

Resumen

El gen *Gpm6a* fue identificado como un gen de respuesta al estrés en animales sometidos a diferentes modelos de estrés crónico. En humanos, diferentes patologías neuropsiquiátricas se han asociado con alteraciones en los niveles de expresión y en la secuencia de *GPM6A*. La glicoproteína de membrana neuronal Gpm6a pertenece a la familia de proteínas proteolipídicas PLP/DM20 y se expresa abundantemente en neuronas del sistema nervioso central. Participa en procesos de desarrollo neuronal como la formación de filopodios, el crecimiento de neuritas, la formación de espinas dendríticas, así como también participa en la sinaptogénesis. El mecanismo de acción por el cual Gpm6a ejerce su función neuroplástica no se conoce con claridad.

Dado que las vías de endocitosis y de reciclado de las proteínas de membrana cumplen un papel fundamental en el desarrollo neuronal y que Gpm6a se clasifica en diferentes compartimentos intracelulares de membrana favoreciendo la plasticidad neuronal, resulta relevante estudiar los procesos de tráfico intracelular de Gpm6a que pueden mediar su función neuroplástica. En este sentido, previamente nuestro grupo demostró que el carboxi-terminal de Gpm6a participa en el proceso de formación de filopodios y en particular se identificó al residuo E258 como clave para el proceso. Este residuo pertenece a la secuencia consenso de fosforilación para la proteína quinasa CK2 y a la secuencia que se ajusta al motivo de tráfico intracelular de la señal de clasificación basada en leucina. Además, se demostró que la sobreexpresión de la forma mutada de Gpm6a, E258A, en células de neuroblastoma N2a no induce la formación de filopodios y disminuye la cantidad de Gpm6a en la superficie celular a la vez que aumenta la acumulación de la proteína en los compartimentos intracelulares indicando que el tráfico intracelular podría verse afectado por esta mutación. Por otro lado, en un trabajo previo se identificó al regulador de actina, coronina 1a (Coro1a) como proteína que interactúa con Gpm6a y se determinó que el carboxi-terminal de Gpm6a está involucrado. Coro1a, un importante regulador del tráfico vesicular en neuronas, coinmunoprecipita y colocaliza con Gpm6a endógena favoreciendo la formación de filopodios. Se demostró que la reducción en la expresión de Coro1a endógena utilizando ARN de interferencia al igual que la sobreexpresión de la forma dominante-negativa de Coro1a (Coro1a-(WD1-5)) inhiben la formación de filopodios inducida por Gpm6a.

Teniendo en cuenta los resultados previos del laboratorio, en el presente trabajo de tesis nos propusimos caracterizar, en neuronas de hipocampo de rata, el rol del residuo

E258 y de Coro1a en el tráfico intracelular de Gpm6a y, por ende, en su función neuroplástica.

Para ello llevamos a cabo dos análisis. Por un lado, evaluamos el efecto de la mutación del residuo E258 por alanina en la morfología de las neuronas y en la cantidad y la distribución de las estructuras intracelulares (puntos) Gpm6a positivas, así como la identificación de los compartimentos endosomales al que pertenecen. Por el otro, llevamos a cabo la identificación del compartimento endosomal al que pertenecen los puntos Gpm6a y Coro1a positivos, así como evaluamos el efecto de la reducción de la expresión de Coro1a endógena en el tráfico intracelular de Gpm6a.

En este trabajo reconfirmamos que en neuronas de hipocampo de rata en cultivo la sobreexpresión de la mutante E258A no induce la formación de filopodios característica de Gpm6a silvestre. A su vez, demostramos que disminuye la complejidad de la arborización neuronal indicando su rol en la morfogénesis neuronal. Demostramos que afecta la distribución de los puntos Gpm6a positivos, al localizarse preferentemente en la región proximal (0-20 μm del soma) de las neuritas y aumenta la colocalización con los endosomas Lamp1 positivos.

Con respecto a Coro1a, demostramos que en neuronas hipocampales en cultivo Gpm6a colocaliza con Coro1a en neuritas tanto a nivel proximal como distal, siendo mayor la colocalización a nivel proximal. El análisis de colocalización de los puntos Gpm6a y Coro1a positivos con el marcador de endosomas tardíos/lisosomas, Lamp1, mostró que es mayor a nivel proximal que distal, correspondiéndose con la distribución preferencial de los compartimentos intracelulares Lamp1 positivos. Con respecto a los ensayos de la reducción de la expresión de Coro1a endógena se necesitan realizar experimentos adicionales para poder obtener resultados concluyentes.

