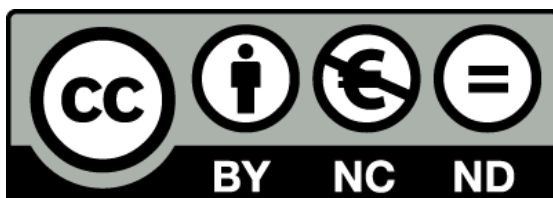

Tesis doctoral

Papel de CPT1C en el desarrollo axonal y en el transporte de los endosomas tardíos

Marta Palomo Guerrero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This doctoral thesis is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

**PAPEL DE CPT1C EN EL DESARROLLO AXONAL Y EN
EL TRANSPORTE DE LOS ENDOSOMAS TARDÍOS**

MARTA PALOMO GUERRERO

2018



PAPEL DE CPT1C EN EL DESARROLLO AXONAL Y EN EL TRANSPORTE DE LOS ENDOSOMAS TARDÍOS

Memoria de la tesis doctoral presentada por Marta Palomo Guerrero, para optar al título de doctor por la Universitat Internacional de Catalunya.

Trabajo realizado en el Departamento de Ciencias Básicas de la Universitat Internacional de Catalunya, bajo la dirección de la doctora Núria Casals Farré y codirigido por la doctora María del Carmen Grijota Martínez.

Sant Cugat del Vallés, 2018

Dra. Núria Casals Farré

Directora de tesis

Dra. Maria del Carmen Grijota Martínez

Codirectora de tesis

Marta Palomo Guerrero

Doctoranda

“Lo esencial es invisible a los ojos”

(El principito)



AGRADECIMIENTOS

Porque se valoran más las cosas cuando se consiguen con esfuerzo. No ha sido fácil el camino, pero como alguien me dijo una vez “la dificultad de la pendiente no te deja ver el camino aprendido, eso solo se ve cuando llegas al final”. Por eso quiero agradecer a toda esa gente que ha formado parte de este camino, a veces tan cuesta arriba pero tan gratificante.

Gracias a mi directora, Nuria, por confiar en mí, por darme la oportunidad de trabajar en el grupo neurolípidos y por hacerme parte del grupo “SIPITI”. Por ayudarme a crecer tanto a nivel profesional como personal.

Una figura importante en mi camino hasta aquí ha sido MC Grijota, la “Jefesita”. Mi formación se debe a ti. Porque si algo le agradezco al UTP es haber podido trabajar contigo. Cuando llegué, como una niña a un cole nuevo, me acogiste como una hermana mayor, arropándome y ayudándome. Solo puedo darte las gracias por todas las cosas que me has enseñado, por todos tus consejos, no solo a nivel científico, sino también a nivel personal. Por la paciencia que has demostrado conmigo, por las horas de trabajo que me has dedicado. Por dejarme aprender de ti. Gracias por calmarme y ayudarme a relativizar los problemas, a mirarlos desde otro punto de vista. Gracias por seguir estando ahí.

Gracias a los miembros del grupo, por su apoyo y por su ayuda para pensar y desarrollar ideas. A los que se fueron, por acogerme en la primera etapa, Sara, Jordi, Maca y Xavi. Gracias al Cuquitandem: Maria y Cris, a Helena, a Rut, a Bea por su disposición siempre a echar un cable, a Miguel por sus ganas de trabajar. Y por supuesto a Rosalía, gracias por el apoyo que me has dado desde que llegaste, por las cervecitas y las risas.

Gracias a Josep Clotet y a sus fieles, Laura, Nuria, Eli, Gaetano, Mariana. A Javi por enseñarme que los chistes malos también tienen su gracia. A Bob por las horas imprudentes compartidas en el labo. A Reyes por las conversaciones de entendimiento chipionero. Samu, por enseñarme a clonar y el magnífico mundo de los santhilaris (aún nos quedan...). A Nati por su apoyo y consejos. A Abril por sus

ganas de aprender y trabajar, por el apoyo que ha supuesto en muchas ocasiones dentro y fuera del laboratorio, por lo que hemos reído y llorado juntas.

A Marta, Sara, Eva y Bárbara. Lo que me he ahorrado en psicólogos con vosotras y la de cosas que ha resuelto una cerveza. Gracias por el apoyo dentro y fuera de la ciencia por los días de playa, viajes, salidas y por tantas cosas que me habéis aportado en estos años, gracias por hacerlo tan fácil, por las risas continuas y por demostrarme que uno no solo es del sitio en el que nace. A mi gemeliera en especial por tantas tonterías y bucles compartidos, dentro y fuera del labo, porque sé que me llevo una hermana, gracias por ser tan auténtica.

Al grupo de la UB, a Laura Herrero y Dolors Serra por sus aportaciones en los seminarios.

Gracias a los compañeros de Oslo por esclarecer mis dudas. A Marta y Nacho que fueron como una luz en Noruega. A Harald por permitirme entrar en su laboratorio.

Gracias a la familia postiza de Sant Cugat a Carmen, Montse, Gracia y José Andrés, por cuidarme y hacerme reír tanto.

Gracias a mis padres que sufrieron mi escapada de casa y que tanto les está costando acostumbrarse. Por sus sufrimientos y por sus llamadas incondicionales. Porque quiero ser un reflejo de ellos. A ti mamá, por tu sacrificio y esfuerzo constante, por tu lucha para que no me desviara nunca del camino. Por preocuparte tanto por mí, estando lejos. Y a ti papá, que eres un trabajador nato, por enseñarme que las cosas no se regalan, se consiguen con trabajo y esfuerzo. Por repetirme una y otra vez que “la paciencia es la madre de la ciencia, y que si no fuera así, no quedarían cosas por descubrir”.

A mi hermano Fran y Dani por sus llamadas, por el amor incondicional de hermanos, por la complicidad, y porque pase lo que pase, siempre seremos tres. A mi tía Katy, por ayudarme desde la distancia siempre que lo he necesitado. A Ángela por formar parte de esta familia.

A mis farmacéuticas de Sevilla por demostrar que vale la pena volver y encontrarse con ellas, por las cervecitas al sol, por las llamadas que duran horas, porque desde la distancia también he sentido su apoyo, por ello gracias: Inma, Marta, Aitana, Elena, Clara y Ángeles. A Antonio por mantener la amistad que nos une, aun estando lejos.

A todos vosotros, que habéis conseguido que este camino sea más fácil.

A mis padres,



PRESENTACIÓN

La paraplejía espástica hereditaria agrupa un conjunto de desórdenes neurodegenerativos caracterizados por espasticidad y rigidez muscular. Todos ellos están relacionados clínica y patológicamente con problemas en el desarrollo axonal del tracto corticoespinal y las columnas dorsales de la médula espinal.

Hasta la fecha se han descrito 77 genes asociados a esta enfermedad. Sus mutaciones afectan a diversas funciones celulares como el transporte intracelular, la función mitocondrial o el metabolismo lipídico, entre otras. Entre estos genes se encuentra CPT1C.

CPT1C es una carnitina palmitoil transferasa que se encuentra localizada en el RE de neuronas. A diferencia del resto de CPTs, CPT1C no presenta actividad catalítica pero mantiene la capacidad de unir malonil-CoA. El malonil-CoA es un intermediario en la síntesis de ácidos grasos, y sus niveles varían según el estado energético de la célula. Recientemente se ha sugerido que CPT1C podría ser un sensor de malonil-CoA y regular la función de otras proteínas.

Entre las posibles proteínas interactoras de CPT1C se encuentra la protrudina. Se ha descrito el papel de la protrudina en el transporte y desarrollo axonal, pero no cuál es su mecanismo regulador. En esta tesis proponemos que CPT1C podría interactuar con protrudina y, mediante la unión a malonil-CoA, regular el transporte y desarrollo axonal. Para ello se han realizado dos aproximaciones. En primer lugar se ha estudiado la implicación de CPT1C en el crecimiento axonal y dendrítico en neuronas corticales procedentes de embriones de ratones WT y KO CPT1C. En segundo lugar se ha estudiado la interacción de CPT1C con protrudina y su papel en la localización y transporte de endosomas tardíos en células HeLa. En ambas aproximaciones se ha estudiado la influencia de la unión de malonil-CoA a CPT1C.

Los resultados obtenidos demuestran que CPT1C es necesaria para el correcto crecimiento axonal y ramificación dendrítica dependiendo de su unión a malonil-CoA.

En este trabajo hemos podido demostrar además la interacción de CPT1C con protrudina, y describir su papel en la regulación de la localización y transporte de LEs, función que se encuentra regulada por la unión de malonil-CoA.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se intenta avanzar en la comprensión del papel que juega CPT1C en la paraplejía espástica hereditaria.



ÍNDICE

ABREVIATURAS

Abreviaturas.....	1
-------------------	---

INTRODUCCIÓN

1. Sistema carnitina palmitoil transferasa (CPT).....	7
2. CPT1C.....	10
2.1 Actividad catalítica y regulación	10
2.2 Actividad motora y paraplejía espástica hereditaria	12
2.3 Otras funciones	15
3. Paraplejía espástica hereditaria	19
4. Desarrollo axonal.....	22
5. Endosomas.....	24
5.1 Endocitosis	24
5.2 Endosomas tempranos	25
5.3 Endosomas tardíos	25
6. Transporte axonal de LEs.....	29
7. Protrudina.....	32
7.1 Estructura.....	32
7.2 Función.....	34

HIPÓTESIS

Hipótesis.....	37
----------------	----

OBJETIVOS

Objetivos.....	41
----------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Construcciones plasmídicas.....	47
2. Líneas celulares.....	52
3. Cuantificación y detección de proteínas	58
4. Interacción de proteínas.....	61
5. Cultivos primarios de neuronas corticales.....	64
6. Análisis estadístico.....	66

RESULTADOS

1. Papel de CPT1C en el crecimiento axonal y desarrollo dendrítico	69
1.1 Papel de CPT1C en el crecimiento axonal.....	69
1.2 Papel de CPT1C en la ramificación dendrítica	72
1.3 Implicación de CPT1C en la polarización celular	74
1.4 Reversión del crecimiento axonal en neuronas KO CPT1C.....	75

1.5 Papel de CPT1C en el crecimiento axonal en relación con el estado energético	76
1.6 Implicación de CPT1C en el desarrollo y morfología de los conos de crecimiento	79
1.7 Efecto del ácido oleico sobre el desarrollo axonal en neuronas corticales KO CPT1C..	82
2. Interacción de CPT1C con protrudina	84
Papel de malonil-CoA en las interacciones entre CPT1C y otras proteínas de RE	87
3. Papel de CPT1C en la regulación de LEs.....	90
3.1 Localización de CPT1C en los contactos RE-LE	90
3.2 Implicación de CPT1C en la localización de los LEs	93
3.3 Papel de CPT1C en el transporte de LEs	95
DISCUSIÓN	
1. CPT1C interacciona con protrudina	102
2. CPT1C participa en la localización y movimiento de LEs	104
3. CPT1C es necesaria para el correcto crecimiento axonal y dendrítico.....	108
4. Consideraciones finales	110
CONCLUSIONES	
Conclusiones	115
RESUMEN	
Resumen.....	119
BIBLIOGRAFÍA	
Bibliografía	123
ANEXO 1	
Anexo 1.....	135
ANEXO 2	
Anexo 2: Artículo.....	141



ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACS	Acil-CoA sintasa
AD	Autosómica dominante
AGCL	Ácido graso de cadena larga
AGS	Ácido graso sintasa
AICAR	5- Aminoimidazol-4 carboxamida 1-β-D-ribofuranosido
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ATL-1	Atlastina-1
ATP	Adenosina trifosfato
CACT	Carnitina acilcarnitina transferasa
CAT	Carnitina acil transferasa
CFP	Proteína cian fluorescente
CoA	Coenzima A
CPT	Carnitina palmitoil transferasa
CrAT/CAT	Carnitina acetiltransferasa
CrOT/COT	Carnitina octanoiltransferasa
DRG	Ganglios de la raíz dorsal
ECV	Vesículas portadoras de endosomas
EE	Endosomas tempranos
EV	Vector vacío
FFAT	Difenil alanina en el tramo ácido
FRET	Transferencia de energía por resonancia fluorescente
FYCO	Proteína recombinante con dominio FYVE y CC
GFP	Proteína verde fluorescente
GSK3	Glicógeno sintasa quinasa-3
IF	Inmunofluorescencia
ILV	Vesículas intraluminares
KIF	Kinesina
KO CPT1C	Animal deficiente de CPT1C

LAMP	Proteína de membrana asociada a lisosoma
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos
LCR	Región de baja complejidad
LD	Cuerpos lipídicos
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LE	Endosoma tardío
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamíferos
MVB	Cuerpos multivesiculares
ORP1L	Proteína de unión a colesterol
PBS	Tampón fosfato salino
PEH	Paraplejía espástica hereditaria
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PI3P/PtdIns3P	Fosfatidil inositol 3 fosfato
PKC	Proteína quinasa C
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RBD	Dominio de unión a Rab
RE	Retículo endoplásmico
RILP	Proteína lisosomal que interacciona con Rab
SNC	Sistema nervioso central
SPG	Gen de paraplejía espástica
TGN	Red trans-Golgi
TOFA	Ácido 5-(tetradeciloxi)-2furoico
WT	Animal salvaje
YFP	Proteína amarilla fluorescente



INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA (CPT)

La β -oxidación mitocondrial es la vía principal para la degradación de ácidos grasos y obtención de energía. El paso principal en este proceso es el transporte de los ácidos grasos al interior de la mitocondria. Este transporte es mediado por un grupo de enzimas con actividad carnitina aciltransferasa (CAT) y un transportador localizado en el interior de la membrana mitocondrial. Existen diferentes tipos de enzimas con actividad CAT según el tipo de ácido graso. La carnitina acetiltransferasa (CrAT o CAT) utiliza acetil-CoA como sustrato. La carnitina octanoiltransferasa (CrOT o COT) facilita el transporte de ácidos grasos entre 8 y 10 carbonos desde el peroxisoma a la mitocondria y las carnitinas palmitoiltransferasas 1 y 2 (CPT1 y CPT2) facilitan el transporte de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) (C16-C20) a la matriz mitocondrial para la β -oxidación (**Figura 1**).

La CPT1 es una proteína transmembrana situada en la membrana mitocondrial externa que cataliza la transferencia del grupo acilo de los aciles-CoA, formados por la actividad de la acil-CoA sintasa (ACS), a la carnitina del espacio intermembrana. El producto, acilcarnitina, es transportado a la matriz mitocondrial por una reacción de intercambio facilitada por la carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT) situada en la membrana mitocondrial interna. Por último, una vez en la matriz mitocondrial, la carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2) revierte la reacción, transfiriendo el grupo acilo de la acilcarnitina a una molécula de CoA-SH. De este modo los AGCL-CoA entran en el ciclo de la β -oxidación para producir acetil-CoA (**Figura 1**).

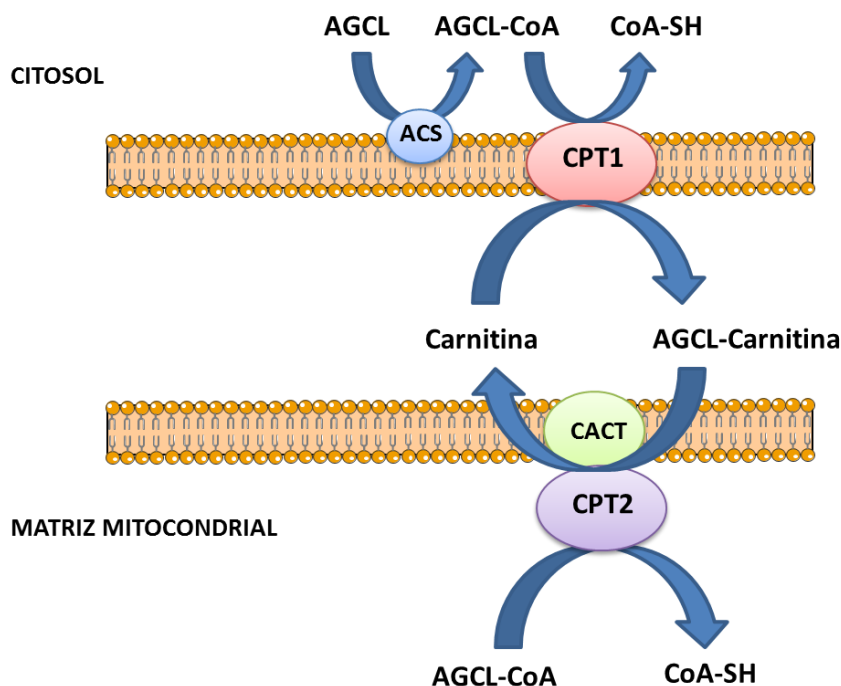


Figura 1. Sistema CPT en el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria. La activación de AGCL (ácidos grasos de cadena larga) a AGCL-CoA es producida por la enzima ACS (Acil-CoA sintasa). El transporte al interior de la mitocondria se lleva a cabo por la CPT1 (carnitina palmitoiltransferasa 1), que cataliza la formación de AGCL-carnitina. La CACT (carnitina acilcarnitinatranslocasa) transporta los AGCL-carnitina a través de la membrana mitocondrial y CPT2 convierte los AGCL-carnitina en el interior de la matriz mitocondrial.

Existen tres isoformas de CPT1 (**Figura 2**):

CPT1A: es la isoforma que presenta una expresión más ubicua. Se encuentra en el hígado, pulmón, páncreas, intestino, ovario y cerebro (McGarry and Brown 1997).

CPT1B: se encuentra en músculo esquelético y cardíaco, tejido adiposo y testículos (Esser et al. 1996; Yamazaki et al. 1995).

CPT1C: esta isoforma fue descubierta muy posteriormente a las anteriores (Price et al. 2002). Se encuentra en el sistema nervioso central (SNC) y muestra una elevada homología en su secuencia de aminoácidos con las otras dos isoformas, aunque no tiene actividad catalítica. Esta isoforma se encuentra localizada en el retículo endoplásmico (RE), mientras que CPT1A y B se encuentran localizadas en la mitocondria.

El estudio filogenético de los tres genes CPT1 indica que divergieron aproximadamente al mismo tiempo. Sin embargo, CPT1C únicamente se expresa en mamíferos, mientras que CPT1A y CPT1B también se expresan en otros vertebrados.

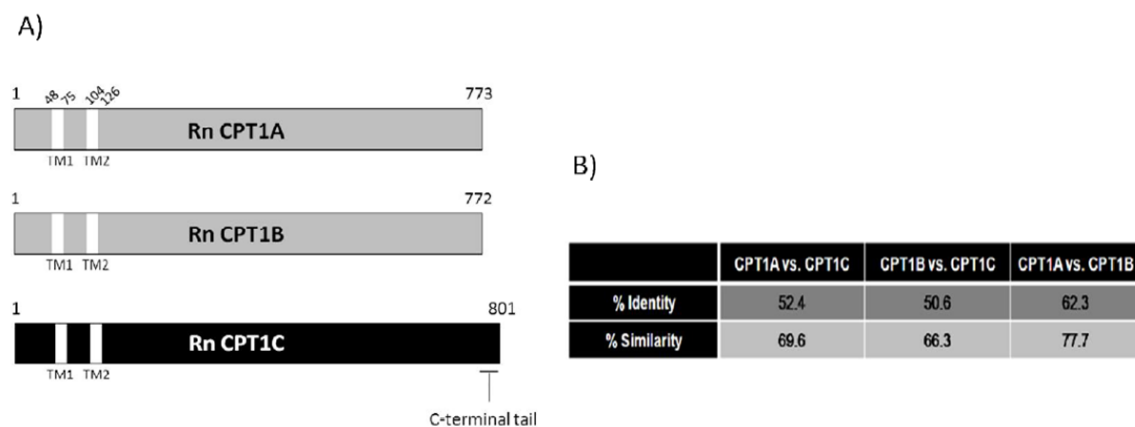


Figura 2. Comparación de las tres isoformas CPT1. Representación de las tres isoformas (CPT1A, B y C) de rata, en la que se muestra la cola de CPT1C en el extremo C-terminal, los dominios transmembrana (TM1 y TM2) y la posición de los aminoácidos al inicio y al final. B) Muestra la identidad y la similitud entre las diferentes isoformas (modificado de Wolfgang et al. 2006).

2. CPT1C: CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA 1C

CPT1C se expresa principalmente en el cerebro de mamíferos. Un análisis más detallado de la expresión de esta proteína por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en cortes de cerebro de ratón ayudó a esclarecer las zonas de mayor expresión: el hipocampo (involucrado en aprendizaje y cognición), el núcleo hipotalámico (ingesta y gasto energético) y la amígdala (centro de coordinación de la respuesta autónoma y endocrina en el control de los estados emocionales). Recientemente, se ha demostrado que CPT1C también se expresa en neuronas motoras y en ganglios de la raíz dorsal (DRG), situándola en el sistema nervioso periférico (Dai et al. 2007; Price et al. 2002; Rinaldi et al. 2015).

En 2008, Sierra y colaboradores demostraron mediante el uso de marcadores celulares específicos que CPT1C solo se expresa en neuronas, y no en células endoteliales o gliales (Sierra et al. 2008). En este mismo estudio se demostró que CPT1C se localiza en el retículo endoplásmico (RE) y no está presente en la mitocondria ni en los peroxisomas, siendo la región N-terminal de CPT1C la responsable de la localización subcelular de esta proteína.

2.1 Actividad catalítica y regulación

El análisis comparativo de aminoácidos entre las tres isoformas revela que CPT1C conserva todos los residuos involucrados en la actividad carnitina palmitoiltransferasa, así como el lugar de unión de malonil-CoA.

Malonil-CoA es sustrato de la ácido graso sintasa (AGS) en la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Actúa como inhibidor fisiológico de las enzimas CPT1. En estado de alimentación el malonil-CoA se encuentra unido a las enzimas CPT1 y las inhibe, lo que conlleva el incremento de la concentración de AGCL-CoA intracelular. Sin embargo, cuando se produce una bajada de los niveles de malonil-CoA durante el ayuno, se pierde la unión a CPT1 y se favorece la beta-oxidación mitocondrial y en consecuencia, la disminución de los niveles AGCL-CoA (Lane et al. 2005; Ruderman, Saha, and Kraegen 2010).

Varios grupos de investigación han intentado evaluar la actividad CAT de la CPT1C bajo distintas condiciones. Price y colaboradores ensayaron la actividad CAT en levaduras, en las que expresaron CPT1C recombinante, con varios aciles-CoA conocidos como sustratos de las otras isoformas, sin lograr detectar actividad catalítica. Sin embargo en este trabajo demostraron por primera vez que CPT1C tiene la misma afinidad por malonil-CoA que CPT1A (Price et al. 2002).

El grupo de Daniel Lane llevó a cabo una serie de experimentos en los que ensayó la actividad CAT de CPT1C en células HEK293T sobreexpresando CPT1C, ampliando la cantidad y complejidad de los aciles CoA usados como sustratos. A pesar de ello fueron incapaces de detectar actividad catalítica (Wolfgang et al. 2006).

En 2008 Sierra y colaboradores, mediante cromatografía líquida en tándem con un espectrofotómetro de masas, demostraron en células PC-12 que CPT1C era capaz de utilizar palmitoil-CoA como sustrato, aunque la eficiencia catalítica era 200 veces inferior a la observada para CPT1A (Sierra et al. 2008).

Posteriormente Ulmer y colaboradores, mediante experimentos de resonancia magnética nuclear, observaron que según las condiciones fisiológicas de la célula, el dominio N-terminal de CPT1A (dominio regulador) podía adoptar dos conformaciones: “N α ” (inactiva) o “N β ” (activa). En cambio, CPT1C estaría permanentemente en un estado “N α ”, hecho que podría explicar la baja capacidad catalítica (Samanta, Situ, and Ulmer 2014).

Ya que CPT1C no tiene actividad catalítica pero sí mantiene la capacidad de unión a malonil-CoA, se ha sugerido recientemente que CPT1C podría actuar como un sensor de malonil-CoA, regulando la función de otras proteínas que interaccionan con CPT1C (Casals et al. 2016).

2.2 Actividad motora y paraplejía espástica hereditaria

Un estudio reciente llevado a cabo por Rinaldi y colaboradores identificó una mutación en CPT1C como la causa genética de una nueva forma de paraplejía espástica hereditaria (PEH) autosómica dominante, denominada SPG73. Era la primera vez que se describía una mutación de CPT1C en humanos (Rinaldi et al. 2015).

Los investigadores encontraron tres generaciones de una misma familia del sur de Italia en las que aparecía paraplejía espástica de causa genética desconocida, de aparición en adulto y mostrando un patrón de herencia dominante. La secuenciación de todo el ADN genómico de los individuos afectados permitió la identificación de la sustitución de un solo nucleótido c.109> T (p.Arg37Cys) en el exón 3 de CPT1C. Los autores sugieren que la mutación Arg37Cys altera la interacción entre el N-terminal y el dominio catalítico C-terminal de CPT1C (**Figura3**) (Rinaldi et al. 2015).

