exactas, Físicas y Naturales, Buenos Aires, Argentina.
- Avrameas, S., Guilbert, B., y Dighiero, G. Natural antibodies against tubulin, actin myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera, and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenström’s macroglobulinemia may express similar antibody spe. *Annales D’immunologie* 132C, 231–236.
- Baluch, D.P., Koeneman, B.A., Hatch, K.R., McGaughey, R.W., y Capco, D.G. (2004). PKC isotypes in post-activated and fertilized mouse eggs: association with the meiotic spindle. *Developmental Biology* 274, 45–55.
- Bard, J.B., y Chapman, J.A. (1973). Diameters of collagen fibrils grown in vitro. *Nature: New Biology* 246, 83–84.
- Baron, W., De Vries, E.J., De Vries, H., y Hoekstra, D. (1999). Protein kinase C prevents oligodendrocyte differentiation: modulation of actin cytoskeleton and cognate polarized membrane traffic. *Journal of Neurobiology* 41, 385–398.

- Bhat, N.R., Zhang, P., y Bhat, A.N. (1995). The expression of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate in oligodendrocytes is developmentally regulated. *Developmental Neuroscience* 17, 256–263.
- Botto, L., Masserini, M., Casseti, A., y Palestini, P. (2004). Immunoseparation of Prion protein-enriched domains from other detergent-resistant membrane fractions, isolated from neuronal cells. *FEBS Letters* 557, 143–147.
- Botto, L., Masserini, M., y Palestini, P. (2007). Changes in the composition of detergent-resistant membrane domains of cultured neurons following protein kinase C activation. *Journal of Neuroscience Research* 85, 443–450.
- Brown, D.A., y London, E. (1997). Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240, 1–7.
- Calabrese, B., y Halpain, S. (2005). Essential role for the PKC target MARCKS in maintaining dendritic spine morphology. *Neuron* 48, 77–90.
- Carri, N.G., Rubin, K., Gullberg, D., y Ebendal, T. (1992). Neuritogenesis on collagen substrates. Involvement of integrin-like matrix receptors in retinal fibre outgrowth on collagen. *International Journal of Developmental Neuroscience* 10, 393–405.
- Chakravarthy, B.R., Isaacs, R.J., Morley, P., Durkin, J.P., y Whitfield, J.F. (1995). Stimulation of protein kinase C during Ca(2+)-induced keratinocyte differentiation. Selective blockade of MARCKS phosphorylation by calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 1362–1368.
- Chang, S., Rodionov, V.I., Borisy, G.G., y Popov, S. V (1998). Transport and turnover of microtubules in frog neurons depend on the pattern of axonal growth. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 18, 821–829.
- Chen, D., Purohit, A., Halilovic, E., Doxsey, S.J., y Newton, A.C. (2004). Centrosomal anchoring of protein kinase C betaII by pericentriol controls microtubule organization, spindle function, and cytokinesis. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 4829–4839.
- Chen, M.-C., Lin, H., Hsu, F.-N., Huang, P.-H., Lee, G.-S., y Wang, P.S. (2010a). Involvement of cAMP in nerve growth factor-triggered p35/Cdk5 activation and differentiation in PC12 cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 299, C516–27.
- Chen, X., y Rotenberg, S.A. (2010). PhosphoMARCKS drives motility of mouse melanoma cells. *Cellular Signalling* 22, 1097–1103.
- Cheng, Q., Sasaki, Y., Shoji, M., Sugiyama, Y., Tanaka, H., Nakayama, T., Mizuki, N., Nakamura, F., Takei, K., y Goshima, Y. (2003). Cdk5/p35 and Rho-kinase mediate ephrin-A5-induced signaling in retinal ganglion cells. *Molecular and Cellular Neurosciences* 24, 632–645.
- Clarke, P.R., Siddhanti, S.R., Cohen, P., y Blackshear, P.J. (1993). Okadaic acid-sensitive protein phosphatases dephosphorylate MARCKS, a major protein kinase C substrate. *FEBS Letters* 336, 37–42.
- Daniloff, J.K., Chuong, C.M., Levi, G., y Edelman, G.M. (1986). Differential distribution of cell adhesion molecules during histogenesis of the chick nervous system. *The Journal of Neuroscience* 6, 739–758.
- Dhariwala, F.A., y Rajadhyaksha, A.M.S. (2008). An Unusual Member of the Cdk Family : Cdk5. 351–369.
- Douglas, D.N., Fink, H.S., Rosé, S.D., Ridgway, N.D., Cook, H.W., y Byers, D.M. (1997). Inhibitors of actin polymerization and calmodulin binding enhance protein kinase C-induced translocation of MARCKS in C6 glioma cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1356, 121–130.
- Dun, X., y Chilton, J.K. (2010). Control of cell shape and plasticity during development and disease by the actin-binding protein Drebrin. *Histology and Histopathology* 25, 533–540.
- Dunker, A.K., y Gough, J. (2011). Sequences and topology: intrinsic disorder in the evolving universe of protein structure. *Current Opinion in Structural Biology* 21, 379–381.
- Egea, G., Lázaro-Diéguez, F., y Vilella, M. (2006). Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 168–178.

