

Tesis para optar por el título de  
Doctora en Biología Molecular y Biotecnología

**Identificación y caracterización de ligandos/proteínas  
que interactúen con los dominios extracelulares de la  
glicoproteína de membrana neuronal M6a**

Lic. Gabriela Inés Aparicio

Directora: Dra. Camila Scorticati

Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas

“Dr. Rodolfo Ugalde”

Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN)

Universidad Nacional de San Martín

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

UNSAM - CONICET

30 de Marzo 2022

## Resumen

Actualmente, hay muchos trabajos que tratan de comprender los mecanismos moleculares que conducen a la plasticidad neuronal. Más aún, identificar las vías de señalización involucradas en el desarrollo de desórdenes neuropsiquiátricos contribuye a identificar posibles proteínas blanco para su diagnóstico y tratamiento. En este sentido, se han relacionado variantes génicas o alteraciones en la expresión de *GP6MA* con esquizofrenia, depresión y la enfermedad de Alzheimer. *GPM6A* codifica para la glicoproteína de membrana neuronal M6a, la cual promueve la formación de filopodios / espinas, dendritas y sinapsis por mecanismos que aún no están completamente descritos. La evidencia experimental sugiere que son los dominios extracelulares de M6a los que dirigen su función neuroplástica. Sin embargo, las proteínas que interactúan con estos dominios y así modifican su función aún no se han caracterizado. Por lo tanto, con el fin de identificar estas proteínas, generamos una proteína recombinante que sólo expresa los dominios extracelulares de M6a (*M6a-loops*). Luego realizamos una co-inmunoprecipitación entre *M6a-loops* y muestras de hipocampo de rata seguido de espectrometría de masas cuantitativa (TMT-MS). A partir del análisis de datos identificamos 72 proteínas que son candidatas a asociarse con los dominios extracelulares de M6a. El análisis de enriquecimiento de genes según su ontología mostró que el 63 % de estas proteínas pertenecen a la categoría “sinapsis”, 51 % a “proyecciones neuronales” y 49 % a “pre-sinapsis”. En este sentido, mostramos que M6a se asocia con piccolo, la proteína de vesícula sináptica 2B y sinapsina 1 en cultivo primario de neuronas de hipocampo. Sorprendentemente, el 28 % de estas proteínas fueron clasificadas como “vaina de mielina”, lo que sugiere que M6a podría asociarse con proteínas de la membrana de oligodendrocitos. De hecho, demostramos la asociación (tanto en *cis* como en *trans*) de M6a con PLP en un modelo de sobre-expresión en células N2a. El análisis de enriquecimiento y asociación a enfermedades realizado por DisGeNET mostró que la mayoría de las 72 proteínas candidatas están asociadas tanto con trastornos en los que M6a ya ha sido involucrada, como con

algunos que son novedosos como ser: "epilepsia" y "convulsiones"; lo que aumenta el espectro de trastornos en los que M6a podría desempeñar un papel. Finalmente, la expresión y función de M6a fuera del cerebro aún no se ha estudiado. En este sentido, evaluamos la expresión de M6a en cultivo primario de neuronas de médula espinal de rata y en cultivo primario de explantos de ganglios de la raíz dorsal (DRG). Encontramos evidencia inmunocitoquímica de que M6a se expresa tanto en axones centrales como periféricos. Los datos están disponibles a través del servidor ProteomeXchange con el identificador PXD017347.

<http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PXD017347-1&test=no>

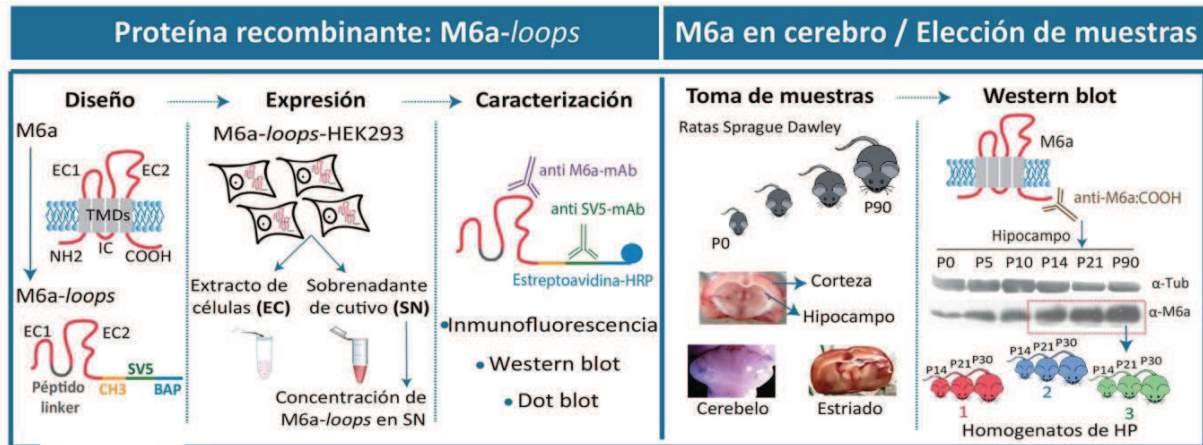
**Palabras clave:** GPM6A, familia proteínas proteolípídicas, proteínas sinápticas, interacción proteína-proteína, espectrometría de masas.