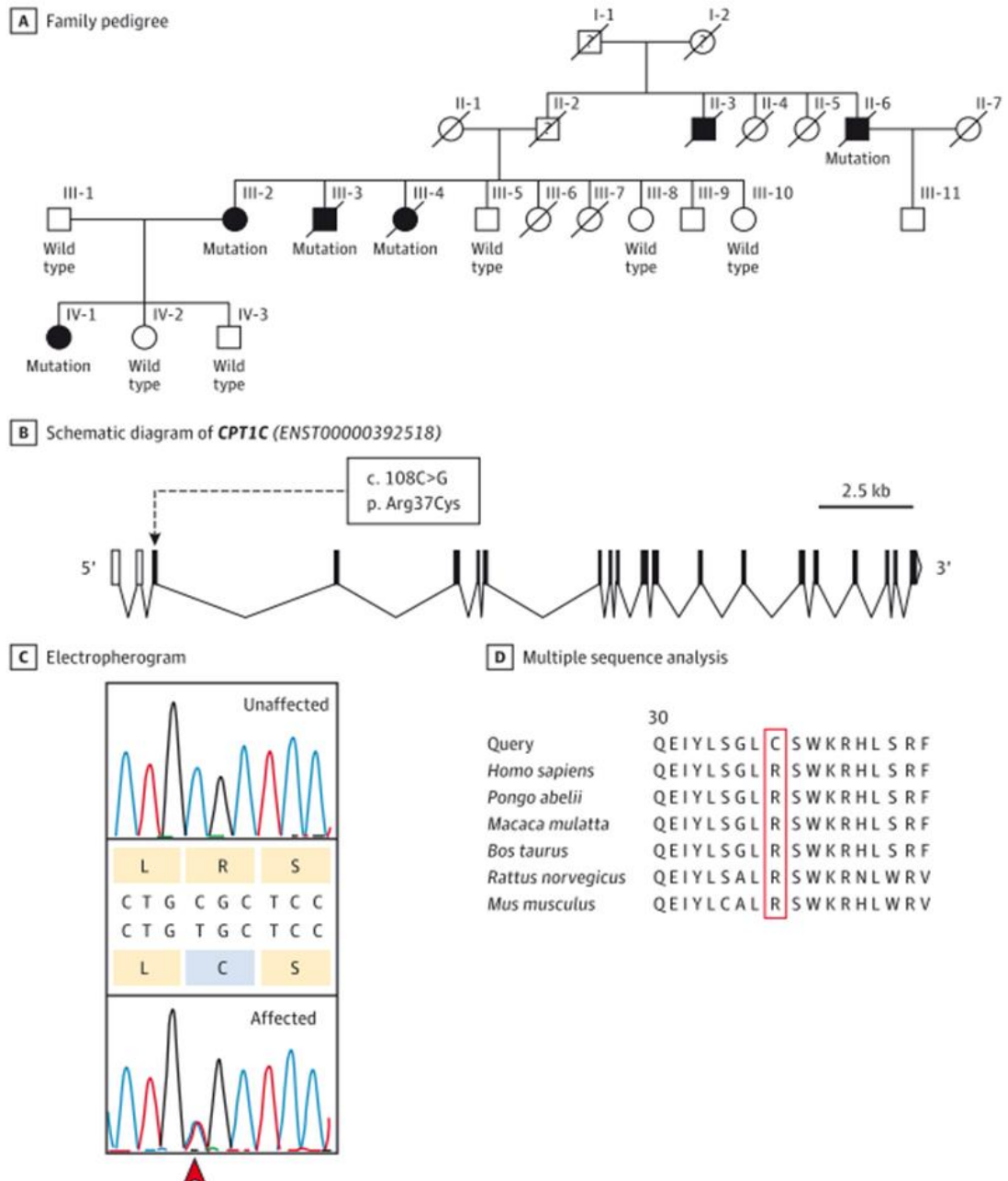


Figura 3. Pedigrí de la familia afectada por SPG73 y análisis de la secuencia de CPT1C. A) Pedigrí familiar B) Diagrama esquemático de CPT1C. Los exones codificantes son representados en barras negras, los no codificantes en barras blancas, los intrones se representan mediante las líneas conectoras. C) Electroferograma que muestra la mutación encontrada en CPT1C. D) Secuencia de CPT1C en varias especies y en la familia afectada: “Query” (Rinaldi et al. 2015).

Otro punto importante en este estudio es la interacción descrita mediante ensayos de inmunoprecipitación entre CPT1C y atlastina-1 (ATL-1), una proteína que también ha sido relacionada previamente con la PEH (SPG3A) y que se encuentra localizada en el RE. ATL-1 es una GTPasa que ha sido localizada en el soma, los conos de crecimiento y las varicosidades de neuronas corticales. Las mutaciones en esta proteína se han relacionado con alteraciones estructurales del RE y un déficit en el crecimiento axonal. Se han descrito diferentes proteínas asociadas a la PEH que interactúan con ATL-1, como REEP1, espastina, reticulon o protrudina. Todas estas proteínas se encuentran interactuando entre ellas formando una red tubular que le confiere la morfología y estructura al RE (Rismanchi et al. 2008; Park et al. 2010; Zhu et al. 2006). La protrudina, además, ha sido identificada como una de las posibles proteínas que interactúan con CPT1C (Hashimoto et al. 2014).

La interacción con ATL-1, y la posible interacción con protrudina sitúan a CPT1C como posible componente de la red tubular del RE.

CPT1C también ha sido relacionada con la formación de compartimentos intracelulares de reserva de lípidos, llamados cuerpos lipídicos (LD, del inglés “*lipid droplet*”) (Rinaldi et al. 2015). En este trabajo encontraron una disminución del número y del tamaño de LDs tanto en células COS-7 transfectadas con la forma mutada de CPT1C (c109>T) como en neuronas corticales aisladas de ratones deficientes de CPT1C comparadas con ratones salvajes. En trabajos previos se había observado el mismo efecto por mutaciones en otras proteínas asociadas a PEH como ATL-1, espastina y REEP1 (Klemm et al. 2013; Papadopoulos et al. 2015).

En el trabajo de Carrasco y colaboradores en 2013, ya se había relacionado la alteración en el metabolismo lipídico con alteraciones motoras. Una batería de pruebas neurológicas en ratones deficientes de CPT1C evidencia que la deficiencia de CPT1C causa alteraciones motoras. Estos ratones muestran un sistema sensorial autónomo intacto, pero un estudio más detallado reveló una disminución de la coordinación y la marcha, debilidad muscular severa y reducción de la actividad

locomotora diaria. El análisis de la función motora en estos ratones, en edades de 6 a 24 semanas, mostraron que los trastornos motores ya estaban presentes en los animales jóvenes y que el deterioro aumenta progresivamente con la edad. Los análisis de expresión de CPT1C en el córtex motor, muestran niveles bajos desde el nacimiento hasta los 21 días de edad, donde presenta un pico de expresión. Estas observaciones sugieren que CPT1C juega un papel fundamental durante y después del destete. Los trastornos motores por déficit de CPT1C se producen entre las 3 y 7 semanas de vida (Carrasco et al. 2013).

2.3 Otras funciones de CPT1C

Maduración de espinas dendríticas y cognición

Nuestro grupo de investigación estudió la implicación de CPT1C en la consolidación de la memoria y aprendizaje. Mediante el test del laberinto de agua de Morris se evaluó el aprendizaje espacial y se observó que los ratones deficientes de CPT1C presentaban dificultades en el aprendizaje (Carrasco et al. 2012; Price et al. 2002).

Este déficit de aprendizaje fue asociado con una disminución de la maduración de las espinas dendríticas. Un análisis morfológico de las espinas en cultivos primarios demostró que las neuronas de ratones deficientes de CPT1C tenían incrementado el número de filopodios inmaduros y reducido el porcentaje de espinas maduras (Carrasco et al. 2012).

El requerimiento de CPT1C para la correcta maduración de las espinas se ha asociado con su capacidad de regular los niveles de ceramidas. En el mismo estudio se demuestra que el tratamiento de las neuronas con un inhibidor de la biosíntesis de ceramidas da lugar a un fenotipo similar al observado en neuronas deficientes de CPT1C.

En 2012 se demostró la interacción de CPT1C con los receptores de glutamato tipo AMPA (Schwenk et al. 2012). También se ha sugerido que el papel de CPT1C en la maduración de espinas dendríticas y en el aprendizaje espacial puede ser

debido a su capacidad para regular la síntesis y el transporte de los receptores AMPARs (Carrasco et al. 2012; Fadó et al. 2015).

Regulación de la ingesta y balance energético

Las primeras investigaciones sobre CPT1C se centraron en su posible función en el control de la ingesta, ya que esta proteína posee altos niveles de expresión en los núcleos hipotalámicos reguladores de la ingesta y puede unir malonil-CoA, un indicador clave del estado energético en neuronas hipotalámicas (Dai et al. 2007).

Posteriormente, nuestro grupo estudió el papel de CPT1C en la vía de señalización orexigénica de la ghrelina y la implicación de las ceramidas. Entre otras aportaciones, se demostró que CPT1C produce un aumento de ceramidas en el hipotálamo necesario para el efecto orexigénico de la ghrelina (Ramírez et al. 2013). También se demostró la participación de CPT1C en la ruta de señalización de la leptina. La leptina es un importante regulador fisiológico de la ingesta y el balance energético, ejerciendo sus efectos anorexigénicos, en parte, por incrementar los niveles de malonil-CoA en el hipotálamo (Gao et al. 2007). Recientemente se ha demostrado que CPT1C en el hipotálamo juega un papel clave en la oxidación periférica de las grasas en respuesta al ayuno (Pozo et al. 2017).

Cáncer

En 2011 se relacionó por primera vez CPT1C con cáncer. Zaugg y colaboradores descubrieron que la CPT1C humana promovía la supervivencia de las células cancerosas y el crecimiento tumoral en condiciones de estrés metabólico (Zaugg, K et al. 2011). Un año más tarde, Reilly y colaboradores publicaron que CPT1C se expresaba en varios tipos de tumores, y dicha expresión era considerablemente más alta en los relacionados con el SNC (Reilly and Mak 2012b).

En el estudio de Zaugg se demuestra que la expresión de CPT1C se relaciona de forma inversa con la activación de la vía de mTOR, contribuyendo a la

resistencia a rapamicina en tumores primarios murinos. Además, se describe que la expresión de CPT1C en líneas celulares tumorales aumenta la oxidación de ácidos grasos, la producción de ATP y confiere resistencia a la privación de glucosa y oxígeno. Por el contrario, las células cancerosas que carecen de CPT1C son más sensibles al estrés metabólico inducido por hipoglucemia e hipoxia, a la vez que presentan mayor sensibilidad a rapamicina. Asimismo, la expresión de CPT1C puede ser inducida por hipoxia o privación de glucosa. Estos resultados indican que las células tumorales pueden utilizar un novedoso mecanismo que implica a CPT1C, que las protege en situaciones de estrés metabólico (Zaugg, K et al. 2011).

3. PARAPLEJÍA ESPÁSTICA HEREDITARIA

La PEH, también conocida como paraparesia espástica hereditaria o síndrome de Strumpell-Lorrain, fue descrita por primera vez en el siglo 19 por Strumpell y Lorrain. Ambos describieron un grupo de familias que presentaban espasticidad y debilidad en las extremidades inferiores, en ausencia de otras anomalías neurológicas.

Las PEH que han sido identificadas hasta la fecha representan un amplio y diverso grupo de desórdenes neurológicos con manifestaciones neurológicas y no neurológicas (Noreau, Dion, and Rouleau 2014). Actualmente, se define como un grupo heterogéneo de desórdenes neurológicos caracterizados por mutaciones genéticas que causan axonopatía distal del tracto corticoespinal. Las fibras más afectadas suelen ser las de la vía ascendente. Como resultado de la disfunción corticoespinal se produce un aumento del tono muscular y espasticidad. La espasticidad implica hipertonía muscular, reflejos de estiramiento hiperactivos y clonus (contracciones y relajaciones oscilatorias de los músculos en respuesta al estiramiento muscular). Las lesiones extensas de las neuronas motoras superiores también pueden acompañarse por rigidez de los músculos extensores de las piernas y flexores de los brazos (Lo Giudice et al. 2014; Finsterer et al. 2012 ;Blackstone et al. 2011).

Los estudios epidemiológicos sitúan la prevalencia en 1,27-13,9 casos por 100.000 habitantes (Song 2014; Ruano et al. 2014), aunque varía con el origen étnico y geográfico. La PEH autosómica dominante es más frecuente entre la población europea, 1,27-5,75/100.000 (Finsterer et al. 2012). Las tasas de prevalencia varían además en regiones donde existe mayor tasa de consanguinidad, por la elevada proporción de portadores asintomáticos que no están contabilizados en la frecuencia real.

La PEH es una enfermedad heterogénea, tanto a nivel clínico como genético. Los síntomas iniciales pueden aparecer a cualquier edad. En los casos de aparición más temprana existe un retraso psicomotor en el inicio que dificulta el aprendizaje

de la marcha o ponerse de pie. No obstante, los primeros síntomas suelen aparecer más tarde, y suele ser frecuente la rigidez de las piernas y torpeza al caminar. El progreso de esta enfermedad es más rápido cuanto más tardío es su inicio.

El diagnóstico de la PEH está basado en:

1. Síntomas clínicos característicos de la espasticidad bilateral y debilidad de las extremidades inferiores, pudiendo ser progresiva o lentamente progresiva.
2. Examen neurológico con muestra de afectación del tracto corticoespinal tales como espasticidad, aumento de los reflejos, y respuesta de los extensores plantares.
3. Estudio de los antecedentes familiares con herencia autosómica dominante, autosómica recesiva, o ligada al cromosoma X, incluyendo también los casos esporádicos que pueden ocurrir.
4. Pruebas genéticas de secuenciación para la búsqueda de posibles mutaciones.

Actualmente no existe una terapia para la PEH más allá del tratamiento sintomático, que normalmente está basado en fármacos antiespásticos, y aquellos que son importantes para prevenir complicaciones como contracturas, fracturas y mejoran la calidad de vida de los pacientes (De Souza et al. 2016).

Clasificación PEH

Se puede clasificar según el fenotipo, el tipo de transmisión genética o las funciones alteradas.

A. Fenotipo

Paraplejía espástica hereditaria pura: se caracteriza por espasticidad progresiva, debilidad de las extremidades inferiores, en ocasiones perturbaciones sensoriales o disfunción de la vejiga.

Paraplejía espástica hereditaria compleja: se caracteriza por presentar manifestaciones neurológicas y no neurológicas, que no siempre son detectables mediante test neuropsicológicos o técnicas de imagen (Finsterer et al. 2012).

B. Tipo de transmisión genética

Se han descrito casos de herencia autosómica dominante (PEH-AD), autosómica recesiva (PEH-AR) y también ligada al cromosoma X (PEH-XL). (Ver anexo 1)

C. Función

Las proteínas implicadas en la PEH son de naturaleza muy heterogénea y están relacionadas con una gran variedad de vías moleculares o funciones en el organismo. En la **figura 4** puede verse un resumen de las principales funciones celulares alteradas en PEH. A los genes cuyas mutaciones causan PEH se les denomina como “SPG” (*spastic paraplegia gen*) seguido de un número asociado a cada gen (de Souza et al. 2016).

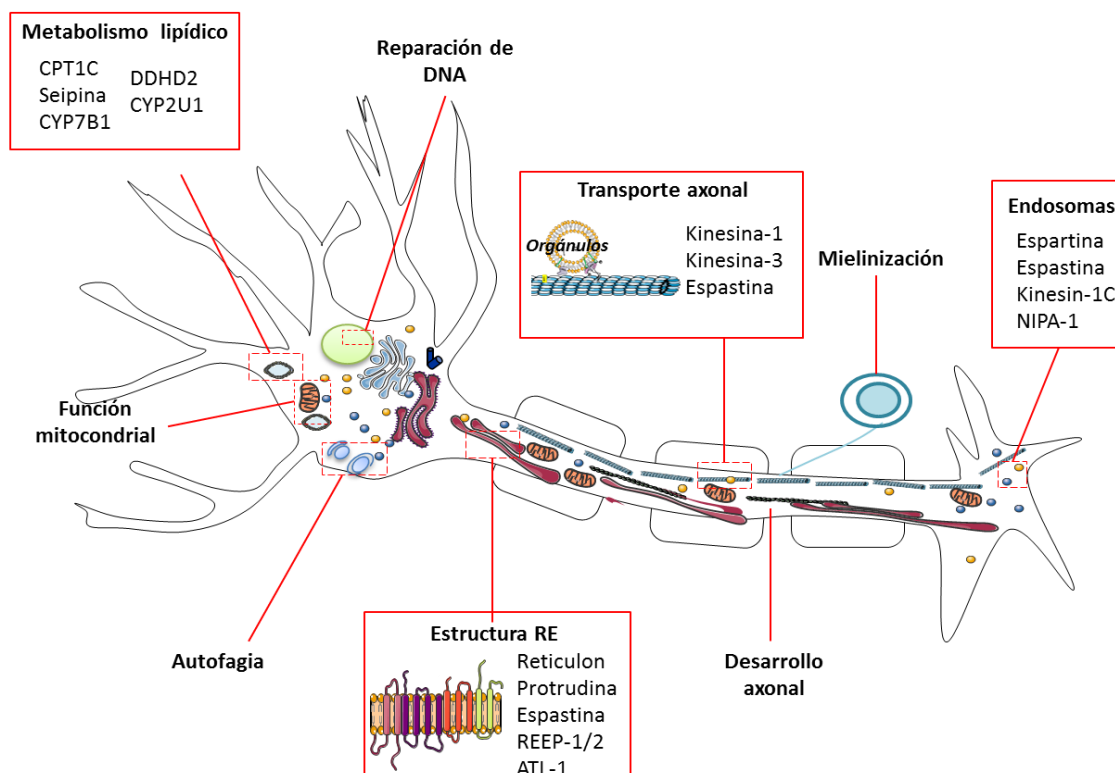


Figura 4. Funciones alteradas en PEH (Paraplejía Espástica Hereditaria). Se muestran las funciones que se pueden ver alteradas en PEH, y alguna de las proteínas implicadas.

El mecanismo por el cual CPT1C podría estar implicada en la PEH aún es desconocido. Todo apunta a que podría estar interaccionando con otras proteínas del RE como ATL-1 o protrudina, y participando en el tráfico intracelular, mantenimiento de la morfología del RE o en la formación de cuerpos lipídicos. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se intenta avanzar en la comprensión del papel que juega CPT1C en la PEH.

4. DESARROLLO AXONAL

Las neuronas son las células con mayor complejidad morfológica y funcional. Su desarrollo comienza con la especialización de una neurita como axón, para adquirir la polaridad. El proceso de polarización conlleva una extensa biosíntesis de proteínas y lípidos, transporte activo para llevar los elementos necesarios hasta los conos de crecimiento, y una compleja organización del citoesqueleto. Estos procesos moleculares requieren un alto consumo de ATP.

La principal ruta de señalización implicada en el inicio de la formación del axón es PI3K-Akt-GSK3. GSK3 se encuentra de forma constitutiva activa, y es necesaria para que una neurita se convierta en axón. La posterior inhibición de GSK3 permite la elongación del axón. (Laurino et al. 2005).

También se ha descrito el papel de AMPK en el desarrollo axonal y su implicación en la ruta PI3K (Williams and Brenman 2008; Valerio et al. 2006).

AMPK es un componente de señalización energética, que es activado cuando hay una alta proporción de AMP/ATP. La activación de AMPK suele desembocar en la inhibición de procesos anabólicos que consumen ATP (síntesis de ácidos grasos, proteínas o colesterol) y la inducción de procesos catabólicos que generan ATP (captación de ácidos grasos y glucosa) para mantener las reservas de energía (Hardie 2004). Se ha descrito que la fosforilación de AMPK bloquea la polarización inicial del axón. La explicación reside en que AMPK regula el transporte de PI3K a los conos de crecimiento (Simo and Jose 2007). Para que PI3K sea transportado a los conos de crecimiento tiene que estar unido a la cadena ligera de la de la kinesina-5 (KIF-5). Cuando AMPK es fosforilada, el sitio de unión de PI3K a la KIF-5 queda fosforilado y desplaza la unión de PI3K, inhibiendo su transporte hacia los conos, e inhibiendo el crecimiento axonal (S Amato and Man 2011) (**Figura 5**).

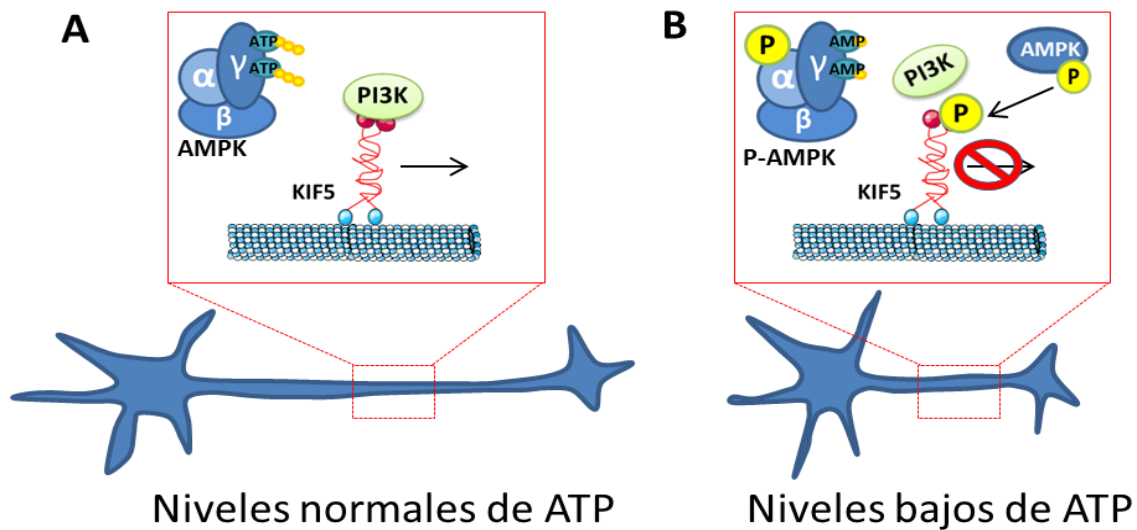


Figura 5. Inhibición del crecimiento axonal mediado por la fosforilación de AMPK. A) En condiciones normales AMPK permanece inactiva permitiendo el transporte de PI3K hacia los conos de crecimiento mediante la kinesina-5 (KIF5), promoviendo el crecimiento axonal. B) Cuando los niveles de ATP son bajos, AMPK se activa (p-AMPK) y causa la fosforilación de KIF5 desplazando la unión de PI3K, inhibiendo el desarrollo axonal.

El axón una vez formado, debe elongar y alcanzar dianas específicas para generar contactos sinápticos con otras neuronas o con células especializadas en diferentes tejidos. Las señales para regular la elongación pueden ser positivas o negativas con el objetivo de guiar al axón hasta su diana. Este proceso está regulado por el comportamiento de los conos, que dispone de mecanismos reguladores del citoesqueleto, permitiéndole marcar la dirección del crecimiento según los estímulos. El remodelaje del citoesqueleto necesario para la formación de los conos de crecimiento es posible gracias a proteínas que rompen los microtúbulos en fragmentos más pequeños y móviles, como la katanina o la espastina, siendo esta última una proteína que ha sido relacionada con la PEH (Wood et al. 2006; Yu et al. 2008).

5. ENDOSOMAS

5.1 Endocitosis.

La endocitosis supone la puesta en marcha de una compleja maquinaria celular para la internalización de material extracelular. Puede estar mediada o no por receptor. En el primer caso se incorporan moléculas reconocidas por receptores de la membrana plasmática (Doherty and McMahon 2009). En el segundo no existe ese reconocimiento y la selección del material ocurre mediante la asociación del mismo con microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos o *lipid rafts* (Mayor and Pagano 2007).

La endocitosis comienza con la invaginación de la membrana plasmática que finalmente se cierra formando una vesícula citosólica o endosoma temprano inicial. Atendiendo al tipo de proteínas que recubren la invaginación de la membrana, y en consecuencia al endosoma temprano inicial, la endocitosis puede ser dependiente o independiente de clatrina (**Figura 6**) (Doherty and McMahon 2009). Entre los procesos de endocitosis independientes de clatrina se han descrito los mediados por caveolina, los que forman invaginaciones de membranas tubulares o polimorfos, la macropinocitosis y la fagocitosis.