- Estrada-Bernal, A., Gatlin, J.C., Sunpaweravong, S., y Pfenninger, K.H. (2009). Dynamic adhesions and MARCKS in melanoma cells. *Journal of Cell Science* *122*, 2300–2310.
- Fink, A.L. (2005). Natively unfolded proteins. *Current Opinion in Structural Biology* *15*, 35–41.
- De Forges, H., Bouissou, A., y Perez, F. (2012). Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *44*, 266–274.
- Frade, J.M., Bovolenta, P., y Rodríguez-Tébar, A (1999). Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microscopy Research and Technique* *45*, 243–251.
- Fraefel, C. (2002). Gene delivery using helper virus-free HSV-1 amplicon vectors. *Current Protocols in Human Genetics. Chapter 12*, Unit 12.12.
- Fraefel, C., Mendes-Madeira, A., Mabon, O., Lefebvre, A., Le Meur, G., Ackermann, M., Moullier, P., y Rolling, F. (2005). In vivo gene transfer to the rat retina using herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-based amplicon vectors. *Gene Therapy* *12*, 1283–1288.
- Fujise, a, Mizuno, K., Ueda, Y., Osada, S., Hirai, S., Takayanagi, a, Shimizu, N., Owada, M.K., Nakajima, H., y Ohno, S. (1994). Specificity of the high affinity interaction of protein kinase C with a physiological substrate, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate. *The Journal of Biological Chemistry* *269*, 31642–31648.
- Garrett, A.M., Schreiner, D., Lobas, M.A., y Weiner, J.A. (2012). Report g-Protocadherins Control Cortical Dendrite Arborization by Regulating the Activity of a FAK / PKC / MARCKS Signaling Pathway. *Neuron* *74*, 269–276.
- Gatlin, J.C., Estrada-Bernal, A., Sanford, S.D., y Pfenninger, K.H. (2006). Myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate phosphorylation regulates growth cone adhesion and pathfinding. *Molecular Biology of the Cell* *17*, 5115–5130.
- Geraldo, S., Khanzada, U.K., Parsons, M., Chilton, J.K., y Gordon-Weeks, P.R. (2008). Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. *Nature Cell Biology* *10*, 1181–1189.
- Graber, S., Maiti, S., y Halpain, S. (2004). Cathepsin B-like proteolysis and MARCKS degradation in sub-lethal NMDA-induced collapse of dendritic spines. *Neuropharmacology* *47*, 706–713.
- Graff, J.M., Stumpo, D.J., y Blackshear, P.J. (1989a). Molecular cloning, sequence, and expression of a cDNA encoding the chicken myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS). *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* *3*, 1903–1906.
- Graff, J.M., Young, T.N., Johnson, J.D., y Blackshear, P.J. (1989b). Phosphorylation-regulated calmodulin binding to a prominent cellular substrate for protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry* *264*, 21818–21823.
- Hahn, C.M., Kleinholz, H., Koester, M.P., Grieser, S., Thelen, K., y Pollerberg, G.E. (2005). Role of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 in local axon and growth cone stabilization. *Neuroscience* *134*, 449 – 465.
- Hamada, H., Zhang, Y.-L., Kawai, A., Li, F., Hibino, Y., Hirashima, Y., Kurimoto, M., Hayashi, N., Kato, I., Endo, S., et al. (2003). Development-associated myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation in rat brain. *Child's Nervous System* *19*, 152–158.
- Hamburger, V., y Hamilton, H.L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental Dynamics : an Official Publication of the American Association of Anatomists* *195*, 231–272.
- Harada, T., Morooka, T., Ogawa, S., y Nishida, E. (2001). ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nature Cell Biology* *3*, 453–459.
- Hartwig, J.H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P.A., Nairn, A.C., y Aderem, A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* *356*, 618–622.