PALABRAS CLAVES: Gpm6a – Tráfico intracelular/endocítico – Formación de filopodios – Morfogénesis neuronal – Residuo E258 – Coronina 1a.

Abstract

The Gpm6a gene was identified as a stress responsive gene in animals subjected to different models of chronic stress. In humans, different neuropsychiatric pathologies have been associated with alterations in the expression levels and sequence of GPM6A. The neuronal membrane glycoprotein Gpm6a belongs to the PLP/DM20 family of proteolipid proteins and is abundantly expressed in neurons of the central nervous system. It is involved in neuronal developmental processes such as filopodia formation, neurite outgrowth, dendritic spine formation, as well as synaptogenesis. The mechanism of action by which Gpm6a exerts its neuroplastic function is not clearly understood.

Given that endocytosis and recycling pathways of membrane proteins play a fundamental role in neuronal development and that Gpm6a is sorted into different intracellular membrane compartments favoring neuronal plasticity, it is relevant to study the intracellular trafficking processes of Gpm6a that may mediate its neuroplastic function. In this sense, our group has previously demonstrated that the carboxy-terminus of Gpm6a participates in the process of filopodia formation and in particular the residue E258 was identified as a key residue for the process. This residue belongs to the phosphorylation consensus sequence for the protein kinase CK2 and to the sequence that matches the intracellular trafficking motif of the leucine-based sorting signal. Furthermore, it has been shown that the overexpression of the mutated form of Gpm6a, E258A, in neuroblastoma cells N2a fails to induce filopodia formation and decreases the amount of Gpm6a on the cell surface while it increases the accumulation of the protein in intracellular compartments indicating that intracellular trafficking could be affected by this mutation. On the other hand, our previous work identified the actin regulator, coronin 1a (Coro1a) as a Gpm6a-interacting protein and determined that the carboxy-terminus of Gpm6a is involved. Coro1a, an important regulator of vesicular trafficking in neurons, co-immunoprecipitates and colocalizes with the endogenous Gpm6a favoring filopodia formation. Reduced expression of the endogenous Coro1a using RNA interference as well as the overexpression of the dominant-negative form of Coro1a (Coro1a-(WD1-5)) was shown to inhibit Gpm6a-induced filopodia formation.

Taking into account previous results from the laboratory, in the present thesis we set out to characterize the role of the residue E258 and Coro1a in the intracellular trafficking of Gpm6a and, thus, in its neuroplastic function in rat hippocampal neurons.

For this purpose, we performed two analyses. On one hand, we evaluated the effect of replacement of the E258 residue by alanine on the morphology of neurons and on the amount and distribution of Gpm6a-positive intracellular structures (puncta), as well as we performed the identification of the endosomal compartments to which they belong. On the other hand, we carried out the identification of the endosomal compartment to which the Gpm6a and Coro1a-positive puncta belong, as well as evaluated the effect of the reduction of endogenous Coro1a expression on the intracellular trafficking of Gpm6a.

In this work we reconfirm that in cultured rat hippocampal neurons overexpression of the E258A mutant fails to induce formation of filopodia characteristic for the wild-type Gpm6a. Furthermore, we show that it decreases the complexity of neuronal arborization indicating its role in neuronal morphogenesis. We also show that it affects the distribution of Gpm6a-positive puncta by preferentially localizing to the proximal region (0-20 μm from the soma) of neurites and increases colocalization with Lamp1-positive endosomes.

With respect to Coro1a, we demonstrate that in cultured hippocampal neurons Gpm6a colocalizes with Coro1a in neurites both proximally and distally, with greater colocalization at the proximal level. Colocalization analysis of Gpm6a and Coro1a-positive puncta with the late endosome/lysosome marker, Lamp1, showed that it is greater proximally than distally, corresponding with the preferential distribution of Lamp1-positive intracellular compartments to the proximal region of neurites. With respect to the assays with reduced endogenous Coro1a expression additional experiments need to be performed in order to obtain conclusive results.

Keywords: Gpm6a - Endocytic trafficking - Filopodia formation - Neuronal morphogenesis - Aminoacid residue E258 - Coronin 1a.