Posteriormente, se forman los endosomas tardíos, cuyo interior es más ácido, para finalmente fusionarse con lisosomas, donde el material endocitado es degradado por los enzimas hidrolíticos. Alternativamente, los endosomas tempranos pueden fusionarse con la membrana basolateral dando lugar a la exocitosis del material. En este caso las moléculas endocitadas atraviesan la célula intacta mediante transcitosis. Los receptores que han sido endocitados vuelven a la membrana de origen mediante vesículas de reciclaje. Por otro lado los endosomas tardíos, además de la fusión con el lisosoma pueden fusionarse con la membrana y liberar exosomas o ser transportados hacia el retículo dependiendo de las señales intracelulares (Scott, Vacca, and Gruenberg 2014).

5.2 Endosomas tempranos (EE; *Early Endosomes*)

El endosoma temprano es el primer compartimento de la vía endocítica. El proceso exacto por el que se forman no está claro pero se sabe que la membrana va creciendo a partir de las vesículas endocíticas que se van fusionando unas con otras.

El EE recibe la carga endocitada a través de los mediadores endocíticos, como pueden ser clatrina, caveolinas o ARF6. Un EE acepta vesículas durante 10 min de tiempo en el cual una parte de los componentes pasa a la vía de reciclaje mientras que otra parte de la carga se acumula para ser incluida en los endosomas tardíos (LE).

Uno de los componentes claves en los EE es Rab5, una proteína perteneciente a la familia de Rab GTPasas que ayuda a mantener la identidad del orgánulo. Rab5 se mantiene activo hasta que se forma el LE donde pasa a intercambiarse por Rab7. Durante la conversión de Rab5 a Rab7, una parte del contenido internalizado es reciclado volviendo a fusionarse con la membrana plásmica. (**Figura 6**).

Los EE mantienen una comunicación bidireccional y continua de vesículas con la red trans-Golgi (TGN). Esta comunicación es responsable de la liberación de componentes para la formación de los lisosomas y para la eliminación de ciertos componentes de los endosomas durante la maduración (Huotari and Helenius 2011).

5.3 Endosomas tardíos (LE; *Late endosomes*)

La formación del LE va precedida por la conversión de Rab5 a Rab7. Rab7 es una GTPasa que controla la maduración y el transporte de LE y lisosomas, y tiene un papel en algunos procesos fisiológicos como apoptosis, crecimiento de neuritas, fagocitosis y autofagia (Guerra and Bucci 2016). Estos cambios dan lugar a la formación de un endosoma intermedio que posee características y marcadores, tanto de EE como de LE, denominado ECV/MVB (vesícula portadora de endosoma o cuerpo multivesicular).

El cambio de proteínas Rab hace que se produzca una redefinición de las propiedades de los endosomas (**Figura 6**) (Huotari and Helenius 2011). Durante la maduración de los LE se producen cambios en los componentes de la membrana; un desplazamiento hacia la zona perinuclear, formación de ILVs adicionales, un cambio de la morfología y una bajada de pH. La bajada del pH es producida por la bomba de protones localizada en la membrana del endosoma para favorecer la acción de las hidrolasas ácidas, que son incorporada al LE mediante fusión, y son transportadas en vesículas desde el aparato de Golgi.

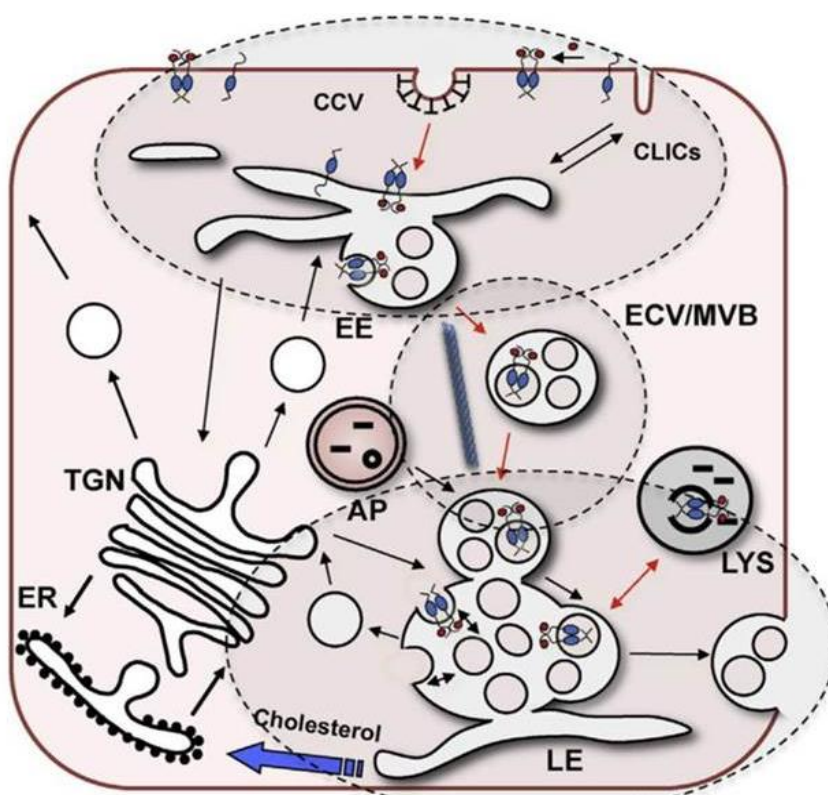


Figura 6. Organización de la vía endocítica y maduración de los endosomas. La endocitosis puede ser dependiente o independiente de clatrina (**CCV** o **CLICs**). Las vesículas se van fusionando dando lugar a la formación del **EE** (endosoma temprano). Los EE van madurando mediante fusión de vesículas procedentes del **TGN** (trans-Golgi) hasta formar el **LE** (endosoma tardío). Entre el EE y el LE hay un paso previo que es la formación de **ECV/MVB** (vesícula portadora de endosoma/cuerpos multivesiculares), que contiene componentes de EE y LE. **LYS**: lisosoma, **AP**: autofagosoma, **ER**: retículo endoplásmico. Modificado de Scott, Vacca, and Gruenberg 2014.

La Formación de ILVs es uno de los procesos más importantes en la biogénesis de los LE. Son cruciales para la selección de la carga que será posteriormente degradada en los lisosomas, y para la maduración y destino de los LE (Colombo 2014).

Otra característica de los LEs, es que presentan en su membrana glicoproteínas lisosomales como LAMPs que protegen a la membrana de la acción de las hidrolasas. Todos estos cambios son necesarios para cerrar la vía de reciclaje de los EE, y preparar a los LE para la fusión con el lisosoma. Una maduración similar ocurre en el autofagosoma y fagosoma, antes de fusionarse con el LE o lisosoma (Scott, Vacca, and Gruenberg 2014; Colombo 2014).

Cuando el LE se fusiona con el lisosoma es muy difícil poder distinguir entre ambos a nivel molecular, ya que no existen proteínas lisosómicas que no estén en el LE. Los constituyentes principales de ambos orgánulos son LAMP1 y LAMP2. La forma de diferenciarlos reside en sus características físicas y morfológicas. Los lisosomas son más esféricos y presentan una alta densidad (Huotari and Helenius 2011).

Una proporción elevada de LE se encuentran formando contactos con el RE, que es el encargado de determinar el destino de los LE según las necesidades celulares.

6. TRANSPORTE AXONAL DE LE.

El transporte axonal es esencial para la función neuronal. Muchas enfermedades neurodegenerativas tienen alterada la maquinaria responsable de este transporte. Existen dos tipos de transporte en neuronas: el transporte anterógrado, que se encarga de transportar desde el soma a los conos de crecimiento proteínas y lípidos sintetizados, necesarios para mantener la actividad sináptica; y el retrógrado, que es necesario para mantener la homeostasis celular transportando la carga desde los conos de crecimiento hacia el soma. El transporte retrógrado es importante para la degradación de orgánulos y proteínas, y para el transporte de factores neurotróficos (Gibbs, Greensmith, and Schiavo 2015; Maday et al. 2014). Ambos tipos de transporte están mediados por distintas proteínas motoras: la kinesina, en el caso del transporte anterógrado y la dineína, que media el transporte retrógrado (Schmieg et al. 2014; Namba et al. 2015).

Otros componentes importantes para el transporte son los microtúbulos, que proporcionan a las neuronas una polaridad intrínseca. Esta polaridad es la que permite el transporte axonal direccional. Es importante destacar que la organización de los microtúbulos es diferente entre el axón y las dendritas. En el axón los microtúbulos siempre se organizan de modo que el extremo denominado “menos” (*minus-end*) se encuentra en el soma y el denominado “extremo más” (*plus-end*) se encuentra en el cono axónico, mientras que en las dendritas presentan una organización mixta. Esta organización es importante para el tipo de transporte y por tanto para el tipo de proteínas motoras que intervienen.

Para llevar a cabo el transporte de LE, también son necesarios los contactos entre membranas de diferentes orgánulos, sobre todo los formados con el RE. Estos contactos incrementan durante la maduración de los endosomas y juegan un papel importante en la transferencia de colesterol y transporte y fisión de los endosomas (Friedman et al. 2013; Raiborg, Wenzel, and Stenmark 2015).

Una proteína clave en el transporte de LE es Rab7 que se localiza en la membrana de los LE y facilita el transporte a lo largo de los microtúbulos, así como la fusión con los lisosomas y autofagosomas. Para poder transportar los LE hacia la zona perinuclear, Rab7 interacciona con RILP (*Rab Interacting Lysosomal Protein*), un efector que se une a la dineína, favoreciendo el transporte retrógrado (Guerra and Bucci 2016; Rocha et al. 2009). Por el contrario, para transportar el LE hacia la periferia celular, el efector de Rab7 que se activa es FYCO-1 (*FYVE And Coiled-Coil Domain Containing 1*), presente en la membrana de los LEs, que se une a la cadena ligera de la KIF-5, favoreciendo el transporte anterógrado (Guerra and Bucci 2016; Raiborg et al. 2015).

Transporte regulado por ORP1L (colesterol)

El primer regulador negativo del transporte de LE es ORP1L (proteína de unión a colesterol en los LE). ORP1L se puede asociar al complejo Rab7-RILP, presente en los LE, y bloquear la unión de RILP a la dineína en respuesta a cambios en los niveles de colesterol. El colesterol puede ser endocitado desde el espacio extracelular en forma LDL (*low density lipoprotein*) o sintetizado *de novo* en el RE e internalizado a los endosomas. Cuando ORP1L reconoce las moléculas de colesterol, adquiere una conformación cerrada, que permite la unión del complejo Rab7-RILP a la dineína favoreciendo el transporte retrogrado. Sin embargo cuando los niveles de colesterol en la célula son bajos, queda libre el dominio de ORP1L de unión al colesterol, favoreciendo su interacción con VAP-A y bloqueando la unión del complejo Rab7-RILP a la dineína, lo que resulta en la inhibición del transporte retrógrado (**Figura 7**). La interacción de ORP1L con VAP-A permite la transferencia de colesterol tanto del RE al LE como del LE al RE. Por lo tanto, los factores que influyen en los niveles de colesterol influyen también en el transporte de LE (Wijdeven et al. 2016; Rocha et al. 2009; Wijdeven et al. 2015).

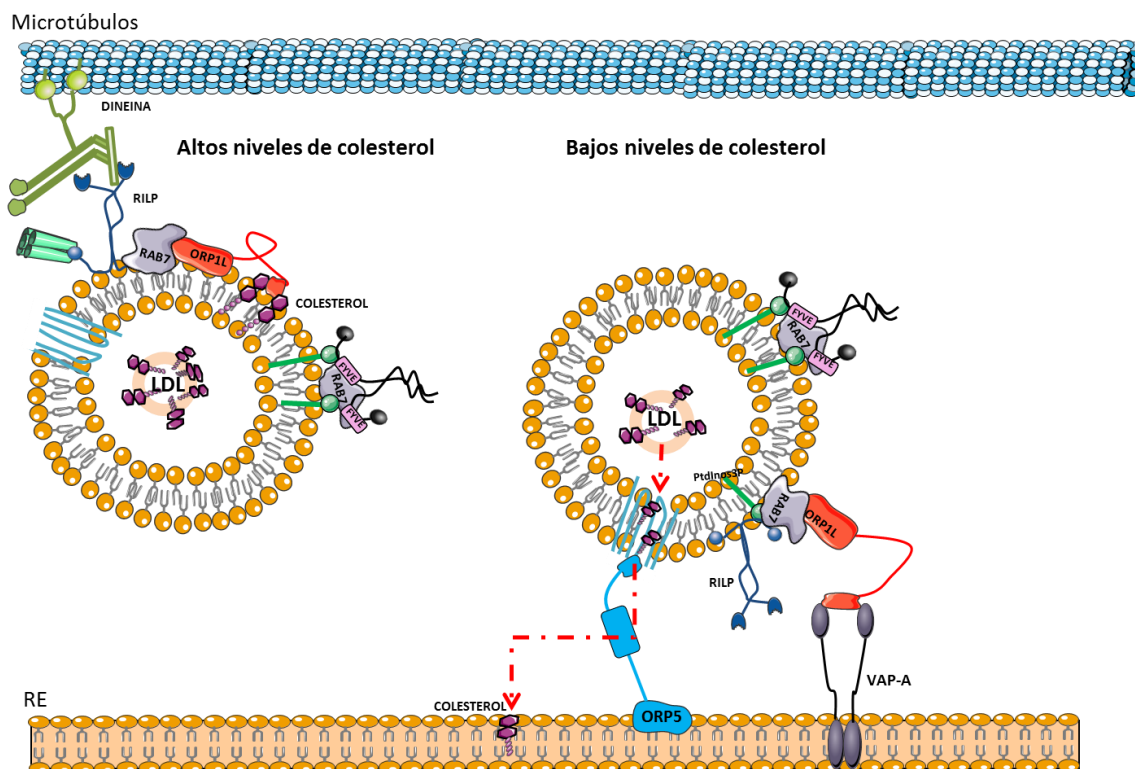


Figura 7. Transporte regulado por ORP1L. Cuando los niveles de colesterol son altos, ORP1L (proteína de unión a colesterol) se mantienen en una conformación cerrada unido a colesterol, y RILP se une a la dineína permitiendo el transporte retrógrado de los LEs. Cuando los niveles de colesterol son bajos ORP1L queda libre y se une a VAP-A, anclando el LE al RE (retículo endoplásmico). Esta unión permite que el colesterol en forma LDL quede libre y sea transportado al RE mediante ORP5.

Transporte regulado por protrudina.

Raiborg y colaboradores en 2015, demostraron la implicación de protrudina en el transporte anterógrado mediado por Rab7. La protrudina se encuentra situada en la membrana del RE y forma parte de los contactos RE-LE mediante la interacción con Rab7 y con PI3P, presente en los LE. Demostraron que la protrudina interacciona con KIF-5 y facilitaba la interacción de esta proteína motora con FYCO-1. FYCO-1 se encuentra localizada en la membrana de los LEs, y puede interaccionar con Rab7, PI3P y con LC3 en los autofagosomas (Pankiv et al. 2010). Además, durante el transporte anterógrado, observaron que las vesículas FYCO-1 positivas paraban en el RE, coincidentes con la protrudina, y después

continuaban el movimiento anterógrado. Los autores describen que la protrudina dirige la unión de KIF-5 con FYCO-1 mediante Rab7, pero no se conoce el mecanismo regulador para la señalización del transporte (**Figura 8**) (Raiborg et al. 2015; Wijdeven et al. 2015). Algunos autores sugieren la posibilidad de un sensor lipídico que pueda regular la función de la protrudina, pero hasta el momento se desconoce la regulación (Krauß and Haucke 2015).

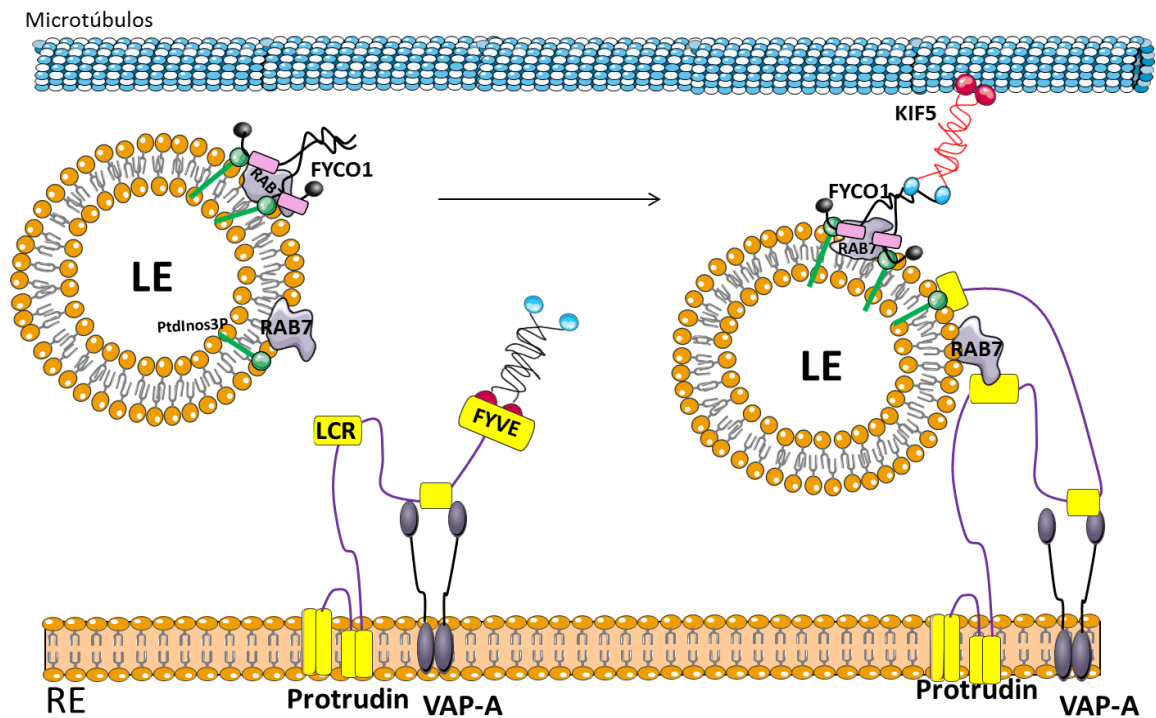


Figura 8. Transporte regulado por protrudina. La protrudina interacciona con los LE mediante su unión a Rab7 y a PI3P, favoreciendo la interacción de KIF-5 con FYCO-1, presente en la membrana de los LEs. La interacción entre FYCO-1 y KIF-5 permite el transporte anterógrado a través de los microtúbulos.

7. PROTRUDINA

La protrudina también puede ser nombrada como ZFYVE 27. Esta proteína se expresa sobre todo en cerebro y cerebelo, pero también se ha detectado en corazón, timo, bazo, estómago y músculo esquelético (Shirane and Nakayama, 2006).

A nivel subcelular ha sido identificada en dendritas, axón y conos de crecimiento de neuronas, formando parte de la membrana del RE y membrana plasmática. Recientemente ha sido descrita su participación en los contactos RE-LE, mediante la interacción con Rab7 (Raiborg et al. 2015) .

7.1 Estructura

La protrudina presenta diferentes dominios importantes para la interacción con otras proteínas. Contiene un dominio RBD (dominio de unión a las proteínas Rab), una región LCR (*Low Complexity Region*) de unión específica a Rab7, y un dominio FYVE por el que se une al PI3P presente en los LE necesario para promover la formación de neuritas a través de la activación del tráfico vesicular. A diferencia de lo que ocurre generalmente con los dominios FYVE en otras proteínas, que suelen interaccionar sólo con el PI3P, el dominio FYVE de la protrudina puede interaccionar con otros fosfolípidos que regulan las interacciones de la protrudina con los endosomas, o con la membrana plasmática. También presenta una secuencia FFAT (difenilalanina en el tramo ácido), que media la interacción con VAP, y un dominio CC (*coiled-coil*) de unión a KIF-5 (SPG10) (Saita et al. 2009; Hashimoto et al. 2014; Chang, Lee, and Blackstone 2013) (**Figura 9**).

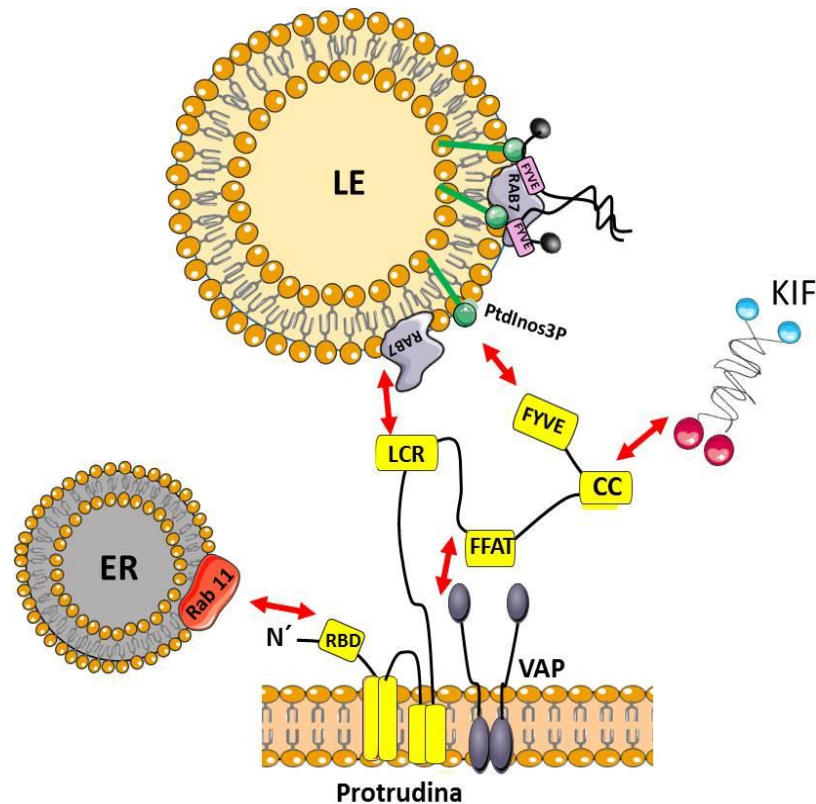


Figura 9. Dominios de interacción de protrudina con otras proteínas. RBD (Dominio de unión a Rab), LCR (*low Complexity Region*), FFAT (difenilalanina en tracto ácido), CC (*Coiled Coil*), FYVE (Fab1, YOTB, Vac1 y EEA1). La protrudina presenta diferentes puntos de interacción durante el transporte de LEs. Por el dominio LCR interacciona con Rab7 y por FYVE con PI3P, ambos presentes en la membrana de los LEs. Con el FFAT interacciona con VAP (proteína presente en la membrana del RE). La interacción con la proteína motora KIF5 se produce mediante el dominio CC. ER: endosoma de reciclaje.

En 2013 se identificó una nueva isoforma de protrudina (protrudina-L) que contenía siete aminoácidos adicionales entre el dominio FFAT y el CC, comparado con la isoforma convencional (protrudina-S) como resultado del procesamiento alternativo de un microexon (exón L) (**Figura 10A**). A diferencia de la isoforma S, el mRNA de la isoforma L sólo fue encontrado en el SNC. Además, la isoforma L se expresa sobre todo en neuronas y astrocitos, y se ha asociado con la elongación y polarización neuronal (**Figura 10C**) (Ohnishi et al. 2014; Ohnishi, Shirane, and Keiichi 2017).