- Herget, T., Oehrlein, S. a, Pappin, D.J., Rozengurt, E., y Parker, P.J. (1995). The myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) is sequentially phosphorylated by conventional, novel and atypical isotypes of protein kinase C. *European Journal of Biochemistry / FEBS* *233*, 448–457.
- Hernández, F., Langa, E., Cuadros, R., Avila, J., y Villanueva, N. (2010). Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PPI and PP2A. *Molecular and Cellular Biochemistry* *344*, 211–215.
- Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Matsuda, K., y Hayashi, M. Expression of MARCKS mRNA in lateral geniculate nucleus and visual cortex of normal and monocularly deprived macaque monkeys. *Visual Neuroscience* *19*, 633–643.
- Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Matsuda, K., y Hayashi, M. (2002). Northern blot and in situ hybridization analyses of MARCKS mRNA expression in the cerebral cortex of the macaque monkey. *Cerebral Cortex* *12*, 552–564.
- Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Matsuda, K., y Hayashi, M. (2003). Cell type- and region-specific expression of protein kinase C-substrate mRNAs in the cerebellum of the macaque monkey. *The Journal of Comparative Neurology* *467*, 135–149.
- Higo, N., Oishi, T., Yamashita, A., Murata, Y., Matsuda, K., y Hayashi, M. (2004). Northern blot and in situ hybridization analyses for the development of myristoylated alanine-rich c-kinase substrate mRNA in the monkey cerebral cortex. *Neuroscience* *129*, 167–177.
- Hsu, W.-L., Oldfield, C., Meng, J., Huang, F., Xue, B., Uversky, V.N., Romero, P., y Dunker, A.K. (2012). Intrinsic protein disorder and protein-protein interactions. *Pacific Symposium on Biocomputing* 116–127.
- Humbert, S., Dhavan, R., y Tsai, L. (2000). p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* *113* (Pt 6, 975–983).
- Iioka, H., Ueno, N., y Kinoshita, N. (2004). Essential role of MARCKS in cortical actin dynamics during gastrulation movements. *The Journal of Cell Biology* *164*, 169–174.
- Ikenoya, M., Hidaka, H., Hosoya, T., Suzuki, M., Yamamoto, N., y Sasaki, Y. (2002). Inhibition of rho-kinase-induced myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) phosphorylation in human neuronal cells by H-1152, a novel and specific Rho-kinase inhibitor. *Journal of Neurochemistry* *81*, 9–16.
- Ishikawa, R., Hayashi, K., Shirao, T., Xue, Y., Takagi, T., Sasaki, Y., y Kohama, K. (1994). Drebrin, a development-associated brain protein from rat embryo, causes the dissociation of tropomyosin from actin filaments. *The Journal of Biological Chemistry* *269*, 29928–29933.
- Ishikawa, R., Katoh, K., Takahashi, A., Xie, C., Oseki, K., Watanabe, M., Igarashi, M., Nakamura, A., y Kohama, K. (2007). Drebrin attenuates the interaction between actin and myosin-V. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *359*, 398–401.
- Jacobs, A., Breakefield, X.O., y Fraefel, C. (1999). HSV-1-based vectors for gene therapy of neurological diseases and brain tumors: part II. Vector systems and applications. *Neoplasia* *1*, 402–416.
- Jarboe, J.S., Anderson, J.C., Duarte, C.W., Mehta, T., Nowsheen, S., Hicks, P.H., Whitley, A.C., Rohrbach, T.D., McCubrey, R.O., Chiu, S., et al. (2012). MARCKS regulates growth and radiation sensitivity and is a novel prognostic factor for glioma. *Clinical Cancer Research* *18*, 3030–3041.
- Jerusalinsky, D., Baez, M.V., y Epstein, A.L. (2012). Herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors for fundamental research in neurosciences and gene therapy of neurological diseases. *Journal of Physiology*, *106*, 2–11.
- Joester, A., y Faissner, A. (2001). The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biology*, *20*, 13–22.
- Johnson, D.E., Xue, B., Sickmeier, M.D., Meng, J., Cortese, M.S., Oldfield, C.J., Le Gall, T., Dunker, A.K., y Uversky, V.N. (2012). High-throughput characterization of intrinsic disorder in proteins from the Protein Structure Initiative. *Journal of Structural Biology* *180*, 201–215.
- Jones, P.L., y Jones, F.S. (2000). Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biology*, *19*, 581–596.