## Abstract

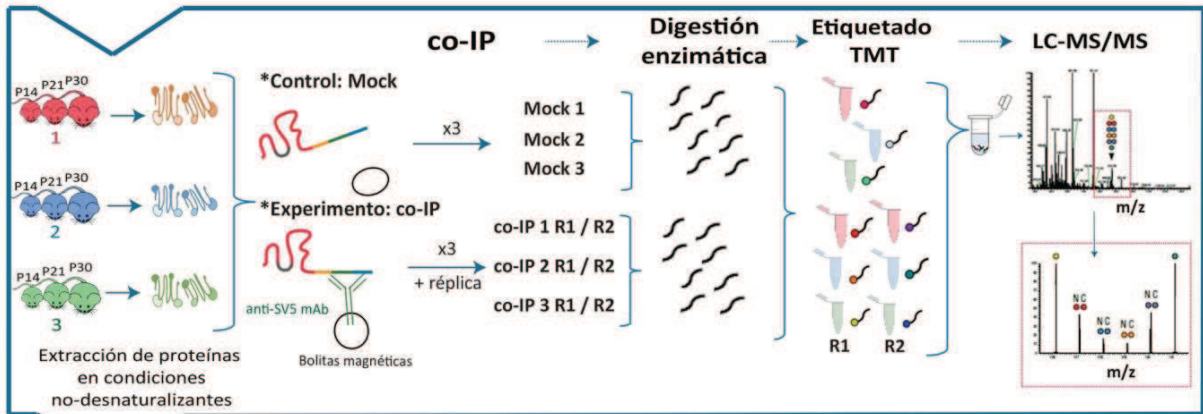
Nowadays, great efforts are made to gain insight into the molecular mechanisms that underlie structural neuronal plasticity. Moreover, the identification of signaling pathways involved in the development of psychiatric disorders aids the screening of potential therapeutic targets. Genetic variations or alterations in *GPM6A* expression are linked to neurological disorders such as schizophrenia, depression, and Alzheimer's disease. *GPM6A* encodes the neuronal surface glycoprotein M6a that promotes filopodia / spine, dendrite, and synapse formation by unknown mechanisms. Evidence suggests that the extracellular loops of M6a are responsible for its neuroplastic function. However, the proteins that could associate with them and together modulate neuronal plasticity have not been determined yet. To address this question, we generated a chimera protein that only contains the extracellular loops of M6a (M6a-loops) and performed a co-immunoprecipitation with rat hippocampus samples followed by TMT-MS. Data analysis revealed 72 candidate proteins likely to interact with M6a's extracellular loops. Gene ontology (GO) analysis showed that 63 % of the potential M6a's interactor proteins belong to the category "synapse," "neuron projections" (51 %) and "presynapse" (49 %). In this sense, we showed that endogenous M6a interacts with piccolo, synaptic vesicle protein 2B, and synapsin 1 in mature cultured hippocampal neurons. Interestingly, about 28 % of the proteins left were related to the "myelin sheath" annotation, suggesting that M6a could interact with proteins at the surface of oligodendrocytes. Indeed, we demonstrated the (cis and trans) interaction between M6a and proteolipid protein (PLP) in N2a cells. A disease-associated genes and variants screening by DisGeNET revealed that most of the 72 candidate proteins are associated with disorders in which M6a has already been involved with. Also, these proteins are related to "epilepsy" and "seizures", increasing the spectrum of disorders in which M6a could play a role. Since the expression and function of M6a outside the brain remains unknown; we evaluated the expression of M6a in cultured rat spinal cord neurons and whole explant cultures from dorsal root ganglia (DRG). We found immunochemical evidence that M6a is expressed in both central and peripheral axons. Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD017347.

**Keywords:** GPM6A, proteolipid protein family, synaptic proteins, protein-protein interactions, mass spectrometry.

# Resumen gráfico



## co-Immunoprecipitación ---> Espectrometría de masas: TMT-MS



## Análisis bioinformático ---> Confirmación de resultados