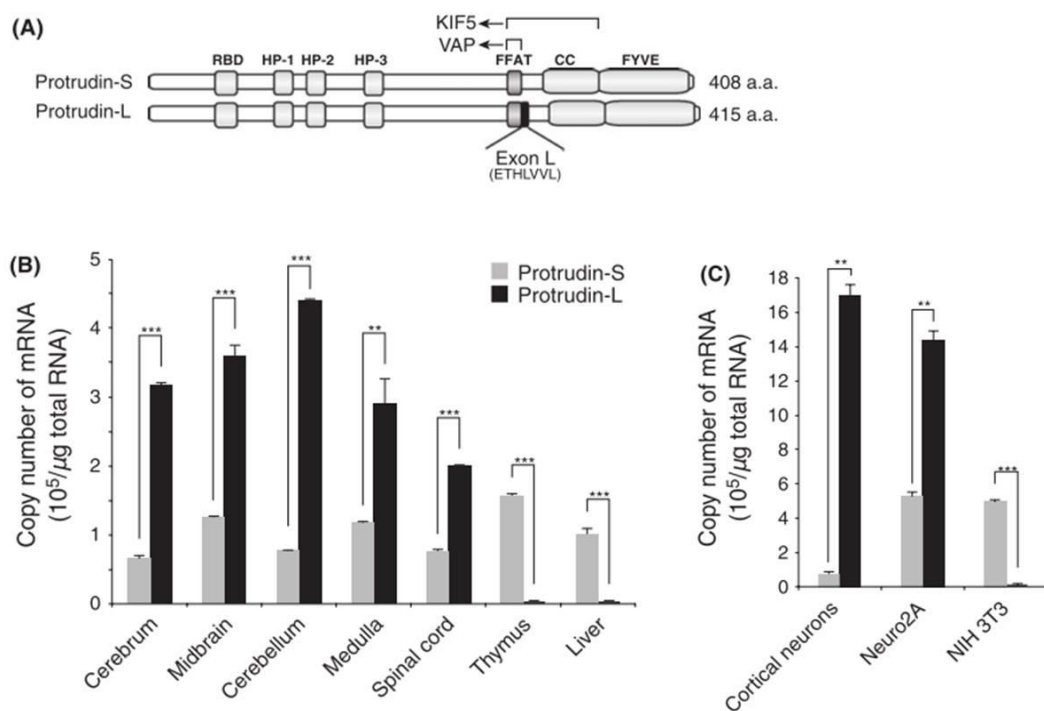


Figura 10. Expresión de prostrudina-S y L. A) Representación de los dominios de la prostrudina, los sitios de interacción con KIF-5 y con VAP, y el procesamiento del exón L. B) Expresión de prostrudina-S y L en diferentes tejidos. C) Expresión de prostrudina-S y L en neuronas corticales de ratón, en la línea celular Neuro2A y en la línea celular NIH3T3 (fibroblastos). Figura obtenida de Ohnishi et al. 2014.

7.2 Función

Morfología de retículo: la prostrudina interacciona con otras proteínas que se encuentran localizadas en la membrana del RE y que han sido asociadas a PEH, como ATL-1 (SPG3A), REEP1 y REEP5 (SPG31), reticulon 1,3 y 4 (SPG12) o espastina (SPG4). En un ensayo de proteómica publicado por Hashimoto y colaboradores, aparece como posible interactante de prostrudina la CPT1C. Muchas de estas proteínas contribuyen a la regulación de la morfología y estructura del RE, generando una curvatura de la membrana mediante sus uniones. Para mantener estable la estructura del RE estas proteínas se encuentran interaccionando entre ellas formando una red tubular. Se ha descrito que la mutación G191V de la prostrudina, la cual ha sido asociada a algunos casos de PEH, produce un cambio conformacional en la proteína que podría estar alterando la estabilidad estructural

del RE, sus funciones y los contactos con otros orgánulos, dando lugar a algunas de las alteraciones responsables de la enfermedad (Chang, Lee, and Blackstone 2013; Hashimoto et al. 2014).

Extensión de neuritas: la extensión de neuritas es un evento crucial en la formación del axón y las dendritas. La elongación de neuritas durante el desarrollo axonal en una dirección determinada es decisiva para la diferenciación neuronal y conectividad. Se ha descrito la participación de protrudina en la formación de neuritas asociada a la direccionalidad del tráfico de endosomas (Shirane and Nakayama, 2006). La sobreexpresión de protrudina en cultivos primarios de neuronas hipocampales y células PC12 produce un incremento de la longitud axonal y desarrollo dendrítico, mientras que el silenciamiento mediante ARN de interferencia tiene como resultado la inhibición del crecimiento axonal (Pantakani et al. 2011; Saita et al. 2009).

Tráfico de endosomas: se han descrito dos implicaciones diferentes de la protrudina en el transporte de endosomas. Una relacionada con la vía endocítica de los EE mediante su interacción con la proteína Rab11, favoreciendo el transporte durante el desarrollo neuronal (Welz, Wellbourne-wood, and Kerkhoff 2014; Shirane and Nakayama, 2006); y otra, descrita más recientemente, relacionada con las uniones de RE-LE, mediante la interacción con Rab7 y con PI3P.



HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo es que CPT1C podría estar regulando el crecimiento axonal y dendrítico a través de la interacción directa con la protrudina y de su participación en el transporte de los endosomas tardíos en las neuronas.



OBJETIVOS

1. Estudiar el papel de CPT1C en el desarrollo axonal y dendrítico.
2. Estudiar la interacción de CPT1C con protrudina.
3. Estudiar el papel de CPT1C en la localización y en el tráfico de los endosomas tardíos.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

1.1 Vectores plasmídicos

En este trabajo se han desarrollado una serie de construcciones plasmídicas, necesarias para los estudios de FRET (transferencia de energía por resonancia fluorescente). Los vectores plasmídicos que se emplearon fueron pmTurquoise y SYFP. Ambos vectores presentan la misma estructura básica (**Figura 11**). Contienen las proteínas fluorescente cian (CFP) y amarilla (YFP) respectivamente, que proceden de diferentes mutaciones en el gen de la proteína verde fluorescente (GFP).

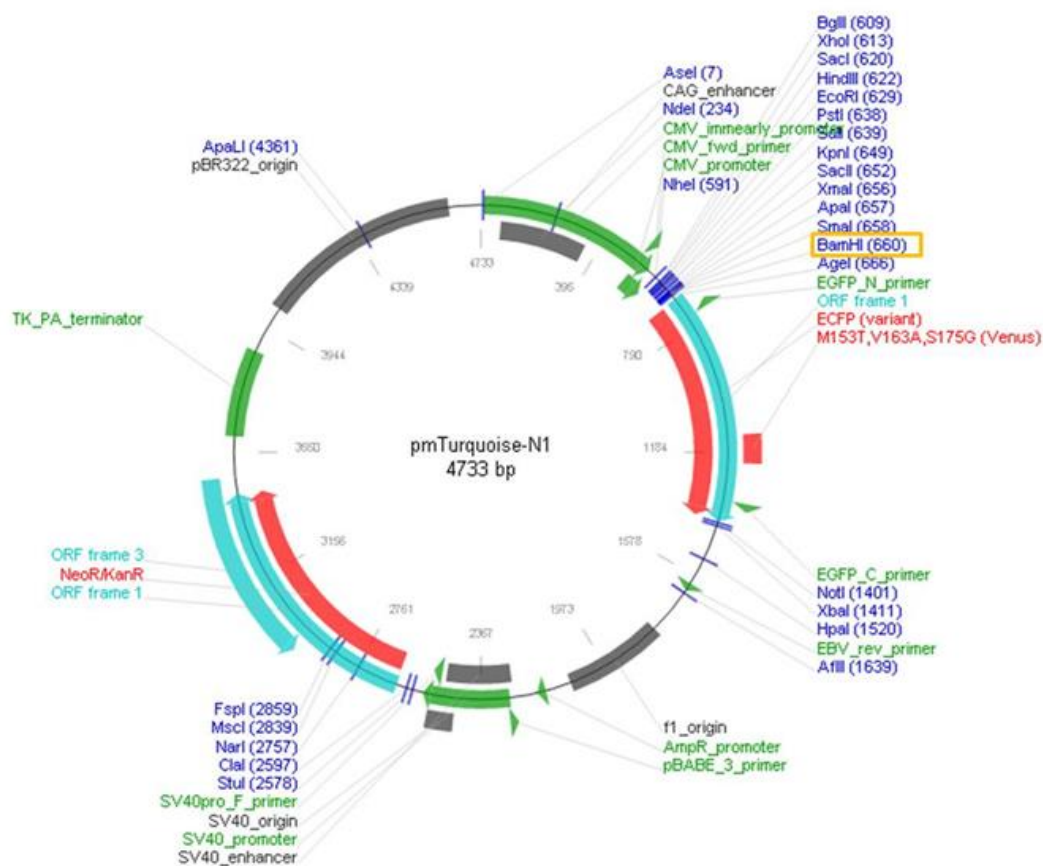


Figura 11. Estructura del plásmido pmTurquoise-N1 usado en las construcciones empleadas en el estudio mediante FRET. Se marca en un recuadro naranja la diana de restricción de BamHI donde se han insertado los diferentes genes. Imagen obtenida de Addgene.org

En todos los casos se han empleado construcciones fusionadas a CFP o YFP, y han sido insertadas en los plásmidos por la diana de restricción de BamH1.

Las construcciones empleadas fueron:

- pmTurquoise- Calnexina (Addgene plasmid #55539, cedido a Addgene por el laboratorio de Michael Davidson).
- pmTurquoise-ER (Addgene plasmid #55550, cedido a Addgene por el laboratorio de Michael Davidson). Esta construcción se caracteriza porque tiene una secuencia KDEL fusionada a CFP. KDEL es un péptido señal (K=Lisina, D=ácido aspártico, E=ácido glutámico, L=Leucina) que queda retenido en el RE, permitiendo su identificación.
- pmTurquoise-CPT1C y SYFP-CPT1C. Ambos fueron cedidos por el laboratorio de la Dra. Dolors Serra (Universidad de Barcelona, UB).
- pmTurquoise-ATL-1, SYFP-Protrudin, SYFP-Glua1. Estas construcciones fueron desarrolladas en nuestro laboratorio, para este trabajo, tal y como se describe a continuación.

1.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de la línea celular SH-S5Y5 (neuroblastoma humano). Estas células se sembraron en placas de 60mm a una concentración de $2,5 \times 10^5$ cél/mL.

Las células se recogieron y se homogenizaron en presencia de TRIzol[®] (15596-026 Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción del ARN.

La concentración final de ARN obtenida se cuantificó por espectrofotometría utilizando el lector de placas micro-placas Synergy HT de Biotek[®].

Para el análisis de la expresión génica de las muestras, en todos los casos, se obtuvo el ADNc a partir de 1µg de ARN mediante la transcriptasa inversa Mu-MLV (# 3022-1 Lucigen).

1.3 Amplificación por PCR

Para las amplificaciones llevadas a cabo en este trabajo se empleó la enzima Q5 Polimerasa (Ref. M0491L, New England Biolabs). Para la mezcla de reacción se emplearon dNTPs a 250µM, oligos directo y reverso a una concentración de 2µM y 1µg de ADNc. La cantidad de enzima empleada fue 0,5µL.

Las condiciones de PCR fueron:

	Proceso	Temperatura °C	Tiempo
	Desnaturalización inicial	98	2 min
x30	Desnaturalización	98	30 s
	Anillamiento	50-72	30 s
	Extensión	72	1 min
	Extensión final	72	7 min
	Hold	10	α

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos usados para la PCR. F: Directo, R: Reverso

NOMBRE	SECUENCIA 5' --- 3'
Atlastina-1 F	CGCGGGCCCGGGATCCATGGCCAAGAACCGCAGGGACAG
Atlastina-1 R	GCGACCGGTGGATCCAACATTTTTTCTTTTCTGATTGTTTCAG
Protrudina F	CGCGGGCCCGGGATCCATGCAGACATCAGAACGTGAGGGGA
Protrudina R	GCGACCGGTGGATCCAACCTTGCTCAAGGTCTGGTTACACGAG
GLUA 1 F	GCGACCGGTGGATCCAACAATCCTGTGGCTCCCAAGGGCATCC
GLUA 1R	CGCGGGCCCGGGATCCATGCCGTACATCTTTGCCTTTTTTCTGC

1.4 Purificación de fragmentos amplificados por PCR

Para separar los diferentes fragmentos de ADN por tamaños y purificar el de interés, las muestras de ADN se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% y las bandas se separaron por electroforesis.

La visualización de las bandas se llevó a cabo en un transluminador con luz UV. Tras la localización de la banda de interés, se recortó con un bisturí y se pasó a un tubo de 1,5mL para su posterior purificación.

Para la purificación del ADN contenido en el gel de agarosa se empleó el kit Nucleo Spin Gel and PCR clean up (Machery Nagel Ref: 740609.250) siguiendo las indicaciones del fabricante.

1.5 Clonación por recombinación

Los insertos fueron introducidos en los plásmidos por el método de recombinación. Para ello previamente los plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción BamH1. Para llevar a cabo la reacción de restricción, se incubó durante 1h 30min a 37°C.

Componentes	Volumen
cDNA	C.s.p 1µg
H ₂ O	25 µL
Buffer	3 µL
Enzima	1 µL

Una vez concluida la restricción, el producto de reacción fue separado en un gel de agarosa y la banda correspondiente al ADN digerido fue purificado mediante el kit indicado anteriormente.

Tras obtener los insertos y los plásmidos, se empleó una relación 1:2 plásmido/inserto para llevar a cabo la reacción de recombinación. En este caso se

emplearon 50ng de plásmido y 100ng de inserto, en un volumen final de 10 μ L (en agua).

1.6 Comprobación de clones positivos y secuenciación

En este trabajo la transformación se realizó mediante un choque térmico en células DH5 α competentes producidas en el laboratorio.

Tras la transformación con los plásmidos, se inoculó una colonia aislada en 3 mL de medio LB líquido (pre-cultivo) con el antibiótico adecuado y se mantuvo durante 8 horas a 37 °C en agitación. Posteriormente se inocularon 1,5 mL de este precultivo en 500 mL de medio LB durante 16 h.

Para el aislamiento y purificación del ADN se empleó el kit Nucleo Spin Plasmid EasyPure (Ref. 740727.250, Macherey nagel) para obtención de cantidades pequeñas de ADN, o Nucleo Bon Xtra Maxi (Ref.740414.50, Macherey nagel) para cantidades mayores.

Para la comprobación de clones positivos, las muestras fueron secuenciadas en el servicio de Unidad Genómica de la Universidad de Barcelona (CCiT).

2. LÍNEAS CELULARES

En este trabajo se han utilizado diferentes líneas celulares:

HEK293T: derivan de riñón humano embrionario. Han sido empleadas para la fabricación de lentivirus, y estudios de FRET. Obtenidas del servicio de la Universidad Autónoma de Barcelona.

HeLa: derivan de cáncer cervicouterino humano. Han sido empleadas para estudios de estructuras celulares y transporte intracelular. Fueron cedidas por el Dr. Harald Stenmark (Centro de Investigación del Cáncer, Facultad de Medicina, Universidad de Oslo)

SH-S5Y5: derivan de neuroblastoma humano. Han sido empleadas para obtener ARN y obtener los genes para las construcciones de FRET. Obtenidas de ATCC (www.ATCC.org).

En todos los casos las células han sido mantenidas a 37°C y con un 5% de CO₂ y cultivadas en medio de crecimiento completo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, E15-009 PAA) con alto contenido de glucosa (4,5 g/L), 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2 mM de glutaMAX™ (#35050 Life Technologies).

2.1 Transfección

En este trabajo se han empleado diferentes métodos de transfección, según el tipo celular y la eficiencia requerida.

FuGENE® HD (Ref. E2311 Promega): este método fue empleado para transfectar con dos plásmidos simultáneamente las células HeLa con el objetivo de incrementar la eficiencia de transfección. Se siguió el protocolo facilitado por el fabricante para esta línea celular.

Fosfato cálcico: fue empleado para la transfección de células HEK293T, tanto para la producción de lentivirus como para la técnica de FRET (ambas técnicas se detallan en el capítulo siguiente).

2.2 Obtención de lentivirus

El objetivo de fabricar virus para la sobreexpresión de CPT1C fue mejorar la eficiencia de la transfección en neuronas corticales en cultivo.

En esta aproximación se han empleado dos plásmidos: el vector pWpi y pWpi-CPT1C (**Figura 12**). Los lentivirus son virus de la familia Retroviridae, cuyo genoma se basa en ARN, replicándose a través de la formación de un ADN provisional mediante retrotranscripción. Los retrovirus dependen de transcriptasas inversas para llevar a cabo esta retrotranscripción y de integrasas para que su ADN sea insertado en el genoma de las células huésped. De esta manera el material genético introducido es integrado y heredado por las células hijas, aunque los lentivirus ofrecen la ventaja de ser altamente eficientes no solo en células que se dividen, sino también en células que no están destinadas a dividirse como las neuronas. Sin embargo los lentivirus no tienen la capacidad de autorreplicarse por lo que una célula infectada no es capaz de generar más viriones.

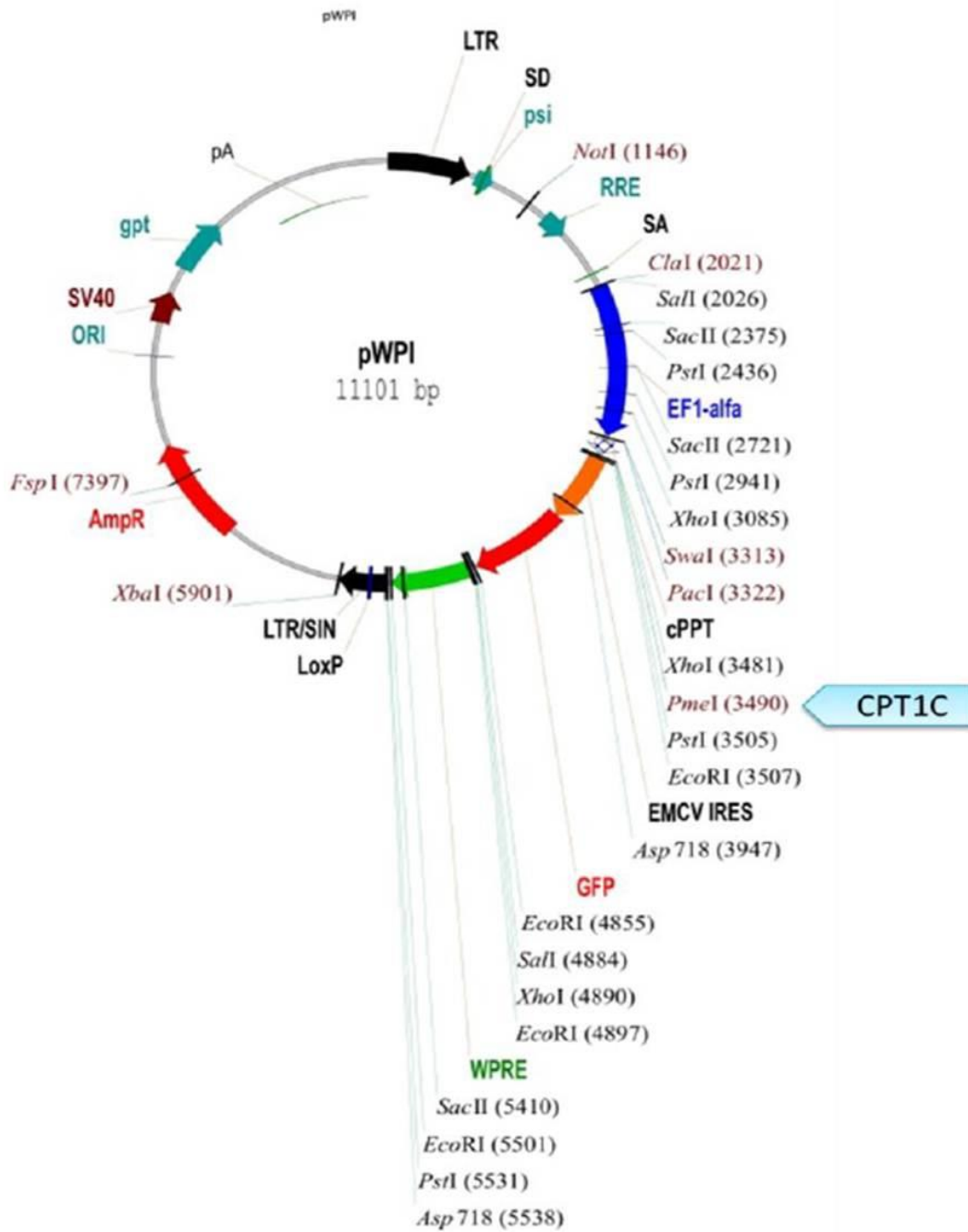


Figura 12. Mapa del plásmido pWpi. CPT1C fue introducida en el vector en el lugar de restricción para PmeI.

A. Producción

Para la generación de lentivirus, además del vector lentiviral (pWpi) también son necesarios un vector de empaquetamiento vírico (cápside) y otro de envoltura vírica que permite la fusión con la membrana de la célula huésped para introducir la cápside que contiene el genoma. Los vectores de empaquetamiento vírico utilizados fueron psPAX2 (#12260 Addgene) y pMD2.G (#12259 Addgene). El protocolo seguido fue el siguiente:

Preparación de las células HEK293T para la transfección. El día anterior a la transfección se sembraron 4×10^6 células/pocillo en placas de cultivo de 100mm (3 placas por cada plásmido), con el fin de alcanzar el 80% de confluencia en el momento de la transfección.

Transfección con fosfato cálcico. 2 h antes de la transfección se eliminó el medio y se añadieron 10 mL de medio fresco por placa. Para transfectar 3 placas, se preparó la mezcla en el siguiente orden:

Componentes	Cantidades
pWpi/CPT1C (1 mg/mL)	45 μ g
pMD2.G (1 mg/mL)	15,9 μ g
psPAX (1mg/ml)	29,1 μ g
¹ TE 0,1 X	1,3 mL
H ₂ O tamponada	727 μ L
CaCl ₂ 2,5 M	223 μ L
² HeBS 2X	2,25 mL

Es importante que el HeBS se añada gota a gota y con la placa en agitación con *vortex* (asegurando la formación de un precipitado óptimo para la transfección), y dejar el precipitado a temperatura ambiente 20 minutos. A continuación se añadió gota a gota 1,5 mL de la mezcla por placa.

A la mañana siguiente se aspiró el medio y se añadió lentamente 5 ml de medio fresco y se dejó incubar durante 8 horas a 37°C.

Recogida de medios de cultivo. Se recogió el medio de cultivo en un tubo de 50 mL y se almacenaron a 4°C. Seguidamente se añadieron 5 ml de medio fresco y se incubó entre 8-12 horas. Los sobrenadantes pueden ser recuperados 2 o 3 veces, cada 8-12 horas en un mismo tubo que es mantenido a 4°C hasta que finalice el periodo de recogida.

Concentración de sobrenadantes. Para la concentración se usaron tubos concentradores de Sartorius (Ref. VS2042). Se siguió las recomendaciones del fabricante hasta conseguir reducirlo a un volumen final de 200µL.

B. Infección de células para la titulación vírica

La titulación vírica se realiza con el objetivo de conocer la concentración de virus en un volumen. Para ello se emplean una serie de diluciones para obtener la información cuantitativa. El título se corresponde con el factor de dilución más alto que es capaz de producir virus. El protocolo seguido fue el siguiente:

Día 1: sembrar 4×10^4 cél/pocillo en placas P24.

Día 2:

1. Contar las células de dos pocillos y hacer la media, para conocer el valor real de células que serán infectadas.
2. Transducir las células con 8 diluciones seriadas 1:2.
3. Dejar un pocillo sin virus como control negativo de la transducción.

Día 3: añadir 1mL de medio de cultivo a cada pocillo.

Día 5: recoger las células para analizarlas por citometría de flujo.

C. Titulación viral

La citometría de flujo es una técnica que nos permite la identificación de distintos tipos celulares en función de su tamaño y complejidad. La técnica de FACS (del inglés *fluorescent- activated cell sorting*) es un tipo especializado de citometría que nos permite además la detección de aquellas células que emiten fluorescencia. Las células recogidas fueron analizadas en un citómetro de flujo de nuestro laboratorio (BD FACSalibur™) obteniendo el número de células infectadas (aquellas que emiten fluorescencia debido a la introducción de GFP) presentes en la mezcla.

Los datos proporcionados por el citómetro fueron analizados con el programa WinMDI de modo que para cada muestra se pudo calcular el porcentaje de células GFP positivas y negativas. A partir de estos valores se generó la curva de diluciones y se calculó la concentración de virus en unidades de transducción por mililitro (TU/mL) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{TU/mL} = \frac{\% \text{ Células GFP positivas} \times \text{número de células (contadas a los 2 días)}}{\mu\text{L de virus}}$$

Reactivos:

¹Tampon TE 1X pH 8: 10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH 8.

²Agua tamponada: agua MQ suplementada con 2,5mM HEPES pH 7,3.

³2X HeBS (HEPES Buffered Saline): Para 1L de H₂O se añadió: 280mM NaCl, 50mM HEPES, 1,5mM Na₂HPO₄·2H₂O. Se ajustó el pH a 7 con 5M NaOH.

3. CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

3.1 Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas a partir de células en cultivo, se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con PBS 1X. Las células se recogieron con ¹tampón de lisis suplementado con ²inhibidores de proteasas y de ³fosfatasas en caso necesario. Las células recogidas se mantuvieron en agitación durante 30 min a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 12.000 rpm a 4°C para eliminar los restos celulares, y los extractos se almacenaron a -20°C.

La cuantificación de la concentración proteica de las muestras se realizó siguiendo las instrucciones del kit BCA Protein-Assay (Pierce BCA Protein Assay Kit. Ref 23227 Thermo Fisher).

Reactivos:

¹Tampon de lisis: Tris 20mM pH 7,4, EDTA 5mM, Np-40 1%, NaCl 150mM.