- Kashima, T., Vinters, H. V., y Campagnoni, A.T. (1995). Unexpected expression of intermediate filament protein genes in human oligodendrogloma cell lines. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* *54*, 23–31.
- Kim, H.S., Swierczynski, S.L., Tuttle, J.S., Lai, W.S., y Blackshear, P.J. (1998). Transgenic complementation of MARCKS deficiency with a nonmyristoylatable, pseudo-phosphorylated form of MARCKS: evidence for simultaneous positive and dominant-negative effects on central nervous system development. *Developmental Biology* *200*, 146–157.
- Kopitar-Jerala, N., y Turk, B. (2007). Cleavage of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) by cysteine cathepsins in cells and tissues of stefin B-deficient mice. *Biological Chemistry* *388*, 847–852.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Laimbacher, A.S., Esteban, L.E., Castello, A.A., Abdusetir Cerfoglio, J.C., Argüelles, M.H., Glikmann, G., D'Antuono, A., Mattion, N., Berois, M., Arbiza, J., et al. (2012). HSV-1 amplicon vectors launch the production of heterologous rotavirus-like particles and induce rotavirus-specific immune responses in mice. *Molecular Therapy*, *20*, 1810–1820.
- Lalioi, V., Pulido, D., y Sandoval, I. V (2010). Cdk5, the multifunctional surveyor. *Cell Cycle*, *9*, 284–311.
- Larsson, C. (2006). Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cellular Signalling* *18*, 276–284.
- Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., y Caroni, P. (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *The Journal of Cell Biology* *149*, 1455–1472.
- Lecuit, T., y Lenne, P.-F. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *8*, 633–644.
- Le Gall, T., Romero, P.R., Cortese, M.S., Uversky, V.N., y Dunker, A.K. (2007). Intrinsic disorder in the Protein Data Bank. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* *24*, 325–342.
- Leshchyn'ska, I., Sytnyk, V., Morrow, J.S., y Schachner, M. (2003). Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKCbeta2 via beta1 spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *The Journal of Cell Biology* *161*, 625–639.
- Li, B.S., Zhang, L., Gu, J., Amin, N.D., y Pant, H.C. (2000). Integrin alpha(1) beta(1)-mediated activation of cyclin-dependent kinase 5 activity is involved in neurite outgrowth and human neurofilament protein H Lys-Ser-Pro tail domain phosphorylation. *The Journal of Neuroscience*, *20*, 6055–6062.
- Li, H., Chen, G., Zhou, B., y Duan, S. (2008). Actin filament assembly by myristoylated alanine-rich C kinase substrate-phosphatidylinositol-4,5-diphosphate signaling is critical for dendrite branching. *Molecular Biology of the Cell* *19*, 4804–4813.
- Li, T., Hawkes, C., Qureshi, H.Y., Kar, S., y Paudel, H.K. (2006). Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3beta. *Biochemistry* *45*, 3134–3145.
- Li, Y., Martin, L.D., Spizz, G., y Adler, K.B. (2001). MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* *276*, 40982–40990.
- Lochter, A., y Schachner, M. (1993). Tenascin and extracellular matrix glycoproteins: from promotion to polarization of neurite growth in vitro. *The Journal of Neuroscience*, *13*, 3986–4000.
- Lowe, M. (2011). Structural organization of the Golgi apparatus. *Current Opinion in Cell Biology* *23*, 85–93.
- MacNicol, M., y Schulman, H. (1992). Multiple Ca²⁺ signaling pathways converge on CaM kinase in PC12 cells. *FEBS Letters* *304*, 237–240.
- Mancek-Keber, M., Bencina, M., Japelj, B., Panter, G., Andrä, J., Brandenburg, K., Triantafilou, M., Triantafilou, K., y Jerala, R. (2012). MARCKS as a negative regulator of lipopolysaccharide signaling. *Journal of Immunology*, *188*, 3893–3902.

- Manenti, S., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., y Taniguchi, H. (1994). Demyristoylation of the major substrate of protein kinase C (MARCKS) by the cytoplasmic fraction of brain synaptosomes. *The Journal of Biological Chemistry* *269*, 8309–8313.
- Manenti, S., Taniguchi, H., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., y Darbon, J.M. (1997). Specific proteolytic cleavage of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate between Asn 147 and Glu 148 also occurs in brain. *Journal of Neuroscience Research* *48*, 259–263.
- Manenti, S., Yamauchi, E., Sorokine, O., Knibiehler, M., Van Dorsselaer, A., Taniguchi, H., Ducommun, B., y Darbon, J.M. (1999). Phosphorylation of the myristoylated protein kinase C substrate MARCKS by the cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 complex in vitro. *The Biochemical Journal* *340* (Pt 3, 775–782).
- McNamara, R.K., Stumpo, D.J., Morel, L.M., Lewis, M.H., Wakeland, E.K., Blackshear, P.J., y Lenox, R.H. (1998). Effect of reduced myristoylated alanine-rich C kinase substrate expression on hippocampal mossy fiber development and spatial learning in mutant mice: transgenic rescue and interactions with gene background. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 14517–14522.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J.P., Blow, J.J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.G., y Moulinoux, J.P. (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European Journal of Biochemistry / FEBS* *243*, 527–536.
- Mey, J., y Thanos, S. (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Research. Brain Research Reviews* *32*, 343–379.
- Michaut, M.A., Williams, C.J., y Schultz, R.M. (2005). Phosphorylated MARCKS: a novel centrosome component that also defines a peripheral subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Developmental Biology* *280*, 26–37.
- Mizui, T., Kojima, N., Yamazaki, H., Katayama, M., Hanamura, K., y Shirao, T. (2009). Drebrin E is involved in the regulation of axonal growth through actin-myosin interactions. *Journal of Neurochemistry* *109*, 611–622.
- Morash, S.C., Douglas, D., McMaster, C.R., Cook, H.W., y Byers, D.M. (2005). Expression of MARCKS effector domain mutants alters phospholipase D activity and cytoskeletal morphology of SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neurochemical Research* *30*, 1353–1364.
- Mosevitsky, M.I. (2005). Nerve ending “signal” proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1. *International Review of Cytology* *245*, 245–325.
- Myat, M.M., Anderson, S., Allen, L.A., y Aderem, A. (1997). MARCKS regulates membrane ruffling and cell spreading. *Current Biology : CB* *7*, 611–614.
- Nagase, T., Murakami, T., Nozaki, H., Inoue, R., Nishito, Y., Tanabe, O., Usui, H., y Takeda, M. (1997). Tissue and subcellular distributions, and characterization of rat brain protein phosphatase 2A containing a 72-kDa delta/B* subunit. *Journal of Biochemistry* *122*, 178–187.
- Nagumo, H., Ikenoya, M., Sakurada, K., Furuya, K., Ikuhara, T., Hiraoka, H., y Sasaki, Y. (2001). Rho-associated kinase phosphorylates MARCKS in human neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *280*, 605–609.
- Nakhost, A., Kabir, N., Forscher, P., y Sossin, W.S. (2002). Protein kinase C isoforms are translocated to microtubules in neurons. *The Journal of Biological Chemistry* *277*, 40633–40639.
- Nigg, E.A. (1993). Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Current Opinion in Cell Biology* *5*, 187–193.
- Nikolic, M., Chou, M.M., Lu, W., Mayer, B.J., y Tsai, L.H. (1998). The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* *395*, 194–198.
- Nikolic, M., Dudek, H., Kwon, Y.T., Ramos, Y.F., y Tsai, L.H. (1996). The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes & Development* *10*, 816–825.

