

LA PROTEÍNA MARCKS EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO: UN PUNTO DE ENCUENTRO ENTRE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

Zolessi, F.R. y Arruti, C.

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

La proteína MARCKS ha sido señalada como centro de interacción de varias vías de transducción de señales. Es sustrato de proteína quinasas como PKCs, MAPKs y CdKs y se une a calcio-calmodulina, a actina-F y a PIP₂. Hemos identificado una fracción fosforilada de MARCKS, exclusiva de neuronas, reconocida por un anticuerpo monoclonal generado en nuestro laboratorio: el Acm3C3. Mediante espectrometría de masa y usando péptidos sintéticos, identificamos el sitio de fosforilación reconocido por el anticuerpo como una serina ubicada en una secuencia consenso para quinasas dirigidas por prolina (PDKs). Encontramos que esta fosforilación de MARCKS es regulada durante el desarrollo, siendo evidente en neuronas desde muy poco después de su última mitosis. Durante la histogénesis de la retina neural, fosfo-MARCKS está presente en todas las capas, pero más tarde, en etapas finales del desarrollo (embrionario y post-natal), sufre una restricción a algunos tipos celulares. En los fotorreceptores observamos, además, una desaparición progresiva de MARCKS total. Tanto en neuroblastos como en células gliales de retina en cultivo, encontramos que MARCKS es muy abundante y se distribuye en parches en toda la superficie celular, que colocalizan con PIP₂. Fosfo-MARCKS colocaliza con MARCKS total en neuroblastos, pero es indetectable en la glía. Finalmente, detectamos la presencia de MARCKS total y fosforilada en fracciones subcelulares enriquecidas en "rafts" de membrana. Nuestros hallazgos sugieren la existencia de un mecanismo de activación sostenida de PDKs, capaces de fosforilar MARCKS en neuronas, en un sitio que no parece afectar la relación de la proteína con la membrana.

CARACTERIZACIÓN DE DOMINIOS RIBOSOMALES (PLACAS PERI-AXOPLÁSMICAS) EN AXONES MIELÍNICOS

Sotelo Silveira, J.R.^{1,2}, Calliari, A.³, Koenig, E.⁴, Sotelo, J.R.³

¹ Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias

² Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto Clemente Estable

³ Laboratorio de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto Clemente Estable

⁴ Department of Physiology & Biophysics, SUNY at Buffalo, USA.

Los territorios citoplásmicos de una neurona son altamente dependientes de la síntesis de macromoléculas del soma neuronal. Sin embargo, los territorios dendrítico y axonal, poseen la capacidad de sintetizar ciertas proteínas localmente. En el caso del axón, dicha capacidad a sido demostrada por métodos bioquímicos. Sin embargo, el sitio o la distribución de la maquinaria traduccional en los axones permaneció elusiva hasta que Koenig & Martín (J.Neurosci.16:1400) describieron una nueva estructura, a la que llamaron "Placa Peri-Axoplásmica" (**PPA**), que poseía acúmulos de ARN y partículas tipo ribosomas. El objetivo del presente trabajo era la caracterización estructural y funcional de estos nuevos dominios axonales. Como modelo experimental se utilizaron "wholemounds" de axoplasma de axones mielínicos de vertebrados adultos (peces dorados, rata y conejo). Mediante aproximaciones inmunohistoquímicas se demostró que las PPA poseen ARN ribosomal y proteínas ribosomales. Utilizando hibridización in situ y RT-PCR se ha demostrado que en estos lugares se encuentra el ARNm codificante para la beta actina. ESTs generadas a partir de ARN de axón indicarían la presencia de ARN ribosomal, ARNm mitocondriales y varios ARNm citoplásmicos. La dinámica de las PPA fue analizada buscando las proteínas motores Miosina V, Kinesina y Dineina, mediante inmunohistoquímica. Hasta el momento se ha observado que las dos primeras se localizan en las PPA. Tomando estas evidencias en conjunto, es altamente probable que estas estructuras sean sitios de síntesis de proteínas axonales donde ocurre un intercambio dinámico con el axoplasma, tanto para localizar los elementos necesarios para la traducción como para redistribuir sus productos.

Apoyado por: PEDECIBA, CSIC, NSF.

MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA POR PROTEÍNAS EXTRACELULARES

*Olivera, S.*¹, *Henley, J.M.*² y *Rodríguez-Ithurralde, D.*¹

¹ Unidad de Neurociencia Molecular y Farmacología, Instituto Clemente Estable. Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay. E-mail: drit@iibce.edu.uy

² MRC Centre for Synaptic Plasticity, University of Bristol, Inglaterra.

La estricta modulación del tránsito intracelular, inserción superficial y vida media de los receptores glutamatérgicos (GluRs) es clave para el desarrollo y la función del SNC. Aunque se conocen numerosas proteínas intracelulares responsables del reclutamiento y anclaje sináptico de los GluRs, los factores extracelulares que inician su agregación y facilitan la formación de las sinapsis centrales no han sido totalmente identificados. Dada la homología de la acetilcolinesterasa (AChE) con proteínas cruciales para la sinaptogénesis hemos propuesto que las acciones sinaptogénicas que se le atribuyen a la AChE podrían explicarse por interacciones con los GluRs. Empleando técnicas radioquímicas, quimeras adenovirus-GFP-GluR1-4, inmunocitoquímica con anticuerpos específicos y microscopía confocal, hemos demostrado que la AChE: (1) aumenta selectivamente el binding de agonistas a los receptores AMPA en forma dependiente de la concentración, región cerebral y etapa del desarrollo; (2) acelera su translocación y expresión dendrítica en neuronas en cultivo; (3) aumenta su expresión sináptica en neuronas postnatales; (4) incrementa la longitud y el número de dendritas en función de la concentración y el desarrollo; y (5) potencia significativamente la expresión de marcadores sinápticos. La interacción AChE-receptor AMPA que aquí reportamos podría ser un mecanismo molecular subyacente a los aumentos de expresión de los receptores AMPA que ocurren durante el “encendido” de las sinapsis silenciosas, la plasticidad sináptica dependiente de actividad, la formación de memoria y la neurotoxicidad. Nuestros resultados muestran además que la AChE posee acciones morfogénicas y sinaptogénicas que podrían explicarse por interacciones proteína-proteína con conocidas moléculas de adhesión neuronal.

Financiado por PEDECIBA Biología y MRC (UK)

BASES MOLECULARES DE LA O-GLICOSILACIÓN SIMPLE EN PARÁSITOS

Freire, T.¹, Robello, C.¹, Casaravilla, C.², Fernández, C.³, Carmona, C.², Osinaga, E.¹

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

²Unidad de Biología Parasitaria, Facultad de Ciencias

³Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

Los parásitos infectan millones de personas en el mundo, causando a menudo afecciones crónicas asociadas con alta morbilidad. Por otra parte, algunos de ellos son altamente prevalentes en animales importantes para el sector productivo, produciendo pérdidas anuales estimadas en 10 mil millones de dólares. Los glicoconjugados juegan un papel crítico en la interacción de los parásitos con su huésped, por ejemplo, evadiendo la respuesta inmune, inhibiendo la proliferación celular T o promoviendo respuestas autoinmunitarias. Recientemente hemos obtenido la primera evidencia de la presencia de O-glicosilación incompleta (antígeno Tn) y de actividad UDP-GalNAc-peptidil N-acetilgalactosaminiltransferasa (ppGalNAc-T) en parásitos helmintos y protozoarios. El antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr), una de las estructuras más específicas asociadas a cáncer en humanos, se expresa en cadenas O-glicosídicas de las células cancerosas debido al bloqueo en la biosíntesis de las mismas. Las ppGalNAc-Ts son enzimas que atraen gran interés por ser las reguladoras del inicio de la O-glicosilación de proteínas. Algunas de estas enzimas podrían jugar un papel crítico para la vida celular, demostrándose que la ausencia de expresión de una ppGalNAc-T impide el desarrollo de la *Drosophila melanogaster*. La caracterización funcional de ppGalNAc-Ts individuales, así como la identificación de las secuencias peptídicas que constituyen sus sustratos naturales, debería aportar las bases para comprender la regulación de la biosíntesis de O-glicanos en parásitos helmintos. En la dilucidación de las bases moleculares del comportamiento parasitario se sustentan las expectativas de mejores diagnósticos y, particularmente, del desarrollo de tratamientos efectivos de estas enfermedades.