²Inhibidores de proteasas: Pierce™ Proteasa Inhibitor Tablets #8826 Thermo Scientific

³Inhibidores de fosfatasas: Pierce™ Phosphatase Inhibitor Mini Tablets #88667 Thermo Scientific.

3.2 Western Blot

Para la separación electroforética se emplearon geles de acrilamida comerciales al 10% (Ref. 5671034 Bio-Rad). La electrotransferencia se realizó a 400 mA durante 1h 30 min a 4°C. Se emplearon membranas de PVDF, previamente activadas con metanol. Posteriormente el bloqueo se realizó en leche desgrasada al 5% disuelta en TBS con 0,1% de Tween 20. Todos los anticuerpos primarios (**Tabla 2**) empleados en este trabajo fueron incubados durante la noche a 4°C en agitación. La incubación con los anticuerpos secundarios (**Tabla 2**) se

realizó durante una hora a temperatura ambiente a una dilución 1:10.000. La detección de los anticuerpos secundarios unidos a HRP (del inglés *Horseradish Peroxidase*) se realizó mediante quimioluminiscencia, usando el sustrato *Luminata Forte* WBLUF0500 Millipore. En algunos casos en los que la señal era más débil, se usó *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate*, 34095 Sigma).

3.3 Inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se incubaron en solución de bloqueo con suero de cabra al 10% y tritón al 0.1% en PBS durante 1h a temperatura ambiente. En todos los casos la incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla 2**) se realizó durante toda la noche a 4 °C. Para los anticuerpos secundarios se empleó una dilución 1:1000 en solución de bloqueo, y fueron incubados durante 1h a temperatura ambiente en condiciones de humedad y oscuridad. Tras la incubación con el anticuerpo secundario (**Tabla 2**) se incubó durante 5 min con Hoechst 33342 diluido 1:1000 en PBS. Posteriormente las preparaciones fueron montadas en portaobjetos utilizando como medio de montaje Fluoromount-G® (#0100-01 Southern Biotech).

Tabla 2. Anticuerpos empleados para *western blot* e IF.

Anticuerpos Primarios WB	Referencia	Dilución
Anti- CPT1C	Sintetizado contra los últimos 14aa de CPT1C de ratón.	1:5000
Anti- AMPK	2603 Cell Siganling.	1:1.000
Anti- fosfo AMPK	2535S Cell Signaling.	1:1.000
Anti- β Tubulina	T2200 Sigma.	1:5.000
Anti- GAPDH	AM4300 Applied Biosystems.	1:25.000
Anticuerpos Primarios IF	Referencia	Dilución
Anti- LAMP-1	L1418 Sigma.	1:200
Anti- Calreticulina	Ab2907 Abcam.	1:200
Anti-Neurofilamento	Smi312r Covance.	1:1.000
Anticuerpos Secundarios	Referencia	Dilución
Anti- Conejo	9340 Amersham Bioscience.	1:10.000
Anti- Ratón	515-035-003 Jackson Immunoresearch.	1:10.000
Anti Ratón (Alexa Fluor 488)	A11001 Invitrogen.	1:1.000
Anti Ratón (Alexa Fluor 594)	A11005 Invitrogen.	1:1.000
Anti Conejo (Alexa Fluor 488)	A11008 Invitrogen.	1:1.000
Anti Conejo (Alexa Fluor 594)	A11012 Invitrogen.	1:1.000

4. INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS

Técnica de FRET (Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente)

Para el estudio de la interacción de proteínas se empleó la técnica de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET). Esta técnica está basada en la transferencia de energía no radiante, sin absorción ni emisión de fotones, desde un fluoróforo en estado de excitación (donador) a otro cercano (aceptor). La transferencia de energía se relaciona directamente con la distancia (r) de separación entre el donador y el acepto.

$$\text{FRET}_{\text{ef}} = 1 / [1 + (r/R_0)^6]$$

La resolución de FRET viene definida por “ R_0 ” que normalmente es menor a 10-70Å. R_0 depende de la extensión del solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el de excitación del acepto, el rendimiento cuántico del donador, y la orientación relativa entre el donador y el acepto. Para que se produzca el fenómeno de FRET la distancia entre el donador y el acepto debe ser entre 1 y 10 nm, y los espectros de emisión del donador y el de excitación del acepto han de solaparse (**Figura 13**).

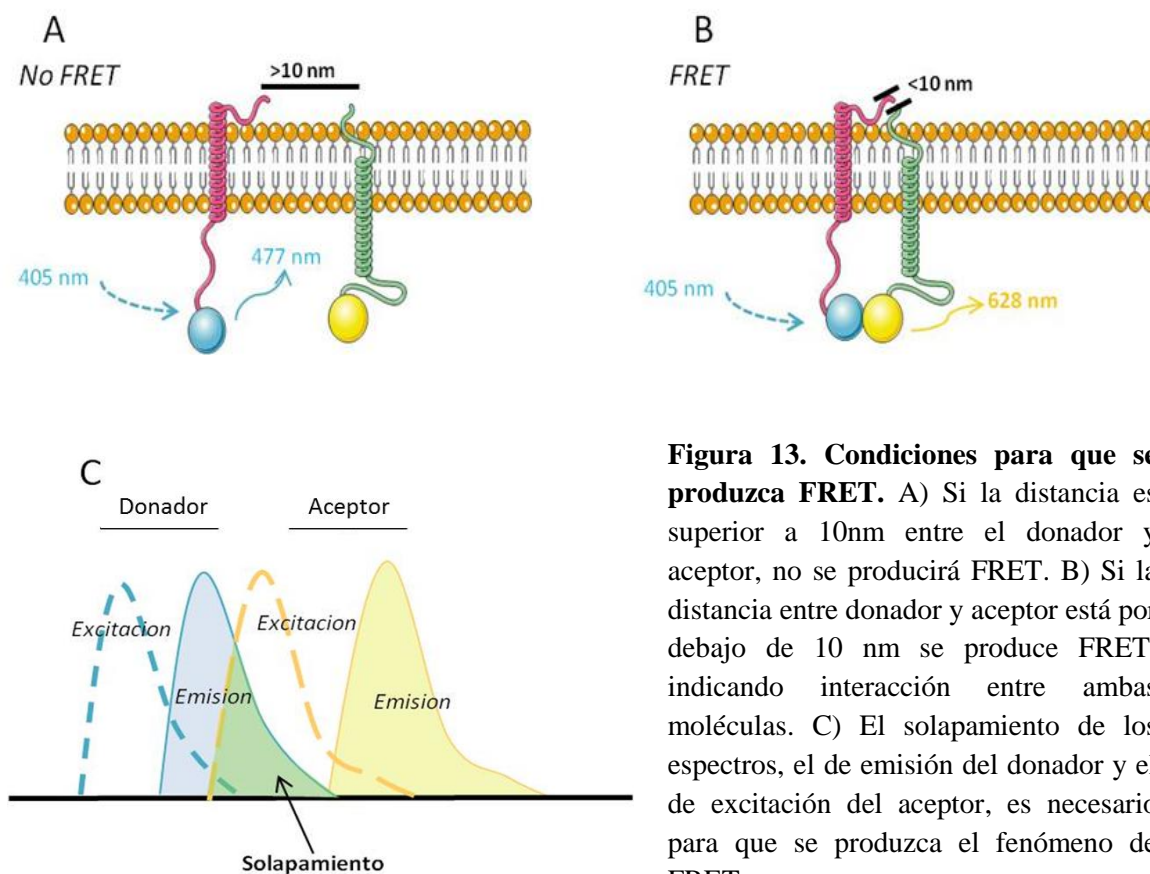


Figura 13. Condiciones para que se produzca FRET. A) Si la distancia es superior a 10nm entre el donador y aceptor, no se producirá FRET. B) Si la distancia entre donador y aceptor está por debajo de 10 nm se produce FRET, indicando interacción entre ambas moléculas. C) El solapamiento de los espectros, el de emisión del donador y el de excitación del aceptor, es necesario para que se produzca el fenómeno de FRET.

Existen diferentes tipos de medidas de FRET. En este trabajo la medida de FRET empleada ha sido por *photobleaching* del aceptor, es decir, fotodestrucción del fluoróforo aceptor. En este tipo de medida se evalúa el cambio de intensidad de señal de la molécula donadora (**Figura 14**). Si la aproximación de las dos moléculas es inferior a 10 nm se observa un incremento de la intensidad de señal en el donador tras la fotodestrucción del aceptor.

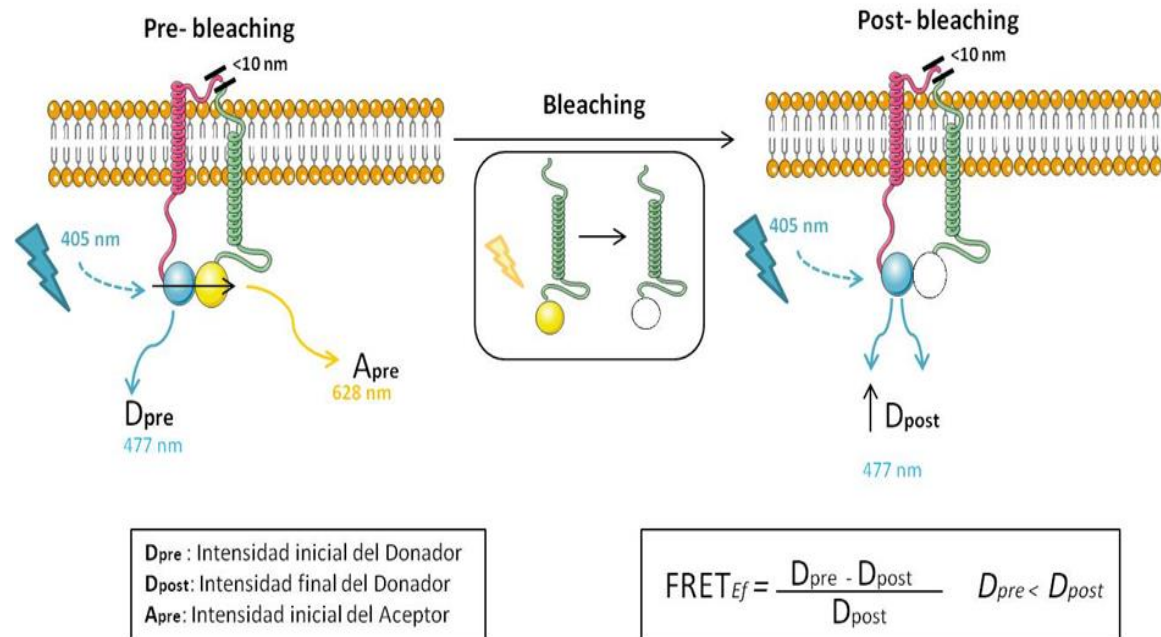


Figura 14. Medida de FRET por el método de fotodestrucción del aceptor. Se mide inicialmente la intensidad emitida por el donador y el aceptor. Se lleva a cabo la fotodestrucción (*bleaching*) del aceptor, y se vuelve a medir la intensidad de la señal emitida por el donador. Si hay FRET positivo la intensidad final tiene que ser mayor a la inicial.

Protocolo

La línea celular empleada en esta técnica fue HEK293T. Se sembraron 30.000 cél/pocillo en placas P24, sobre cubreobjetos tratados previamente 1 h a 37°C con poli-L-Lisina.

A las 24 horas se llevó a cabo la transfección con CaCl₂, (tal y como se describe en el apartado 2.3.A) ajustando los volúmenes para placas de 24 pocillos.

Las células se fijaron a las 24 h de la transfección con PFA al 4%. Para el montaje de las preparaciones en portaobjetos se empleó Prolong Diamond Antifade (Ref: P36970).

Los estudios de FRET se llevaron a cabo en el Servicio de Microscopía de la UB.

5. CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CORTICALES

Se emplearon cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de 16 días de gestación de ratones C57BL/6J salvajes y deficientes de CPT1C.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Tratamiento de cubreobjetos y placas. Los cubreobjetos fueron tratados con poly-D-Lisina para asegurar la adherencia de las células a la superficie. La concentración utilizada fue de 100 µg/mL para cubreobjetos y 50 µg/mL para placas multipocillos P6. Se incubaron durante 1h a 37 °C y después se lavaron con PBS 1X.

2. Procesamiento del tejido.

- Las cortezas cerebrales se recogieron en la ²solución 1 y se centrifugó 30s a 1500 rpm.

- Se aspiró el sobrenadante y se añadió la ³solución 2 sobre el precipitado. Se mantuvo durante 10 min a 37°C.

- Se añadió sobre la solución 2 la ⁵solución 4 para inactivar la tripsina y se centrifugó 30 s a 1500rpm.

- El precipitado se resuspendió con pipeta pasteur en la ⁴solución 3.

- Las células se pasaron por un filtro de nylon (Tela Sefar NITEX #3A03-0041-108-00) y se pasaron al tubo con la ⁶solución 5. Se centrifugaron 5 min a 1000 rpm.

- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 15 mL de ⁷medio completo.

3. Siembra de células. El número de células sembradas fue 5×10^5 cel/pocillo para placas p6 multipocillos y 5×10^4 cél/pocillo para multipocillos P24. La siembra se realizó en medio completo.

4. Aislamiento de neuronas. Para favorecer el crecimiento de neuronas y eliminar otros tipos celulares se empleó medio ⁸neurobasal suplementado, a las 4 horas después de sembrar. Se cambió el medio cada 3 días.

Reactivos:

KBR 10X (Krebs-Ringer Buffer 10x): para 500 mL de H₂O MilliQ: 17,7 g NaCl, 0,9 g KCl, 0,415 g KH₂PO₄, 5,35 g NaHCO₃ y 6,43 g Glucosa.

¹PBS 1X suplementado con glucosa 30% y 100U/mL Penicilina y 100µg/mL Estreptomicina.

²Solución 1: 50 mL KBR 1X, 0,15 g BSA, 400 µL MgSO₄·7H₂O 3,8%.

³Solución 2: 10 mL de solución 1 y 2,5 mg de tripsina (Sigma).

⁴Solución 3: 10 mL de solución 1, 0,8mg DNAsa (Sigma), 5,2 mg Inhibidor de tripsina (Sigma) y 100 µL MgSO₄·7H₂O 3,8%.

⁵Solución 4: 8,4 mL solución 1 y 1,6 mL solución 3.

⁶Solución 5: 5 mL solución 1, 40 µL MgSO₄·7H₂O 3,8% y 6 µL CaCl₂·2H₂O.

⁷Medio completo: DMEM, 10% FBS inactivado por calor, 100U/mL Penicilina y 100µg/mL Estreptomicina, 4 mM de glutaMAX™.

⁸Medio Neurobasal suplementado: Neurobasal (Ref. 21103-049 Gibco), B27 1X (Ref. 17504-044 Gibco), 100U/mL Penicilina y 100µg/mL Estreptomicina.

5.1 Genotipado

Para los cultivos primarios de neuronas corticales empleados en este trabajo se utilizaron animales salvajes y deficientes de CPT1C. Para verificar el genotipo de los animales, se analizó el ADN obtenido de las colas por PCR, utilizando simultáneamente 3 cebadores específicos que permiten la identificación tanto de

los homocigotos como de los heterocigotos. La secuencia de los oligonucleótidos empleados fueron:

Directo: KOF9: 5'- GAGTCAGCCATGACCCGACTGTTG- 3'

Reverso: KOR1: 5'- CCGGTAGAATTGACCTGCAGGGGC-3'

Reverso: KOR9: 5'- CGCTAAAGCCCAGACAGAACACAC-3'

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism5. Los resultados obtenidos se expresan como el promedio \pm SEM. El análisis comparativo de los resultados obtenidos se realizó utilizando el test estadístico ANOVA. Con p-valor menor a 0,05 se considera que existen diferencias significativas entre las muestras.



RESULTADOS

1. PAPEL DE CPT1C EN EL CRECIMIENTO AXONAL Y DESARROLLO DENDRÍTICO

Rinaldi y colaboradores en 2015 publicaron un artículo en el que se describía una familia italiana que presentaba PEH debido a una mutación en CPT1C. Esta enfermedad, como se ha descrito anteriormente, se produce por una alteración en el tracto corticoespinal, afectando principalmente al crecimiento y desarrollo de neuronas corticales. Estudios previos en nuestro laboratorio habían demostrado que los ratones deficientes de CPT1C presentaban alteraciones motoras.

Con estos datos previos, se decidió estudiar el papel de CPT1C en el crecimiento axonal y desarrollo dendrítico. Para ello se emplearon cultivos primarios de neuronas corticales de ratones salvajes (WT) y ratones deficientes de CPT1C (KO CPT1C). También se estudió si la sobreexpresión de CPT1C en neuronas de ratones WT presentaba algún efecto, y para ello se emplearon construcciones víricas con CPT1C o EV (vector vacío, *empty vector*). Para algunos estudios también se empleó la sobreexpresión de CPT1C^{M589S}, una versión mutada de CPT1C desarrollada en nuestro laboratorio, en la cual la metionina en la posición 589 se cambió por una serina. Como resultado de esta mutación la proteína pierde la capacidad de unir malonil-CoA. Esta mutación fue desarrollada previamente por Morillas y colaboradores para CPT1A, isoforma en la que se comprobó que perdía la capacidad de unión a malonil-CoA pero seguía manteniendo la actividad (Go et al. 2003).

1.1 Papel de CPT1C en el crecimiento axonal.

El estudio del crecimiento axonal se llevó a cabo por inmunofluorescencia con un marcador axonal, anti-neurofilamento (anti-SMI312), en neuronas corticales procedente de ratones WT y KO CPT1C a los 4 días de cultivo. Se decidió fijar las células a los 4 días, cuando las neuronas ya presentan un axón desarrollado.

La **Figura 15B** muestra cómo las neuronas KO CPT1C presentan una disminución en el crecimiento axonal respecto a las WT. Esta disminución también se observa en las neuronas en las que se sobreexpresa CPT1C^{M589S} (WT+

CPT1C^{M589S}) en comparación con las que contienen el EV (WT+EV). En cambio cuando sobreexpresamos la forma salvaje de CPT1C (WT+CPT1C) no se observan cambios.

En la representación de la distribución de los axones por tamaño (**Figura 15C-D**) se observa que en neuronas KO CPT1C hay un desplazamiento hacia la izquierda, indicando que hay mayor número de neuronas con axones más cortos que en las neuronas WT. La sobreexpresión de CPT1C apenas tiene efecto respecto al EV, mientras que la CPT1C^{M589S} presenta un patrón similar al KO CPT1C.

Estos resultados indican que CPT1C es necesaria para el correcto crecimiento axonal, y además tiene que mantener intacto el lugar de unión a malonil-CoA, ya que en el caso de CPT1C^{M589S}, que no une malonil-CoA, se observa un efecto similar al producido en neuronas KO CPT1C.

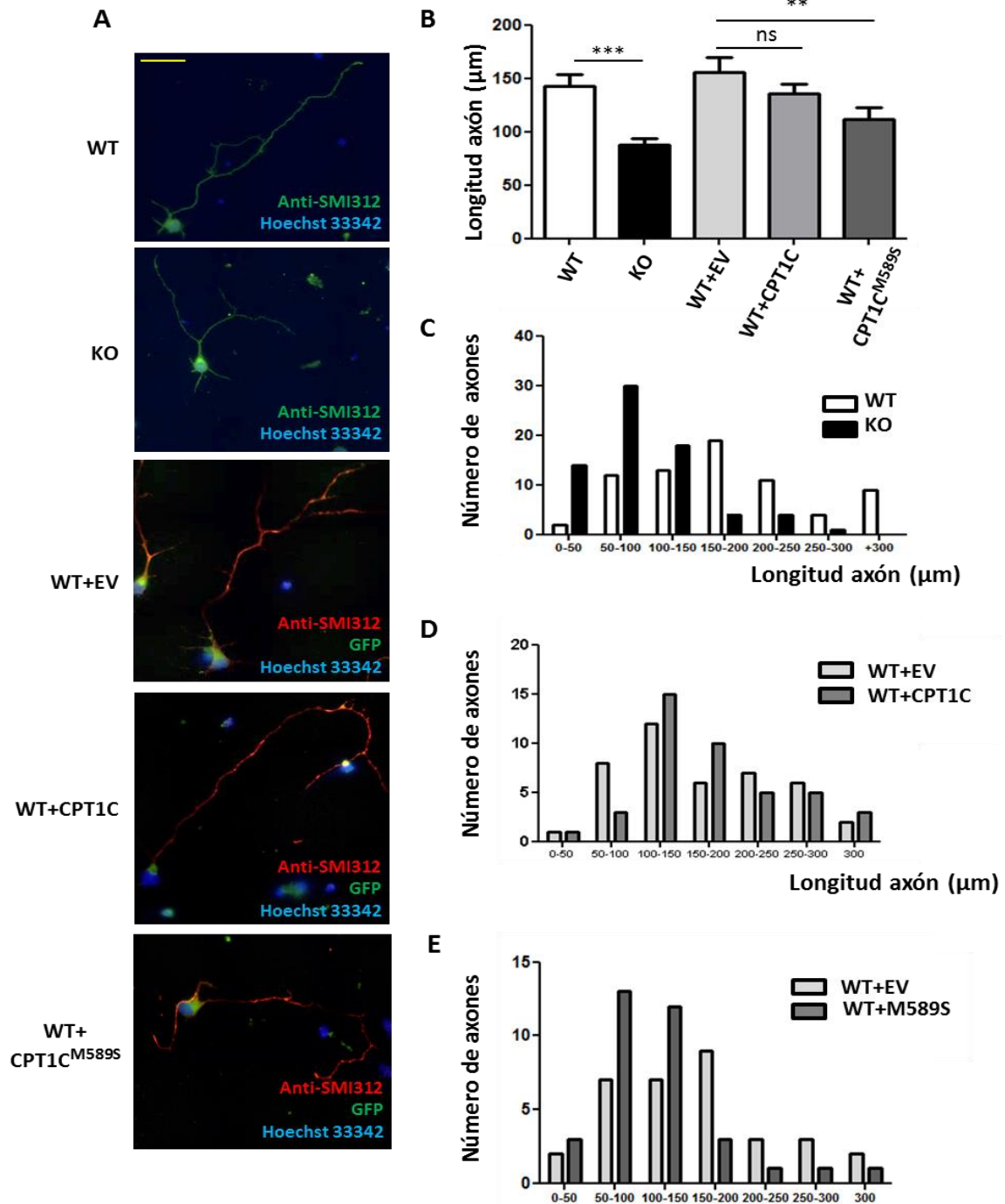


Figura 15. CPT1C es necesaria para el correcto crecimiento axonal. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de neuronas corticales de animales salvajes (WT) y deficientes de CPT1C (KO), y neuronas WT infectadas con lentivirus conteniendo el vector vacío (WT+EV) o en las que se ha sobreexpresado CPT1C (WT+CPT1C) o CPT1C^{M589S} (WT+CPT1C^{M589S}). B) Cuantificación de la longitud axonal. Se analizaron 100 células por condición, con el programa NisElement (NIKON). C) Cuantificación de la longitud axonal por intervalos de tamaños. Los resultados se muestran como promedio ± SEM. ***p<0,001, **p<0,01 n.s: no significativo. La barra de escala equivale a 50 µm. Se utilizó un microscopio NIKON Eclipse Ti con una cámara Andor CCD clara. El objetivo empleado fue 60X.

1.2 Papel de CPT1C en la ramificación dendrítica.

Para completar los resultados obtenidos en el punto anterior se decidió estudiar si CPT1C, además de estar involucrada en el desarrollo axonal, también podía tener un efecto sobre la ramificación dendrítica.

Este estudio se llevó a cabo en neuronas fijadas tras 4 días de cultivo mediante inmunofluorescencia con anti-calreticulina como marcador de dendritas. Para la cuantificación de estos experimentos se empleó el sistema de radios concéntricos. Se establecieron radios consecutivos separados 10 μm , y se cuantificó el número de cruces para cada uno de los radios.

En la **figura 16** se observa que las neuronas KO CPT1C presentan una disminución del árbol dendrítico respecto a las WT. Al sobreexpresar CPT1C en neuronas WT (WT+CPT1C) no se observan cambios con respecto a las que contienen el EV (WT+EV).

Estos resultados muestran que CPT1C es necesaria para el correcto desarrollo del árbol dendrítico.