Ohmitsu, M., Fukunaga, K., Yamamoto, H., y Miyamoto, E. (1999). Phosphorylation of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate by mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons following stimulation of glutamate receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 408-417.

Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., Saruta, K., Iwasato, T., Itohara, S., Hashimoto, M., et al. (2007). Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. *Development* 134, 2273-2282.

Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, Pant, H.C., Brady, R.O., Martin, L.J., y Kulkarni, A.B. (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11173-11178.

Ouimet, C.C., Wang, J.K., Walaas, S.I., Albert, K.A., y Greengard, P. (1990). Localization of the MARCKS (87 kDa) protein, a major specific substrate for protein kinase C, in rat brain. *The Journal of Neuroscience* 10, 1683-1698.

Paglini, G., Pigino, G., Kunda, P., Morfini, G., Maccioni, R., Quiroga, S., Ferreira, A., y Cáceres, A. (1998). Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth. *The Journal of Neuroscience* 18, 9858-9869.

Palestini, P., Botto, L., Guzzi, F., Calvi, C., Ravasi, D., Masserini, M., y Pitto, M. (2002). Developmental changes in the protein composition of sphingolipid- and cholesterol-enriched membrane domains of rat cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience Research* 67, 729-738.

Passalacqua, M., Patrone, M., Sparatore, B., Melloni, E., y Pontremoli, S. (1999). Protein kinase C-theta is specifically localized on centrosomes and kinetochores in mitotic cells. *The Biochemical Journal* 337 (Pt 1, 113-118).

Patrick, G.N., Zhou, P., Kwon, Y.T., Howley, P.M., y Tsai, L.H. (1998). p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 24057-24064.

Pigino, G., Paglini, G., Ulloa, L., Avila, J., y Cáceres, A. (1997). Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *Journal of Cell Science* 110 (Pt 2, 257-270).

Porumb, T., Crivici, A., Blackshear, P.J., y Ikura, M. (1997). Calcium binding and conformational properties of calmodulin complexed with peptides derived from myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) and MARCKS-related protein (MRP). *European Biophysics Journal : EBJ* 25, 239-247.

Prada, C., Puga, J., Pérez-Méndez, L., López, R., y Ramírez, G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *The European Journal of Neuroscience* 3, 559-569.

Prieto, D. (2012). Proteínas MARCKS en el pez cebra: caracterización y análisis funcional durante el desarrollo del sistema nervioso. Tesis de Mestría PEDECIBA, Universidad de la República, Uruguay.

Qin, Z., Wertz, S.L., Jacob, J., Savino, Y., y Cafiso, D.S. (1996). Defining protein-protein interactions using site-directed spin-labeling: the binding of protein kinase C substrates to calmodulin. *Biochemistry* 35, 13272-13276.

Ramsden, J.J. (2000). MARCKS: a case of molecular exaptation? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32, 475-479.

Rodríguez-Pena, A., Zachary, I., y Rozengurt, E. (1986). Rapid dephosphorylation of a Mr 80000 protein, a specific substrate of protein kinase C upon removal of phorbol esters, bombesin and vasopressin. *Bioph. Biochem. Res. Commun.* 140, 379-385.

Rombouts, K., Mello, T., Liotta, F., Galli, A., Caligiuri, A., Annunziato, F., y Pinzani, M. (2012). MARCKS actin-binding capacity mediates actin filament assembly during mitosis in human hepatic stellate cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 303, C357-67.

Romero, P., Obradovic, Z., y Dunker, A.K. (2004). Natively disordered proteins: functions and predictions. *Applied Bioinformatics* 3, 105-113.