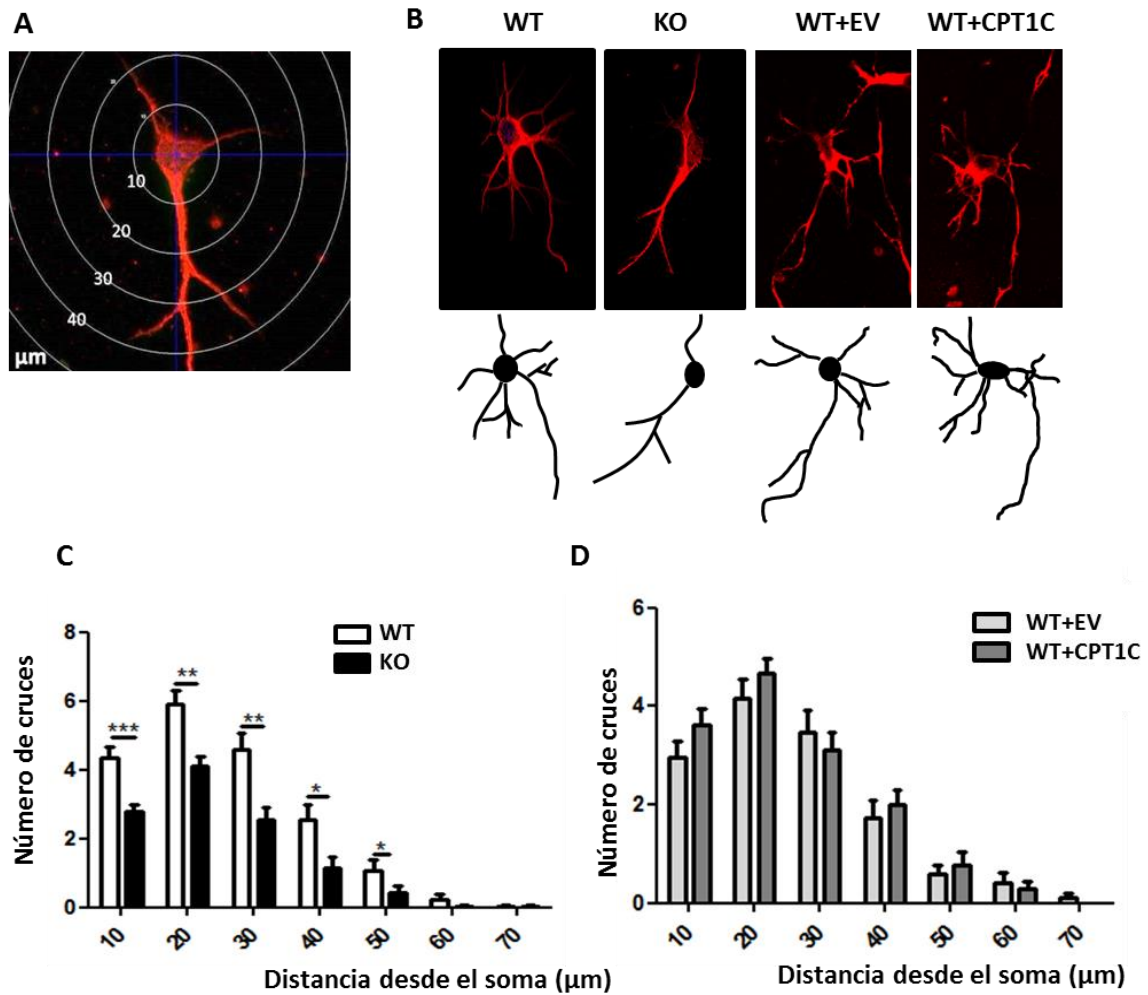


Figura 16. CPT1C es necesaria para la correcta formación del árbol dendrítico. A) La ramificación dendrítica fue calculada por el sistema de radios. Se cuantificó el número de cruces por radios separados 10μm. B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia con anticálcetulina. Bajo ellas se muestra el dibujo del esqueleto de una neurona representativa para cada condición. C-D) Cuantificación del número de cruces por radios. Se analizaron 100 células por condición, con el programa NIS-Elements (NIKON). Los resultados se muestran como promedio ± SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Las diferencias entre WT+EV y WT+CPT1C no fueron significativas. Las imágenes se realizaron con un microscopio NIKON Eclipse Ti con una cámara Andor CCD clara. El objetivo empleado fue 60X.

1.3 Implicación de CPT1C en la polarización celular.

El crecimiento del axón desde el soma en neuronas se conoce con el nombre de polarización. Es el primer paso en la formación y función de la red neuronal. Este proceso comienza con una extensión rápida de una neurita simple para producir posteriormente el axón.

Los resultados obtenidos en los puntos anteriores muestran la importancia de CPT1C en el crecimiento axonal, por ello nos planteamos si esta disminución de la longitud es en realidad un reflejo de una disminución o déficit en el proceso de polarización. Para ello, en las mismas condiciones de los experimentos anteriores, se cuantificó el porcentaje de células polarizadas (con axón) y el de células sin ramificar (sin axón ni dendritas), a los 4 días de cultivo.

Como se muestra en la **Figura 17A** el porcentaje de células WT en cultivo polarizadas es significativamente superior al de las células KO CPT1C. Cuando se cuantificó el porcentaje de células sin ramificar (**Figura 17B**) se observó un incremento en las células KO CPT1C. Los datos obtenidos nos muestran que CPT1C es importante para la previa polarización celular y posterior longitud y ramificación axonal.

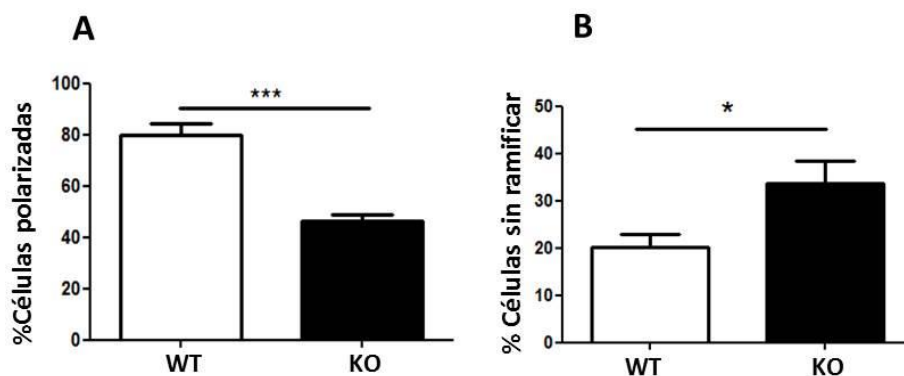


Figura 17. CPT1C es necesaria para la correcta polarización y ramificación neuronal. A) Cuantificación del porcentaje de células polarizadas (con axón) en cultivo de WT y KO CPT1C. B) Cuantificación del porcentaje de células sin ramificar (sin axón ni dendritas) en WT y KO CPT1C. Se analizaron 100 células por condición, con el programa NISElements (NIKON). Los resultados se muestran como promedio \pm SEM. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$. Las imágenes se realizaron con un microscopio NIKON Eclipse Ti con una cámara Andor CCD clara. El objetivo empleado fue 60X.

1.4 Reversión del crecimiento axonal en neuronas KO CPT1C.

Para completar estos resultados y esclarecer si estos cambios en el desarrollo axonal y dendrítico eran directamente dependientes de CPT1C y de su capacidad de unión a malonil-CoA se decidió sobreexpresar CPT1C y CPT1C^{M589S}, y estudiar si este déficit era revertido. Para ello se sobreexpresó la forma salvaje de CPT1C (KO+CPT1C) o la CPT1C^{M589S} (KO+CPT1C^{M589S}) a los 2 días de cultivo en neuronas deficientes de CPT1C. Las células fueron fijadas a los 4 días de cultivo, como en los experimentos anteriores.

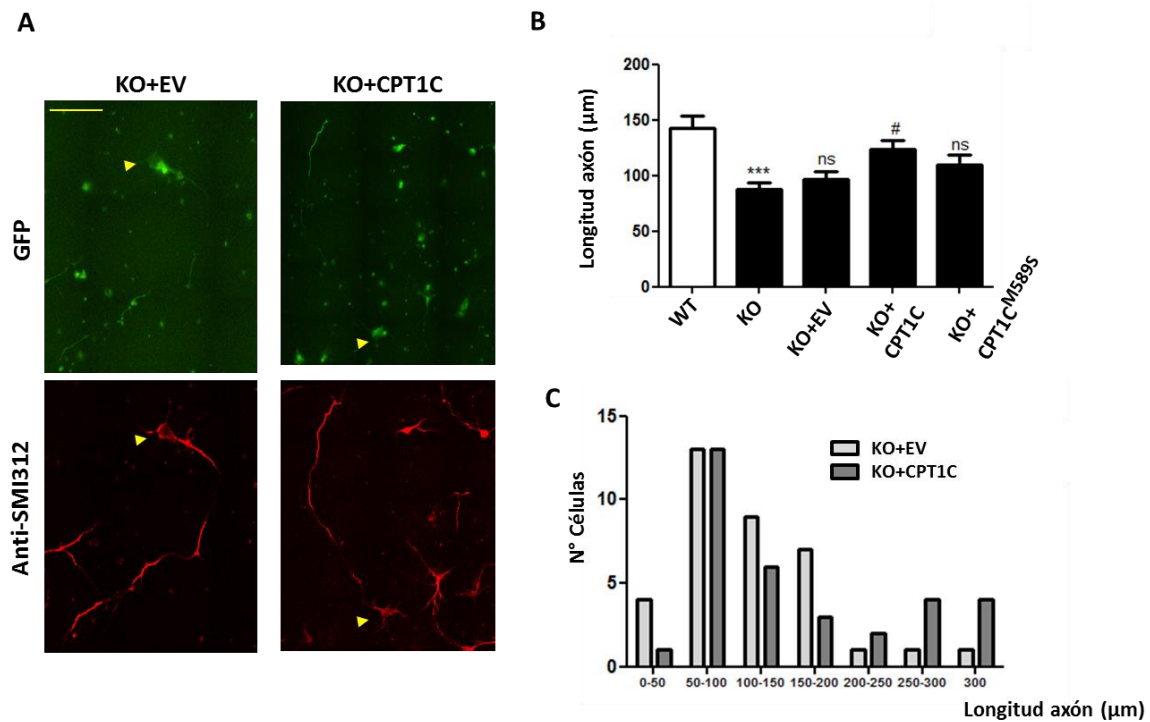


Figura 18. Reversión del crecimiento axonal en neuronas KO CPT1C. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia en neuronas corticales KO CPT1C en las que se ha sobreexpresado CPT1C mediante infección con lentivirus que co-expresan GFP o bien con el vector vacío (EV) como control. En verde se muestra la señal de GFP procedente de las células transducidas, y en rojo el marcaje por neurofilamento (anti-SMI312). B) Cuantificación de la longitud axonal en neuronas WT sin infectar o WT con el vector vacío (WT+EV), y en neuronas deficientes de CPT1C con el vector vacío o sobreexpresando la forma salvaje o mutada de CPT1C (KO+CPT1C y KO+CPT1C^{M589S} respectivamente). Se analizaron 120 células por condición, con el programa NISElements (NIKON). Los resultados son representados como promedio ± SEM. ***p<0,001 respecto al WT. # p<0,05 y n.s: no significativo, respecto a KO+EV. C) Longitud axonal por intervalos. La barra de escala equivale a 50 µm. NIKON Eclipse Ti con una cámara Andor CCD clara. El objetivo empleado fue 60X.

Cuando se sobreexpresa CPT1C en neuronas KO, hay un aumento significativo del crecimiento axonal. Este efecto no es observado cuando se sobreexpresa CPT1C^{M589S} (**Figura 18B**). Además, en la **Figura 18C** en la que se representan los axones por intervalos de tamaño, al sobreexpresar CPT1C se observa la gráfica desplazada hacia la derecha, es decir hacia los axones más largos.

Estos resultados confirman que CPT1C es necesaria para el correcto crecimiento axonal, y este crecimiento es dependiente de la capacidad de unión de malonil-CoA a CPT1C, puesto que la sobreexpresión de CPT1C^{M589S} en neuronas KO CPT1C no es capaz de recuperar el crecimiento axonal.

1.5 Papel de CPT1C en el crecimiento axonal en relación con el estado energético.

La biosíntesis de las estructuras celulares necesarias para la polarización y posterior crecimiento axonal necesita de una coordinación con el estado energético de la célula. Se ha descrito que AMPK (Proteína Kinasa Activada por AMP) es un sensor energético responsable del mantenimiento de la homeostasis energética en células eucariotas, y juega un papel importante en la iniciación del crecimiento axonal.

En los apartados anteriores hemos descrito la importancia de CPT1C y la unión de malonil-CoA en el crecimiento axonal y polarización. Teniendo en cuenta que la concentración de malonil-CoA disminuye en respuesta a la activación de AMPK (Jiang et al. 2016), decidimos estudiar si las neuronas KO CPT1C, que presentan alteraciones en la polaridad neuronal, presentaban una respuesta alterada a la señalización de AMPK en relación al crecimiento axonal.

Para ello se trataron las células con AICAR (5- aminoimidazol 4- carboxamida) un agonista de AMPK y se analizó la longitud axonal. AICAR activa directamente a AMPK produciendo su fosforilación e inhibiendo de este modo a la ACC

(acetil-CoA carboxilasa) y dando lugar a una disminución de los niveles de malonil-CoA (Jiang et al. 2016).

Mediante western blot se analizó el nivel de fosforilación de AMPK tras el tratamiento con AICAR tanto en neuronas procedentes de animales WT como de animales KO de CPT1C. En la **figura 19B** se observa una activación de AMPK en neuronas WT en respuesta al tratamiento con AICAR. En el caso de las neuronas KO de CPT1C esta activación no fue estadísticamente significativa aunque tal y como se muestra en la figura se observó una clara tendencia. Observamos que las neuronas WT tratadas con AICAR presentan una disminución en la longitud axonal en comparación con las no tratadas. Sin embargo, en el caso de las neuronas KO CPT1C no se producen cambios tras el tratamiento, lo que nos indica que no responden a la activación de AMPK (**figura 19C**).

Con los datos obtenidos se puede afirmar que CPT1C participa en el crecimiento axonal y esta actividad es dependiente de la unión a malonil-CoA.

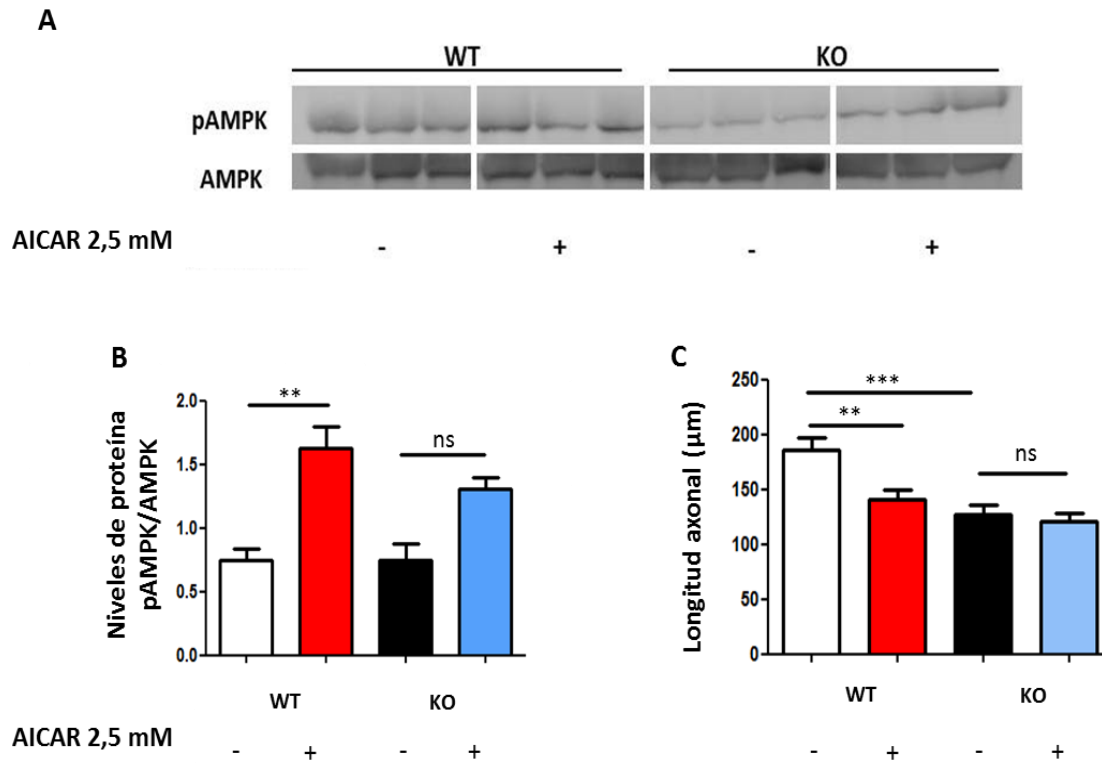


Figura 19. Las neuronas KO CPT1C no responden a un déficit energético. A) Western Blot de muestras de proteínas procedentes de neuronas WT y KO tratadas con AICAR 2,5 mM a las 72 h de ser sembradas y recogidas 24 h después. Las membranas se incubaron con anti- fosfoAMPK (pAMPK) y con AMPK total. B) Cuantificación de los niveles de pAMPK normalizados con AMPK total. C) Cuantificación de la longitud axonal. Los resultados son representados como promedio \pm SEM. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ ns: no significativo.

1.6 Implicación de CPT1C en el desarrollo y morfología de los conos de crecimiento.

CPT1 interacciona con atlastina-1 (Rinaldi et al. 2015), una proteína que se encuentra localizada en el soma, el axón y los conos de crecimiento (Zhu et al. 2006) y que es importante para el dinamismo del citoesqueleto durante el desarrollo del axón. Nos preguntamos por tanto si CPT1C puede tener algún papel en esta función de la atlastina-1 y estar controlando de algún modo el crecimiento de los conos.

En segundo lugar, se ha descrito que los ratones KO CPT1C tienen alterada la respuesta anorexigénica a la leptina en el hipotálamo (Gao et al. 2011). Aunque la función mejor conocida de la leptina es su participación en la señalización de saciedad en los núcleos hipotalámicos para regular la homeostasis energética, se ha descrito además la presencia de receptores de leptina en áreas extrahipotalámicas del cerebro, como hipocampo o neocórtex y se ha demostrado su participación en la modulación del crecimiento axonal y plasticidad sináptica, ya que es capaz de modular la expansión y morfología de los conos de crecimiento, induciendo la fosforilación de GAP-43, una proteína asociada a crecimiento neuronal (Valerio et al. 2006). Nos planteamos por tanto, si en las neuronas deficientes de CPT1C podría encontrarse alterada otras funciones relacionadas con la leptina, como es la morfología de los conos de crecimiento.

Para llevar a cabo este estudio se usaron neuronas corticales tanto de animales WT como de animales deficientes de CPT1C que fueron tratadas con leptina 100 ng/mL durante 72h. Se realizó una doble inmunofluorescencia con anti-neurofilamento (SMI312) y anti-GAP-43, un marcador de conos de crecimiento. Se midió el área de los conos y la longitud axonal.

En la **figura 20A** puede observarse imágenes al microscopio de los conos de crecimiento de neuronas WT y KO CPT1C. En la **figura 20B** se representa la cuantificación del área de estos conos donde puede observarse que tras el tratamiento con leptina tanto las neuronas WT como las KO CPT1C presentan un

incremento en el área de los conos de crecimiento. Sin embargo, no se observaron diferencias en las neuronas KO CPT1C respecto a las neuronas WT en condiciones basales, ni tampoco después del tratamiento con leptina indicando que CPT1C no parece estar implicada en la morfología de los conos de crecimiento ni tampoco en el crecimiento de los mismos en respuesta a la leptina. Estos resultados se confirman al estudiar el área de los conos por intervalos de tamaño (**figura 20D**). En esta figura puede observarse como tras el tratamiento con leptina resulta una gráfica desplazada hacia la derecha tanto en animales WT como en CPT1C KO, pero no se observa ningún desplazamiento cuando comparamos WT respecto a CPT1C KO.

Adicionalmente quisimos estudiar si la leptina podía tener algún papel en el crecimiento axonal y si CPT1C era necesario para el mismo. Como se muestra en la **figura 20C**, el crecimiento axonal se encontraba disminuido en las neuronas deficientes de CPT1C, tal y como ya habíamos demostrado previamente, pero dicho crecimiento no se vio afectado por el tratamiento con leptina en ninguno de los dos genotipos.

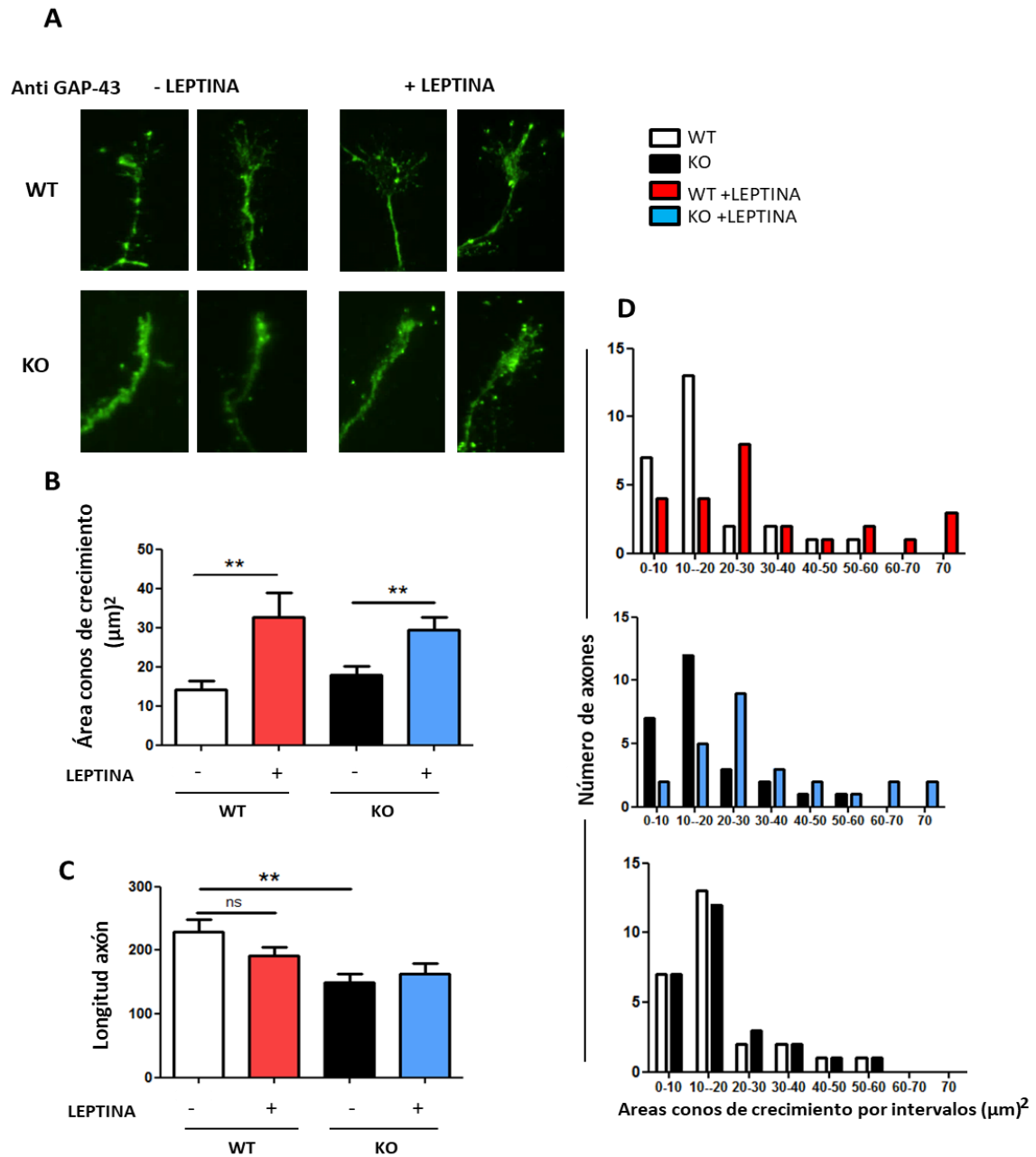


Figura 20. La deficiencia de CPT1C no tiene efecto sobre la morfología de los conos de crecimiento ni altera la respuesta a la leptina. A) imágenes representativas de conos de crecimiento marcados por inmunofluorescencia con anti-GAP-43 (marcador de conos de crecimiento) de neuronas corticales WT y KO tratadas con leptina 100 ng/mL. B) Cuantificación del área de los conos de crecimiento. C) Longitud axonal de neuronas WT y KO tratadas con leptina. D) Cuantificación por intervalos del área de los conos de crecimiento, en las diferentes condiciones. Los resultados son representados como promedio \pm SEM. ** $p < 0,01$, n.s: no significativo.