- Rosen, A., Nairn, A.C., Greengard, P., Cohn, Z.A., y Aderem, A. (1989). Bacterial lipopolysaccharide regulates the phosphorylation of the 68K protein kinase C substrate in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* *264*, 9118–9121.
- Saeki, Y., Fraefel, C., Ichikawa, T., Breakefield, X.O., y Chiocca, E.A. (2001). Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. *Molecular Therapy* *3*, 591–601.
- Sasaki, Y., Cheng, C., Uchida, Y., Nakajima, O., Ohshima, T., Yagi, T., Taniguchi, M., Nakayama, T., Kishida, R., Kudo, Y., et al. (2002). Fyn and Cdk5 Mediate Semaphorin-3A Signaling, Which Is Involved in Regulation of Dendrite Orientation in Cerebral Cortex. *Neuron* *35*, 907–920.
- Scarlett, C.O., y Blackshear, P.J. (2003). Neuroanatomical development in the absence of PKC phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein. *Brain Research. Developmental Brain Research* *144*, 25–42.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* *9*, 676–682.
- Schoenwolf, G.C., Folsom, D., y Moe, A. (1988). A reexamination of the role of microfilaments in neurulation in the chick embryo. *The Anatomical Record* *220*, 87–102.
- Seki, K., Chen, H.C., y Huang, K.P. (1995). Dephosphorylation of protein kinase C substrates, neurogranin, neuromodulin, and MARCKS, by calcineurin and protein phosphatases 1 and 2A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *316*, 673–679.
- Shi, Y. (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* *139*, 468–484.
- Shiraishi, M., Tanabe, A., Saito, N., y Sasaki, Y. (2006). Unphosphorylated MARCKS Is Involved in Neurite Initiation Induced by Insulin-Like Growth Factor-I in SH-SY5Y Cells. *Journal of Cell Physiology* *1038*, 1029–1038.
- Shirao, T., y Obata, K. (1986). Immunochemical homology of 3 developmentally regulated brain proteins and their developmental change in neuronal distribution. *Brain Research* *394*, 233–244.
- Shirao, T. (1995). The roles of microfilament-associated proteins, drebrins, in brain morphogenesis; a review. *Journal of Biochemistry* *117* (2): 231–236.
- Smith, D.S., Greer, P.L., y Tsai, L.H. (2001). Cdk5 on the brain. *Cell Growth & Differentiation* *12*, 277–283.
- Smith, I.L., Hardwicke, M.A., y Sandri-Goldin, R.M. (1992). Evidence that the herpes simplex virus immediate early protein ICP27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression. *Virology* *186*, 74–86.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., y Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* *150*, 76–85.
- Snow, R.L., y Robson, J.A. (1994). Ganglion cell neurogenesis, migration and early differentiation in the chick retina. *Neuroscience* *58*, 399–409.
- Spizz, G., y Blackshear, P.J. (1997). Identification and characterization of cathepsin B as the cellular MARCKS cleaving enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* *272*, 23833–23842.
- Stumpo, D.J., Bock, C.B., Tuttle, J.S., y Blackshear, P.J. (1995). MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 944–948.
- Stumpo, D.J., Graff, J.M., Albert, K.A., Greengard, P., y Blackshear, P.J. (1989). Molecular cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding the “80- to 87-kDa” myristoylated alanine-rich C kinase substrate: a major cellular substrate for protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 4012–4016.