1.7 Efecto del ácido oleico sobre el desarrollo axonal en neuronas corticales KO CPT1C.

Se ha descrito que el ácido oleico es sintetizado por los astrocitos para ser usado después por las neuronas en la síntesis de fosfolípidos, principalmente en los conos de crecimiento, necesarios para la diferenciación y elongación axonal. Este proceso se lleva a cabo mediante la activación de la expresión de GAP-43 por activación de la vía PKC (proteína kinasa C) (Medina and Taberero 2002).

En el estudio llevado a cabo por Rinaldi y colaboradores se observa que las neuronas corticales de ratones KO CPT1C en cultivo presentan una disminución en el número de cuerpos lipídicos, y que la sobreexpresión de CPT1C en células COS7 produce un incremento en el almacenaje de los mismos (Rinaldi et al. 2015).

Nos planteamos si esa capacidad de producir cuerpos lipídicos en la célula, podría estar relacionada con el crecimiento axonal. Para ello se trataron neuronas corticales con dos concentraciones diferentes de oleato (150 y 300 μ M) durante 48h.

En la **figura 21** se muestra la influencia del oleato en el crecimiento axonal. Se observa como en las neuronas WT no hay cambios en la longitud axonal, mientras que en neuronas KO el oleato es capaz de revertir el déficit en el crecimiento axonal. Ello sugiere que en ausencia de CPT1C se produce un déficit de ácidos grasos necesarios para el correcto crecimiento axonal.

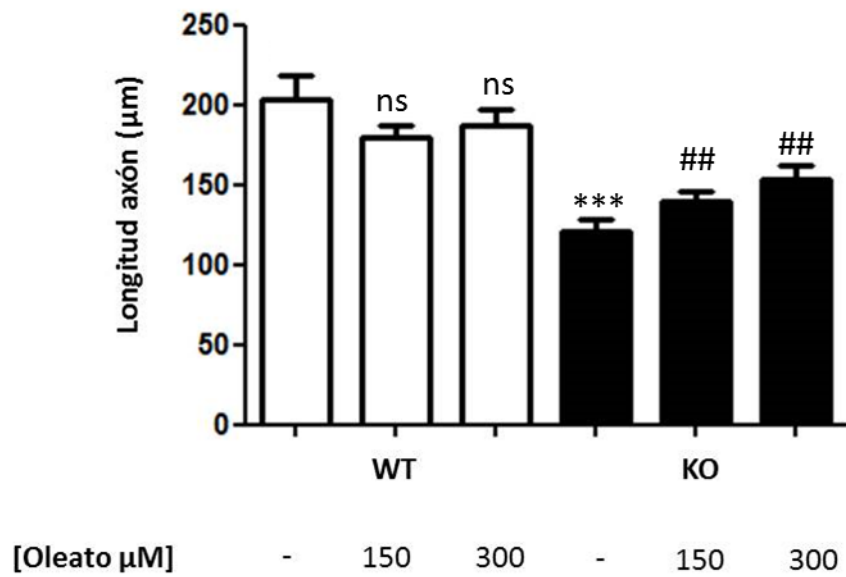


Figura 21. El tratamiento con oleato incrementa la longitud axonal en neuronas KO CPT1C. Se trataron neuronas corticales con oleato a diferentes concentraciones (150 o 300 µM) durante 48 h. Las barras negras representan las neuronas KO CPT1C y las blancas las WT. Los resultados son representados como el promedio \pm SEM. *** $p < 0,001$ respecto a WT, ## $p < 0,01$ respecto a KO CPT1C sin tratar.

2 INTERACCIÓN DE CPT1C CON PROTRUDINA

Dado que CPT1C se encuentra localizada en el RE y que se ha descrito la interacción con ATL-1, decidimos estudiar si CPT1C interaccionaba con protrudina, otra proteína del RE que interacciona con ATL-1, y cuya posible interacción con CPT1C ya ha sido sugerida en un estudio previo (Hashimoto et al. 2014).

Para el estudio de esta interacción se utilizó la técnica de FRET, mediante *photobleaching* de la molécula aceptora. Un incremento de fluorescencia de la molécula donadora es indicativo de que las dos proteínas están a una distancia menor a 10 nm.

En primer lugar se establecieron unos controles negativos de FRET. Para ello se transfectaron células HEK293T con las construcciones de interés por separado, con el objetivo de conocer la intensidad de señal del donador en condiciones aisladas, es decir, sin presencia de aceptor. Se midió el cambio de intensidad de señal antes y después del proceso de *photobleaching*. En la **figura 22** se muestra que existen unos valores basales que fueron tomados como negativos en los experimentos.

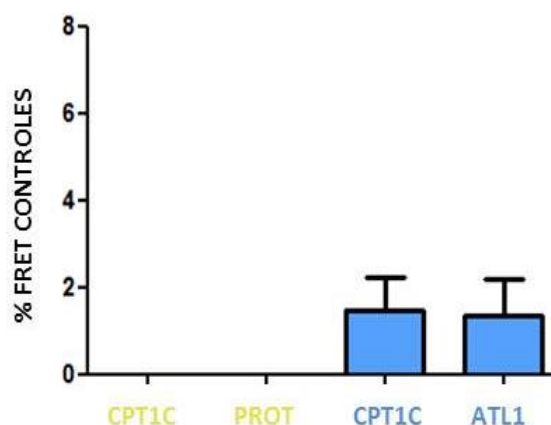


Figura 22. Controles negativos de FRET. Las células fueron transfectadas con un solo plásmido: CPT1C-YFP, protrudina-YFP, CPT1C-CFP o ATL-1-CFP. Se indica el porcentaje de FRET tras el *photobleaching*.

Como control de la técnica se utilizaron tres interacciones conocidas negativas y dos positivas. Como negativos se emplearon las interacciones CPT1C - KDEL (secuencia de 4 aminoácidos fusionada a la proteína fluorescente CFP, que la direcciona al RE), CPT1C – Calnexina (una proteína de RE cuya interacción con CPT1C ha sido previamente descartada en nuestro laboratorio mediante ensayos de inmunoprecipitación) y CPT1C - Tubulina (una proteína de microtúbulos que no se expresa en RE). Como controles positivos se emplearon las interacciones entre CPT1C - ATL-1 (Rinaldi et al. 2015), y ATL-1- protrudina (Hashimoto et al. 2014).

Tal y como se muestra en la **figura 23**, las células transfectadas con la combinación CPT1C-ALT-1 y ATL-1-protrudina (controles positivos) resultaron en un % de FRET significativamente superior al obtenido en los controles negativos (CPT1C – KDEL, CPT1C – Calnexina y CPT1C – Tubulina). El % de FRET obtenido en las células transfectadas con CPT1C y protrudina fue muy similar a los tres controles positivos utilizados para el estudio. Estos resultados indican, por primera vez, que existe una interacción entre CPT1C y protrudina.

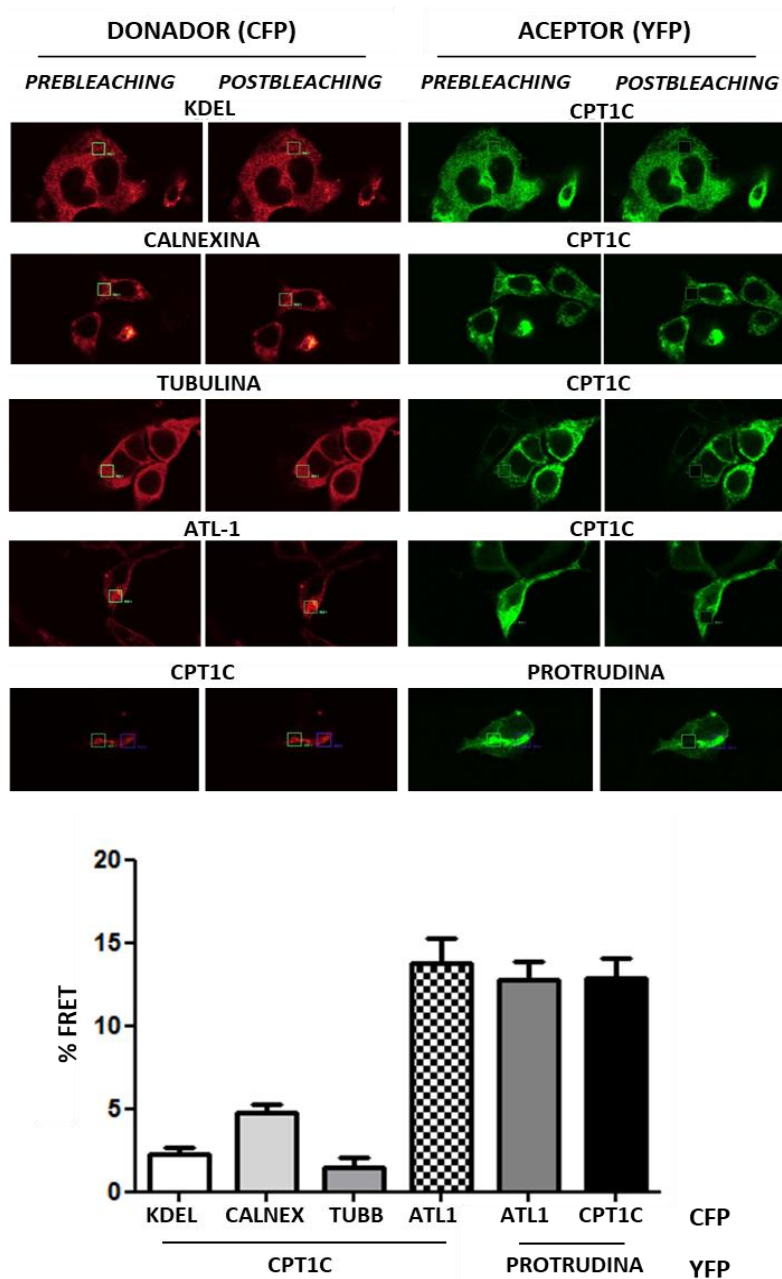


Figura 23. Interacción de CPT1C con protrudina mediante FRET. Se emplearon células HEK293T transfectadas con las diferentes proteínas fusionadas a CFP o YFP. A) Imágenes representativas del donador (CFP), que se muestran en rojo, y del aceptor (YFP) que se muestran en verde, antes y después del *photobleaching* del aceptor. B) Cuantificación del porcentaje de FRET. Los resultados son representados como promedio de 3 experimentos \pm SEM.

Papel de malonil-CoA en las interacciones entre CPT1C y otras proteínas de RE.

Ya que se ha propuesto a CPT1C como un posible sensor de malonil-CoA nos planteamos si su interacción con otras proteínas del RE podía depender de los niveles energéticos de la célula.

Para conocer si la interacción de CPT1C tanto con ATL-1 como con protrudina eran o no dependiente del estado energético de la célula, se realizó de nuevo un estudio de FRET en dos situaciones en las que los niveles de malonil CoA se encuentran disminuidos; una es en presencia de TOFA (ácido 5-(tetradeciloxi)-2furoico), un inhibidor de Acetil CoA-carboxilasa (ACC) (Li et al. 2001) y la otra es en ausencia de glucosa (Herrero et al. 2005) (**Figura 24**).

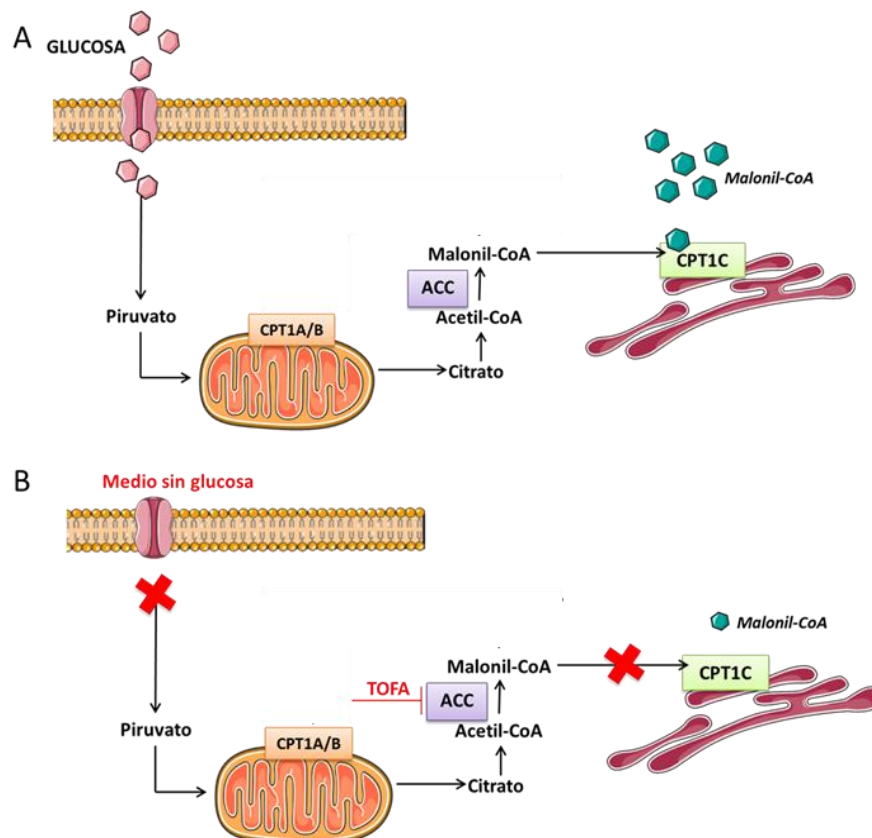


Figura 24. Condiciones experimentales para ensayos de FRET. A) Condiciones normales de cultivo. B) La privación de glucosa o el tratamiento con TOFA, disminuyen los niveles de malonil-CoA **AGCL**: ácido graso de cadena larga, **ACC**: Acetil-CoA carboxilasa, **TOFA**: (ácido 5-(tetradeciloxi)-2furoico).

Como prueba indirecta de la disminución de malonil-CoA en ausencia de glucosa, estudiamos el nivel de inactivación de ACC, la enzima encargada de la producción de malonil-CoA a partir del acetil-CoA, en nuestras condiciones experimentales. Para ello, medimos mediante western blot los niveles de fosforilación de ACC. Tal y como puede observarse en la **figura 25**, en ausencia de glucosa la forma inactiva de ACC (p-ACC) se encuentra incrementada respecto al total, lo cual es indicativo de una menor producción de malonil-CoA.

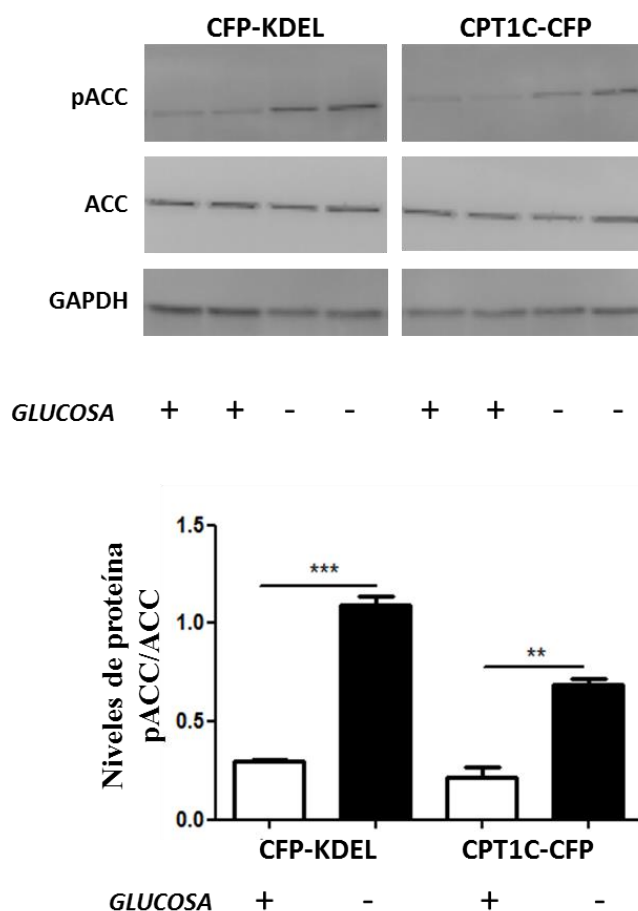


Figura 25. Incremento de la fosforilación (inactivación) de ACC por privación de glucosa. Las células fueron incubadas durante 6h con medio DMEM sin glucosa. Se emplearon células HEK293T transfectadas con CFP-KDEL y CPT1C-CFP. En la figura se muestra el incremento de fosfo-ACC (pACC) respecto a ACC total (ACC). Los resultados son representados como promedio \pm SEM. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$

En la **figura 26** pueden observarse los resultados del estudio de FRET respecto a la interacción de CPT1C con protrudina o ATL-1, en condiciones normales, en presencia de TOFA y en ausencia de glucosa. No encontramos variaciones significativas en ninguna de las dos interacciones en las diferentes condiciones. Esto indica que la interacción de CPT1C con protrudina o ATL-1, es independiente de la unión a malonil-CoA.

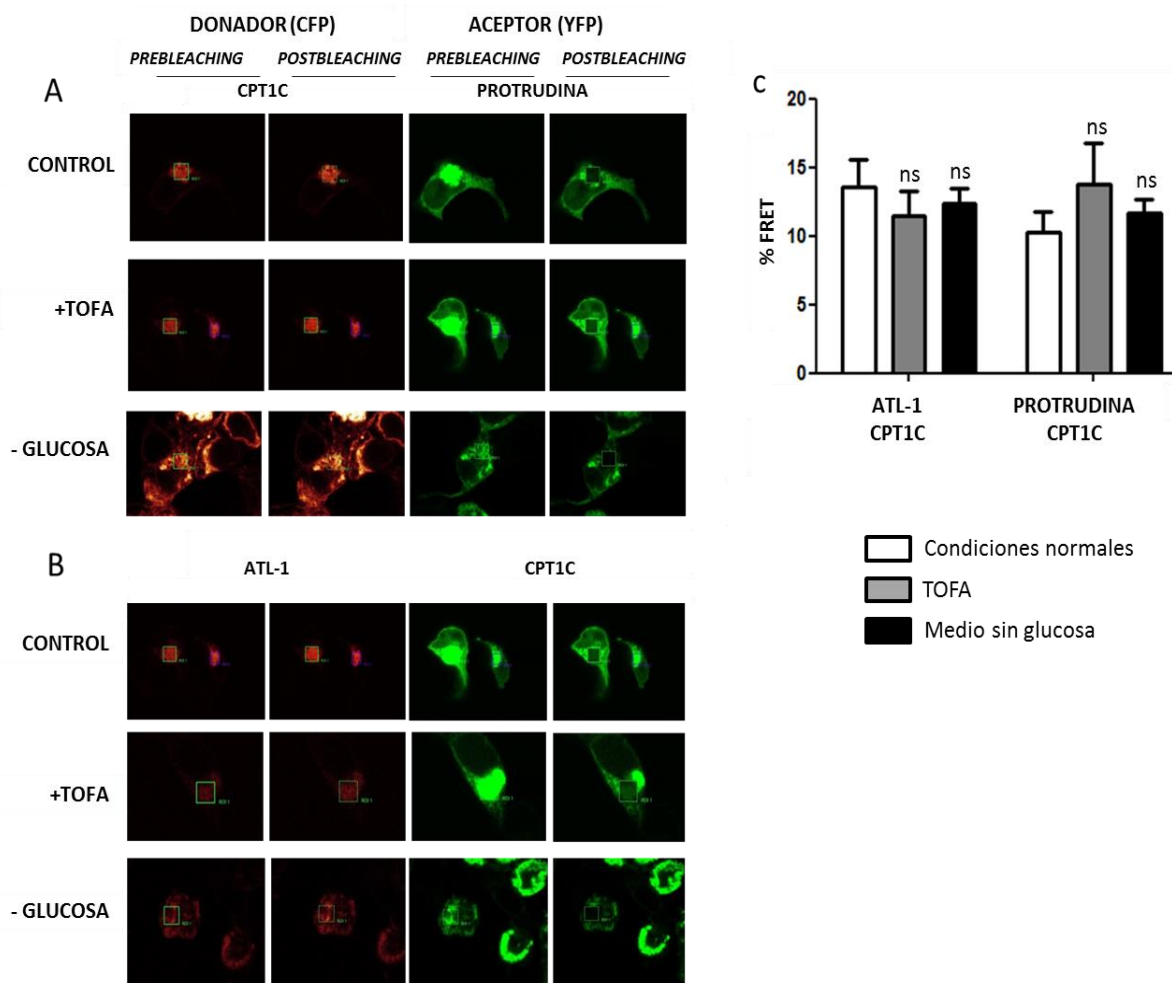


Figura 26. La unión de malonil-CoA a CPT1C no modifica las interacciones de CPT1C con protrudina y ATL-1. Las células fueron tratadas 1 h con TOFA 20 μ g/mL o incubadas en medio sin glucosa durante 6 h. A- B) Imágenes representativas de células transfectadas con CPT1C-CFP e protrudina-YFP o ATL-1-CFP e CPT1C-YFP antes y después del *photobleaching*. El cuadrado mostrado en las imágenes es el lugar donde se ha realizado el *photobleaching*. C) Se muestra la cuantificación del porcentaje de FRET. Los resultados son representados como promedio \pm SEM. ns: no significativo

3 PAPEL DE CPT1C EN LA REGULACIÓN DE ENDOSOMAS TARDÍOS (LE).

En el estudio publicado por Stenmark y colaboradores se muestra que la protrudina se localiza en los contactos RE-LE, y juega un papel clave en el movimiento anterógrado de los LE. Sin embargo, los reguladores de la función de la protrudina son desconocidos (Raiborg et al. 2015).

Tras confirmar la interacción de CPT1C con protrudina, nos cuestionamos si CPT1C podría estar implicada en las funciones de la protrudina, y si la unión de malonil-CoA es importante para ello.

3.1 Localización de CPT1C en los contactos RE-LE.

Se utilizaron células HeLa, que no expresan CPT1C, pero sí protrudina, y se transfectaron con las construcciones CFP-KDEL, CPT1C-CFP o CPT1C^{M589S}-CFP y protrudina-YFP.

En primer lugar se midió el grado de colocalización entre CPT1C y protrudina y se estudió si esta colocalización variaba en el caso de CPT1C^{M589S}, es decir, si era dependiente de la unión a malonil-CoA. Como control se empleó la secuencia KDEL fusionada a CFP, ya que tanto protrudina como CPT1C son proteínas que se encuentran localizadas en el RE y por tanto esta colocalización tenía que ser positiva. En la **figura 27C** se muestra cómo la colocalización entre protrudina y CPT1C-CFP o CPT1C^{M589S}-CFP es positiva, sin variaciones significativas entre ellas, indicando por tanto que la colocalización de protrudina y CPT1C es independiente de su capacidad de unión a malonil-CoA.

En segundo lugar, con el fin de conocer si CPT1C formaba parte de los contactos RE-LE, se estudió la colocalización de CPT1C con anti-LAMP1, un marcador de LE que se encuentra localizado en su membrana. En este caso KDEL actuaba como control negativo de colocalización. Los datos obtenidos muestran que CPT1C está próximo a los LE (**Figura 27A y B**) pero no existe colocalización

positiva en ninguna de las condiciones (**Figura 27D**), por lo que podemos afirmar que CPT1C no forma parte directamente de los contactos RE-LE.

En último lugar nos planteamos si CPT1C, mediante su interacción con protrudina, podía regular los contactos protrudina-LE. Para ello se estudió cómo la colocalización de protrudina y LAMP-1 se puede ver afectada por la sobreexpresión de la forma salvaje de CPT1C o CPT1C^{M589S}. Los resultados mostrados en la **figura 27E** indican que la sobreexpresión de CPT1C, tanto en su forma salvaje como en su forma mutada, no interfieren en la colocalización de protrudina con LAMP1 en los contacto RE-LE.