- Sutherland, C., Leighton, I.A., y Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *The Biochemical Journal* *296* (Pt 1, 15-19).
- Swierczynski, S.L., y Blackshear, P.J. (1995). Membrane association of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein. Mutational analysis provides evidence for complex interactions. *The Journal of Biological Chemistry* *270*, 13436-13445.
- Swierczynski, S.L., y Blackshear, P.J. (1996). Myristoylation-dependent and electrostatic interactions exert independent effects on the membrane association of the myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate protein in intact cells. *The Journal of Biological Chemistry* *271*, 23424-23430.
- Tanabe, A., Kamisuki, Y., Hidaka, H., Suzuki, M., Negishi, M., y Takawa, Y. (2006). PKC phosphorylates MARCKS Ser159 not only directly but also through RhoA/ROCK. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *345*, 156-161.
- Tanaka, E.M., y Ferretti, P. (2009). Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience* *10*, 713-723.
- Taniguchi, H., y Manenti, S. (1993). Interaction of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS) with membrane phospholipids. *The Journal of Biological Chemistry* *268*, 9960-9963.
- Taniguchi, H., Manenti, S., Suzuki, M., y Titani, K. (1994). Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), a major protein kinase C substrate, is an in vivo substrate of proline-directed protein kinase(s). A mass spectroscopic analysis of the post-translational modifications. *The Journal of Biological Chemistry* *269*, 18299-18302.
- Tapp, H., Al-naggar, I.M., Yarmola, E.G., Harrison, A., Shaw, G., Edison, A.S., y Bubb, M.R. (2005). MARCKS Is a Natively Unfolded Protein with an Inaccessible Actin-binding Site. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 9946-9956.
- Tatsumi, S., Mabuchi, T., Katano, T., Matsumura, S., Abe, T., Hidaka, H., Suzuki, M., Sasaki, Y., Minami, T., y Ito, S. (2005). Involvement of Rho-kinase in inflammatory and neuropathic pain through phosphorylation of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS). *Neuroscience* *131*, 491-498.
- Terasaki, M., Loew, L., Lippincott-Schwartz, J., y Zaal, K. (2001). Fluorescent staining of subcellular organelles: ER, Golgi complex, and mitochondria. *Current Protocols in Cell Biology* *Chapter 4*, Unit 4.4.
- Theis, T., Mishra, B., Von der Ohe, M., Loers, G., Prondzynski, M., Pless, O., Blackshear, P.J., Schachner, M., y Kleene, R. (2013). Functional role of the interaction between polysialic acid and Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate at the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A.C., y Aderem, A. (1991). Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* *351*, 320-322.
- Toledo, A. y Arruti, C. (2009). Actin modulation of a MARCKS phosphorylation site located outside the effector domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *383*, 353-357.
- Torres-Aleman, I. (2010). Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Developmental Neurobiology* *70*, 384-396.
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *76*, 4350-4354.
- Tripathi, B.K., y Zelenka, P.S. (2009). Cdk5-Dependent Regulation of Rho Activity , Cytoskeletal Contraction , and Epithelial Cell Migration via Suppression of Src. *Molecular Cell Biology* *29*, 6488-6499.
- Uberall, F., Giselsbrecht, S., Hellbert, K., Fresser, F., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H.H., y Baier, G. (1997). Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* *272*, 4072-4078.

- Uribe, R., y Jay, D. (2009). A review of actin binding proteins: new perspectives. *Molecular Biology Reports* 36, 121–125.
- Uversky, V.N. (2002). Natively unfolded proteins : A point where biology waits for physics. *Protein Science*, 739–756.
- Uversky, V.N. (2010). The mysterious unfoldome: structureless, underappreciated, yet vital part of any given proteome. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010, 568068.
- Uversky, V.N., y Dunker, A.K. (2010). Understanding protein non-folding. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1804, 1231–1264.
- Uversky, V.N., y Dunker, A.K. (2012). Multiparametric analysis of intrinsically disordered proteins: looking at intrinsic disorder through compound eyes. *Analytical Chemistry* 84, 2096–2104.
- Vesel, J., Havlicek, L., Strnad, M., Blow, J.J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D.S., Kato, J., Detivaud, L., y Leclerc, S. (1994). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 224, 771–786.
- Vicario, I., y Schimmang, T. (2003). Transfer of FGF-2 via HSV-1-based amplicon vectors promotes efficient formation of neurons from embryonic stem cells. *Journal of Neuroscience Methods* 123, 55–60.
- Volkov, Y., Long, A., McGrath, S., Ni Eidhin, D., y Kelleher, D. (2001). Crucial importance of PKC-beta (I) in LFA-1-mediated locomotion of activated T cells. *Nature Immunology* 2, 508–514.
- Vucetic, S., Brown, C.J., Dunker, A.K., y Obradovic, Z. (2003). Flavors of protein disorder. *Proteins* 52, 573–584.
- Vucetic, S., Xie, H., Iakoucheva, L.M., Oldfield, C.J., Dunker, A.K., Obradovic, Z., y Uversky, V.N. (2007). Functional anthology of intrinsic disorder. 2. Cellular components, domains, technical terms, developmental processes, and coding sequence diversities correlated with long disordered regions. *Journal of Proteome Research* 6, 1899–1916.
- Vääräniemi, J., Palovuori, R., Lehto, V.P., y Eskelinen, S. (1999). Translocation of MARCKS and reorganization of the cytoskeleton by PMA correlates with the ion selectivity, the confluence, and transformation state of kidney epithelial cell lines. *Journal of Cellular Physiology* 181, 83–95.
- Wang, J., Arbutova, A., Hangyás-Mihályiné, G., y McLaughlin, S. (2001). The effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate binds strongly to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 5012–5019.
- Wang, X.X., y Pfenninger, K.H. (2006). Functional analysis of SIRPalpha in the growth cone. *Journal of Cell Science* 119, 172–183.
- Weimer, J.M., Yokota, Y., Stanco, A., Stumpo, D.J., Blackshear, P.J., y Anton, E.S. (2009). MARCKS modulates radial progenitor placement, proliferation and organization in the developing cerebral cortex. *Development (Cambridge, England)* 136, 2965–2975.
- Weiss, L. (1988). *Celly Tissue Biology: A Textbook of Histology* (Urban & Schwarzenberg).
- Wiederkehr, A., Staple, J., y Caroni, P. (1997). The motility-associated proteins GAP-43, MARCKS, and CAP-23 share unique targeting and surface activity-inducing properties. *Experimental Cell Research* 236, 103–116.
- Wu, W.C., Walaas, S.I., Nairn, A.C., y Greengard, P. (1982). Calcium/phospholipid regulates phosphorylation of a Mr “87k” substrate protein in brain synaptosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 5249–5253.
- Xue, B., Dunbrack, R.L., Williams, R.W., Dunker, A.K., y Uversky, V.N. (2010). PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1804, 996–1010.
- Yamaguchi, H., Shiraishi, M., Fukami, K., Tanabe, A., Ikeda-Matsuo, Y., Naito, Y., y Sasaki, Y. (2009). MARCKS regulates lamellipodia formation induced by IGF-I via association with PIP2 and beta-actin at membrane microdomains. *Journal of Cellular Physiology* 220, 748–755.

- Yamamoto, H., Arakane, F., Ono, T., Tashima, K., Okumura, E., Yamada, K., Hisanaga, S., Fukunaga, K., Kishimoto, T., y Miyamoto, E. (1995). Phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) by proline-directed protein kinases and its dephosphorylation. *Journal of Neurochemistry* *65*, 802–809.
- Yamamoto, H., Matsumura, T., Kugiyama, K., Oishi, Y., Ogata, N., Yasue, H., y Miyamoto, E. (1998). The antibody specific for myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylated by protein kinase C: activation of protein kinase C in smooth muscle cells in human coronary arteries. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *359*, 151–159.
- Yamauchi, E., Kiyonami, R., Kanai, M., y Taniguchi, H. (1998). The C-terminal conserved domain of MARCKS is phosphorylated in vivo by proline-directed protein kinase. Application of ion trap mass spectrometry to the determination of protein phosphorylation sites. *The Journal of Biological Chemistry* *273*, 4367–4371.
- Yamauchi, E., Nakatsu, T., Matsubara, M., Kato, H., y Taniguchi, H. (2003). Crystal structure of a MARCKS peptide containing the calmodulin-binding domain in complex with Ca²⁺-calmodulin. *Nature Structural Biology* *10*, 226–231.
- Yang, L., y Glaser, M. (1996). Formation of membrane domains during the activation of protein kinase C. *Biochemistry* *35*, 13966–13974.
- Yarmola, E.G., Edison, A.S., Lenox, R.H., y Bubb, M.R. (2001). Actin filament cross-linking by MARCKS: characterization of two actin-binding sites within the phosphorylation site domain. *The Journal of Biological Chemistry* *276*, 22351–22358.
- Yokoyama, Y., Ito, T., Hanson, V., Schwartz, G.K., Aderem, A.A., Holland, J.F., Tamaya, T., y Ohnuma, T. (1998). PMA-induced reduction in invasiveness is associated with hyperphosphorylation of MARCKS and talin in invasive bladder cancer cells. *International Journal of Cancer* *75*, 774–779.
- Yu, Y., Run, X., Liang, Z., Li, Y., Liu, F., Liu, Y., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., y Gong, C.-X. (2009). Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *Journal of Neurochemistry* *108*, 1480–1494.
- Zelenka, P.S. (2004). Regulation of cell adhesion and migration in lens development. *The International Journal of Developmental Biology* *48*, 857–865.
- Zhang, D., Kanthasamy, A., Yang, Y., Anantharam, V., y Kanthasamy, A. (2007). Protein kinase C delta negatively regulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis by enhancing protein phosphatase-2A activity in dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience*, *27*, 5349–5362.
- Zolessi, F. R. (1997). Marcadores moleculares en la histogénesis de la retina: una aproximación utilizando anticuerpos monoclonales. Tesis de Mestría PEDECIBA, Universidad de la República, Uruguay.
- Zolessi, F.R., y Arruti, C. (2001a). Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in the chick embryo. *BMC Developmental Biology* *1*, 7.
- Zolessi, F.R., y Arruti, C. (2001b). Sustained phosphorylation of MARCKS in differentiating neurogenic regions during chick embryo development. *Brain Research. Developmental Brain Research* *130*, 257–267.
- Zolessi, F. R. (2003). Transducción intracelular de señales durante el desarrollo del sistema nervioso: rol de la proteína MARCKS. Tesis de Doctorado PEDECIBA, Universidad de la República, Uruguay.
- Zolessi, F.R., y Arruti, C. (2004). MARCKS in advanced stages of neural retina histogenesis. *Developmental Neuroscience* *26*, 371–379.
- Zolessi, F.R., Durán, R., Engström, U., Cerveñansky, C., Hellman, U., y Arruti, C. (1998). Identification of the chicken MARCKS phosphorylation site specific for differentiating neurons as Ser 25 using a monoclonal antibody and mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* *3*, 84–90.
- Zolessi, F.R., Hellman, U., Baz, A., y Arruti, C. (1999). Characterization of MARCKS (Myristoylated alanine-rich C kinase substrate) identified by a monoclonal antibody generated against chick embryo neural retina. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *257*, 480–487.