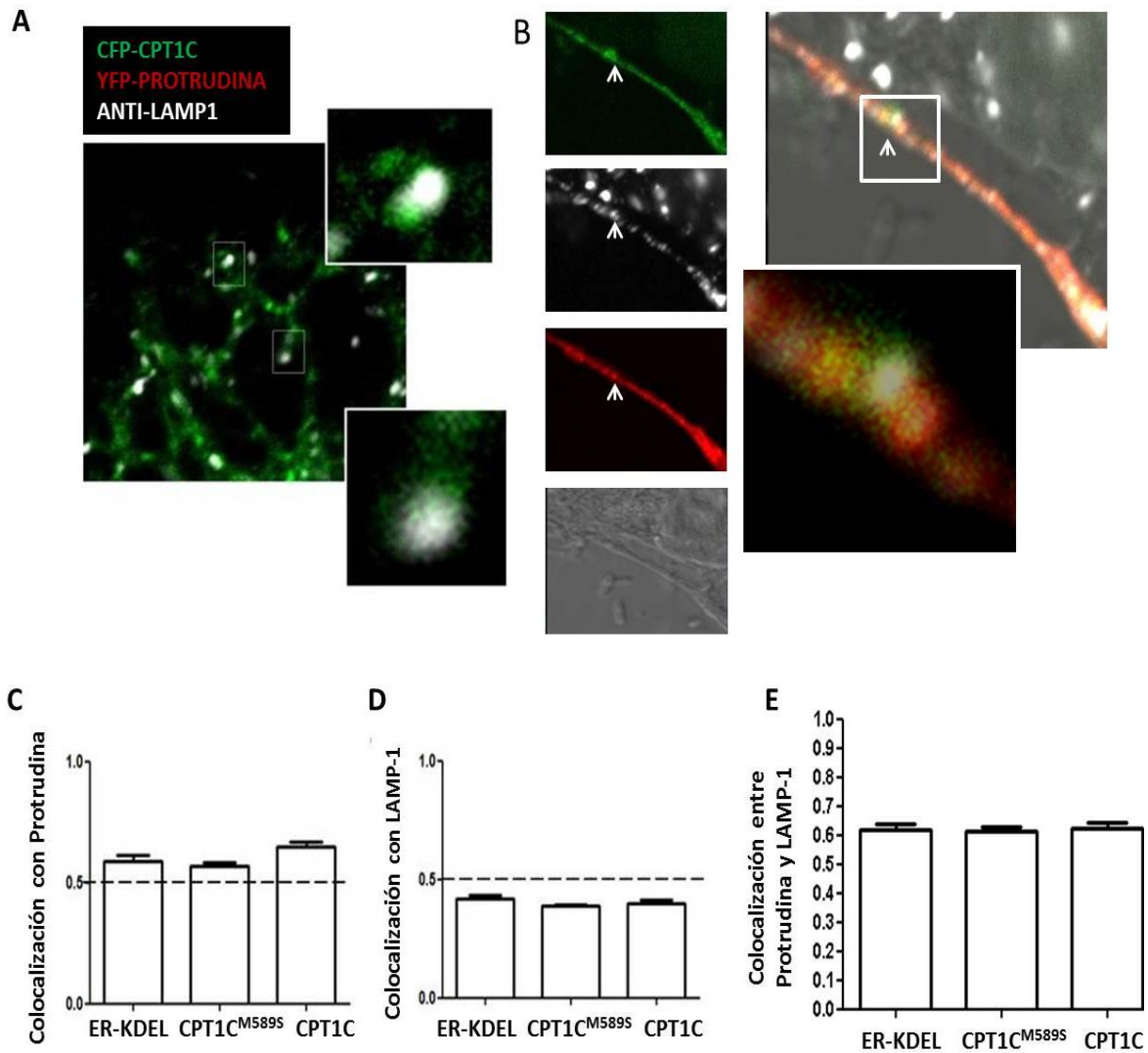


Figura 27. CPT1C no colocaliza con el marcador de endosomas tardíos LAMP1. Se emplearon células HeLa transfectadas con CPT1C-CFP, CFP-KDEL o CPT1C^{M589S}-CFP (Verde) y con Protrudina-YFP (Rojo). Los LE se marcaron por inmunofluorescencia con anti-LAMP1 (Blanco). A) Imagen representativa de la localización de CPT1C y LAMP1. B) Imagen representativa de la colocalización de CPT1C con protrudina pero no con LAMP1. C) Cuantificación de la colocalización entre Protrudina y KDEL, CPT1C o CPT1C^{M589S}. D) Cuantificación de la colocalización entre LAMP1 y KDEL, CPT1C o CPT1C^{M589S}. E) Cuantificación de la colocalización entre Protrudina y LAMP1, en células donde se sobreexpresa CPT1C o CPT1C^{M589S} (o KDEL como control). Los valores de colocalización se obtuvieron por correlación de Pearson. La línea de puntos indica el valor a partir del cual la colocalización es positiva. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal LSM 780 (Universidad de Oslo, Noruega).

3.2 Implicación de CPT1C en la localización de los LEs.

En segundo lugar, estudiamos si CPT1C puede estar implicado en el papel que juega la protrudina en la localización de los LEs. Dicha localización se ha relacionado con la formación de protrusiones en células HeLa y con el crecimiento axonal en PC12. Para estudiar si CPT1C tiene algún papel en esta función, se sobreexpresó la protrudina o bien CPT1C en células HeLa (un tipo celular que no expresa CPT1C). Para saber si además la capacidad de unión de CPT1C a malonil-CoA puede jugar un papel importante también se usaron células en las que se sobreexpresó CPT1C^{M589S}. Las células fueron tratadas con TOFA. Se usó anti-LAMP1 como marcador de LEs.

Como observamos en la **figura 28B**, los LEs presentan una distribución periférica sólo al sobreexpresar CPT1C o protrudina, respecto a la distribución perinuclear que presentan en condiciones basales (en presencia del vector vacío; CFP) o cuando se sobreexpresa CPT1C^{M589S}. Al tratar con TOFA y por tanto disminuir hipotéticamente los niveles de malonil-CoA en las mismas condiciones, sólo observamos un cambio en aquellas células que sobreexpresan CPT1C, en las cuales los LEs pasan de una distribución periférica a presentar una localización perinuclear. En el caso de la sobreexpresión de protrudina, no se observan cambios cuando tratamos con TOFA.

Dado que la distribución de los LEs era más periférica cuando sobreexpresábamos CPT1C o protrudina, nos planteamos si este hecho tendría un efecto en la morfología celular. El parámetro de circularidad se mide en intervalo de 0 a 1, siendo más próximo a 1 cuanto más circular es la célula. Como se observa en la **figura 28C-D**, las células que tienen sobreexpresada CPT1C, tanto su forma salvaje como su forma mutada, no presentan cambios significativos en la circularidad ni en el área. Sin embargo cuando tratamos estas células con TOFA existe un incremento significativo en la circularidad celular en aquellas que sobreexpresan la forma salvaje de CPT1C.

Estos resultados muestran que la sobreexpresión de CPT1C promueve una localización más periférica de los LEs, y que la unión de CPT1C a malonil-CoA parece ser esencial para ello.

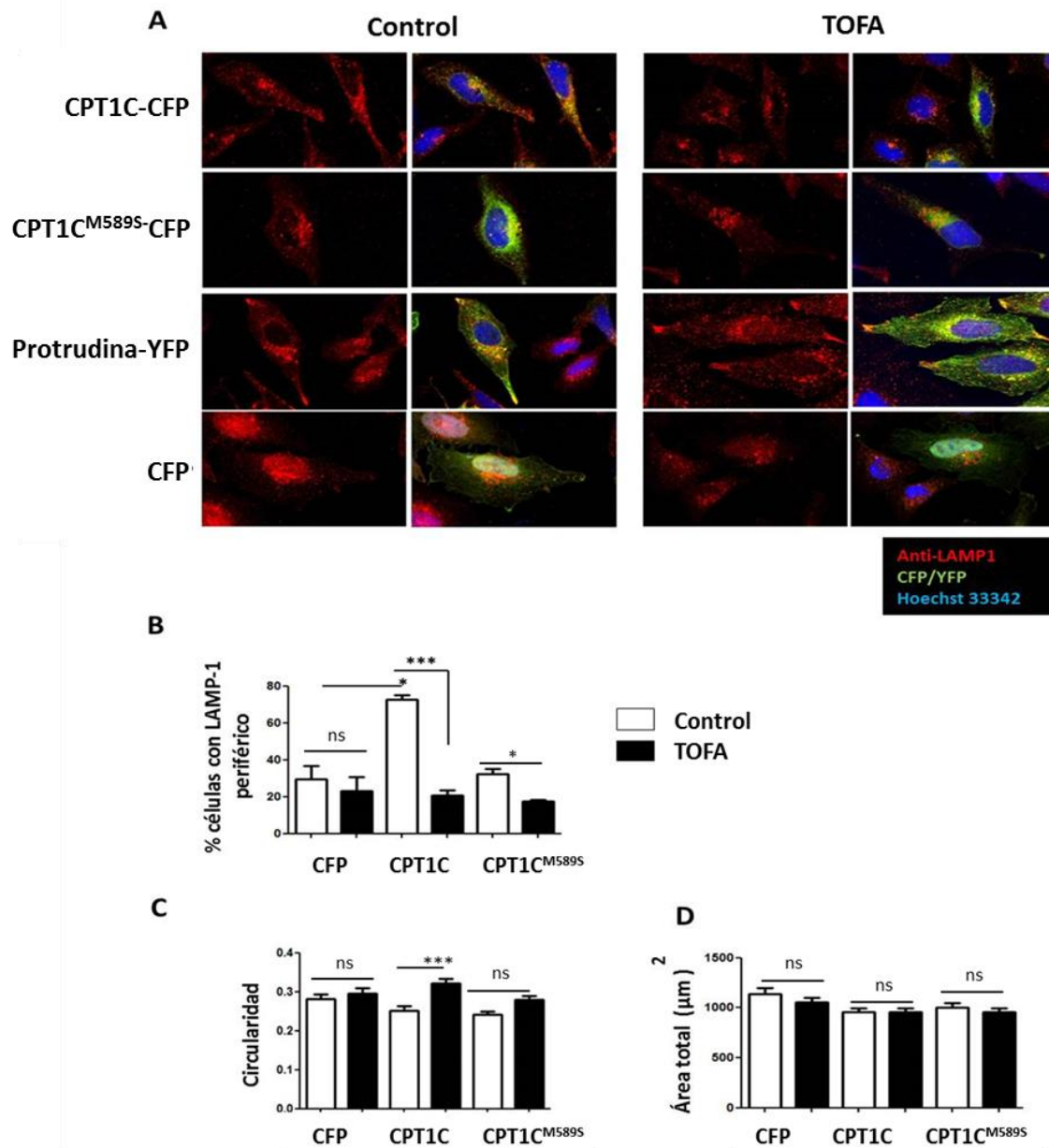


Figura 28. CPT1C favorece la distribución periférica de LEs dependiendo de los niveles de malonil-CoA. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de células HeLa marcadas con anti-LAMP1 (rojo). En verde se muestra el marcaje de CFP (CPT1C, CPT1C^{M589S} o vector vacío) o YFP (protrudina) B) Cuantificación de número de células con presencia de anti-LAMP1 en la periferia. C) Cuantificación de la circularidad celular. D) cuantificación del área total de las células. Se analizaron 150 células por condición, con el programa NisElement (NIKON). Los resultados se muestran como promedio \pm SEM. ***p<0,001, *p<0,05 ns: no significativo. NIKON Eclipse Ti con una cámara Andor CCD clara. El objetivo empleado fue 60X

3.3 Papel de CPT1C en el transporte de LE.

Por último, estudiamos si CPT1C podría estar implicado en el papel que juega la protrudina en el transporte de los LEs.

Para ello, se estudió en tiempo real el transporte de estos LEs, en células HeLa que están sobreexpresando CPT1C o su forma mutada (CPT1C-CFP, CPT1C^{M589S}-CFP o CFP-KDEL como control). El estudio se llevó a cabo en presencia o ausencia de TOFA.

Para marcar y poder seguir el movimiento de los LEs se utilizó el marcador de LE mcherry-FYCO1 (cedido por el laboratorio del Dr. Harald Stenmark, de la Universidad de Oslo). Como se muestra en la **figura 29**, FYCO1 se encuentra localizado en la membrana de los LE. Esta localización es independiente del tipo de transporte, es decir, FYCO1 participa de forma activa en el transporte anterógrado (desde el soma hacia la periferia celular) mediante su interacción con kinesina, pero sigue formando parte de la membrana del LE durante el transporte retrógrado (desde la periferia hacia el soma). Por estos motivos, FYCO1 es un buen marcador para el estudio del movimiento de los LEs.

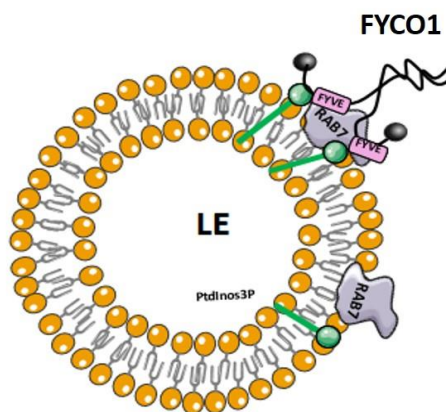


Figura 29. Localización de FYCO-1. Se muestra la localización de FYCO-1 en la membrana de los endosomas tardíos. Independientemente del tipo de transporte (retrógrado o anterógrado) FYCO-1 permanece anclado a la membrana del endosoma tardío.

Estos experimentos se llevaron a cabo en células vivas. Se captaron imágenes de células FYCO1 positivas, cada 2 s en un tiempo máximo de 2 min. El desarrollo de estos experimentos se llevó a cabo en el Centro de Investigación del Cáncer de

la Universidad de Oslo, con el grupo del Dr. Harald Stenmark. Para ello se empleó el microscopio de alta resolución Delta Vision OMX, GE Healthcare.

En la **figura 30A** se representa el trayecto de las vesículas. El análisis del movimiento vesicular se realizó diferenciando los LE con movimiento retrógrado y anterógrado. Se cuantificó la velocidad de estas vesículas FYCO1 positivas como se muestra en la **figura 30B**. Podemos observar que tanto en el transporte retrógrado como anterógrado, la sobreexpresión de CPT1C no afecta a la velocidad, indicando que la sobreexpresión de CPT1C no tiene ningún efecto sobre la velocidad del transporte. Sin embargo, cuando tratamos con TOFA o sobreexpresamos CPT1C^{M589S}, la velocidad del transporte anterógrado decrece significativamente, mientras que la velocidad del transporte retrógrado no se ve afectada. Estos datos sugieren que CPT1C disminuye la velocidad del transporte anterógrado cuando no hay unión a malonil-CoA.

El siguiente parámetro analizado fue la distancia total recorrida por estas vesículas (**Figura 30C**). Al igual que en el caso anterior, la sobreexpresión de CPT1C, salvaje o mutada, no afecta a la distancia recorrida en el caso del transporte retrógrado. Sin embargo cuando analizamos el transporte anterógrado se encontró que las vesículas de las células que sobreexpresan CPT1C presentan un incremento de la distancia recorrida respecto al control. Este efecto fue bloqueado cuando las células se trataron con TOFA, en las cuales se registró una disminución significativa de la distancia recorrida por los LE. En el caso de CPT1C^{M589S} el tratamiento con TOFA no tuvo ningún efecto, y los valores de la distancia recorrida fueron próximos a los de CPT1C tratados con TOFA.

Por último se analizó la direccionalidad de las vesículas. En la **figura 30D** se observa que las células que tienen CPT1C sobreexpresada no incrementan la direccionalidad de las vesículas de forma significativa, sin embargo cuando son tratadas con TOFA presentan unos valores de direccionalidad más bajo respecto a las células sin tratar. Al sobreexpresa CPT1C^{M589S} el efecto es similar a las células CPT1C tratadas con TOFA. Valores de direccionalidad más próximos a 0 indican un movimiento vesicular más desordenado (ver esquema **Figura 30E**).

En conjunto, el estudio de todos estos parámetros sobre el movimiento de los LE nos indican que en condiciones basales, energéticamente favorables (niveles normales de malonil-CoA), la sobreexpresión de CPT1C promueve un movimiento vesicular más ordenado en el transporte anterógrado, dando lugar a un incremento de la localización de los LEs en la periferia. Sin embargo, en condiciones de estrés metabólico (simulados en nuestras condiciones mediante el uso de TOFA, que provoca una disminución de malonil-CoA), CPT1C disminuye la velocidad de los LEs y hay una pérdida de la direccionalidad.

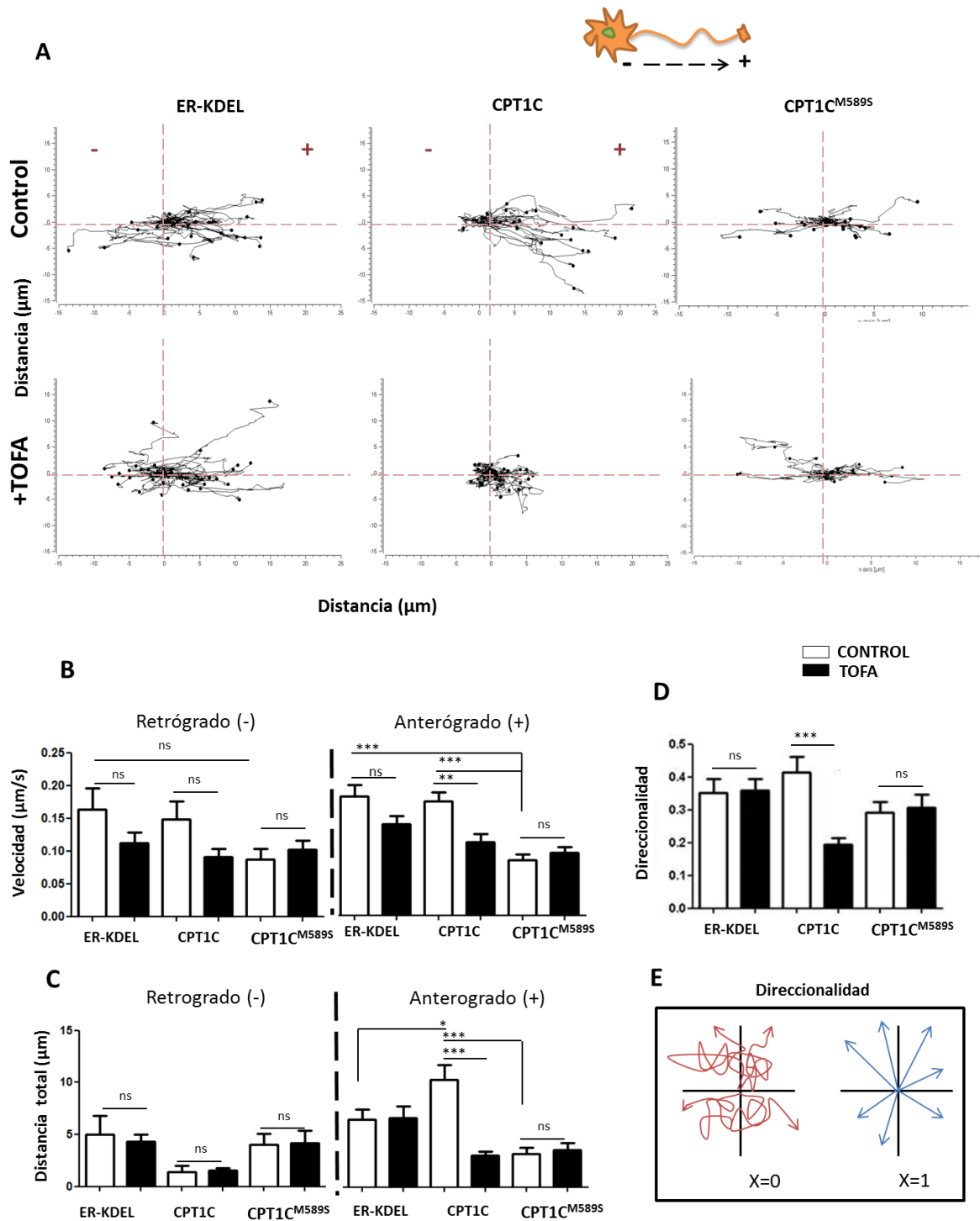


Figura 30. CPT1C participa en el transporte anterógrado de endosomas tardíos. A) Representación gráfica del movimiento vesicular. El cruce de las líneas a puntos indica el punto de origen de los LE. El signo + representa la dirección del transporte anterógrado y el signo - del retrógrado. B) Cuantificación de la velocidad de las vesículas separadas entre movimiento retrógrado y anterógrado. C) Distancia total recorrida por las vesículas separadas por tipo de transporte. D) Direccionalidad de las vesículas. E) Representación gráfica de la medida de direccionalidad. Cuanto más próximo a 1 más directo y ordenado es el movimiento. Las imágenes fueron procesadas con ImageJ y analizadas con el programa de Chemotaxis (IBIDI). Los resultados son representados como promedio ± SEM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.



DISCUSIÓN

La función molecular de CPT1C aún es desconocida, ya que la falta de una actividad biológica ha obstaculizado los intentos de esclarecer el papel celular y fisiológico.

Los resultados obtenidos en este estudio junto con los datos que hay publicados indican que CPT1C tiene una función completamente diferente a la de las otras dos isoformas conocidas (CPT1A y CPT1B). Esta hipótesis se basa principalmente en que no se encuentra localizada en la mitocondria y que no presenta actividad catalítica.

Las observaciones de que CPT1C se une a malonil-CoA sugieren que podría actuar como sensor del metabolismo lipídico en neuronas. Los estudios realizados en ratones con ausencia total de CPT1C muestran una amplia gama de trastornos cerebrales que incluyen cognición y aprendizaje espacial deteriorados, desregulación en la ingesta de alimentos y homeostasis energética, y deficiencias motoras. Además, recientemente se ha descrito una mutación humana en CPT1C asociada a PEH, cuya causa principal es la axonopatía del tracto corticoespinal.

En esta tesis doctoral se intenta ampliar los conocimientos sobre la función de CPT1C. Por primera vez se relaciona esta proteína con el desarrollo axonal y dendrítico, y se demuestra su papel regulador en el transporte de LEs mediante su interacción con protrudina.

Además, en numerosas ocasiones, se ha sugerido que CPT1C debido a su capacidad de unión a malonil-CoA, podría actuar como sensor de los niveles energéticos de la célula. En este trabajo hemos usado una forma de CPT1C portadora de la mutación M589S. Esta mutación se localiza en el dominio de unión a malonil-CoA, dominio en el que CPT1C presenta una alta homología con CPT1A, isoforma en la que se ha demostrado que la mutación inhibe por completo la unión del malonil-CoA. Gracias al uso de esta forma mutada de CPT1C hemos podido demostrar en este trabajo la importancia de la unión de malonil-CoA para la función de CPT1C en el desarrollo y transporte axonal.

1. CPT1C interacciona con protrudina

Uno de los logros más relevantes en esta tesis doctoral ha sido la demostración directa de la interacción entre CPT1C y protrudina.

En 2014 se publicó un estudio en torno a la protrudina en el que aparecía CPT1C como un posible interactor. La protrudina es una proteína situada en la membrana del RE que había sido relacionada anteriormente con PEH (Hashimoto et al. 2014; Scho et al. 2002). La función mejor descrita de esta proteína, hasta el momento, es su papel regulador en el transporte de LEs hacia la periferia celular que es importante para el crecimiento axonal o de protrusiones en células no polarizadas (Raiborg et al. 2015). Aunque se ha descrito su función, no se conoce cuál es su mecanismo regulador. Algunos autores han sugerido que requiere un sensor lipídico para frenar o favorecer el transporte de LEs hacia la periferia celular (Krauß and Haucke 2015).

En este trabajo hipotetizamos que la función de la protrudina podría estar regulada por CPT1C en función de si se encuentra unida o no a malonil-CoA. Los niveles de malonil-CoA, como se ha descrito anteriormente, fluctúan dependiendo del estado energético de la célula. Cuando las condiciones metabólicas son favorables la enzima ACC permite la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA. Por el contrario, cuando las condiciones metabólicas son desfavorables se produce la fosforilación de AMPK, que inhibe a ACC, produciendo una disminución de los niveles de malonil-CoA (Herrero et al. 2005; Brusselmans et al. 2005; Li et al. 2001). La interacción malonil-CoA/CPT1C podría representar para la célula un mecanismo que le permite estar informada sobre la disponibilidad de ácidos grasos y de glucosa.

Tras los resultados obtenidos cuando se disminuyen los niveles de malonil-CoA mediante la inhibición de la enzima ACC, no se observan cambios en la interacción entre CPT1C y protrudina. Sin embargo, sería posible que la disminución de los niveles de malonil-CoA, aunque no impida la interacción entre ambas proteínas, sí que pueda producir algún tipo de cambio estérico que regule la

función de la protrudina, por ejemplo, promoviendo o inhibiendo su interacción con otras proteínas.

Samanta y colaboradores, en 2014, describieron que el dominio N-terminal de la CPT1C puede adquirir dos conformaciones: una plegada ($N\alpha$) y otra estirada ($N\beta$). Cuando CPT1C está en la conformación $N\beta$ se desestabilizan las hojas $\beta 1$ y $\beta 2$ de la proteína. Por comparación a lo que está descrito para CPT1A podemos hipotetizar que cuando malonil-CoA se une a CPT1C se encuentra en la conformación plegada (Rao et al. 2011). En nuestro modelo, representado en la **figura 31**, proponemos que cuando CPT1C no está unido a malonil-CoA, el extremo N-terminal podría estar extendido impidiendo la interacción de protrudina con Rab7, necesaria para el transporte anterógrado de LEs.

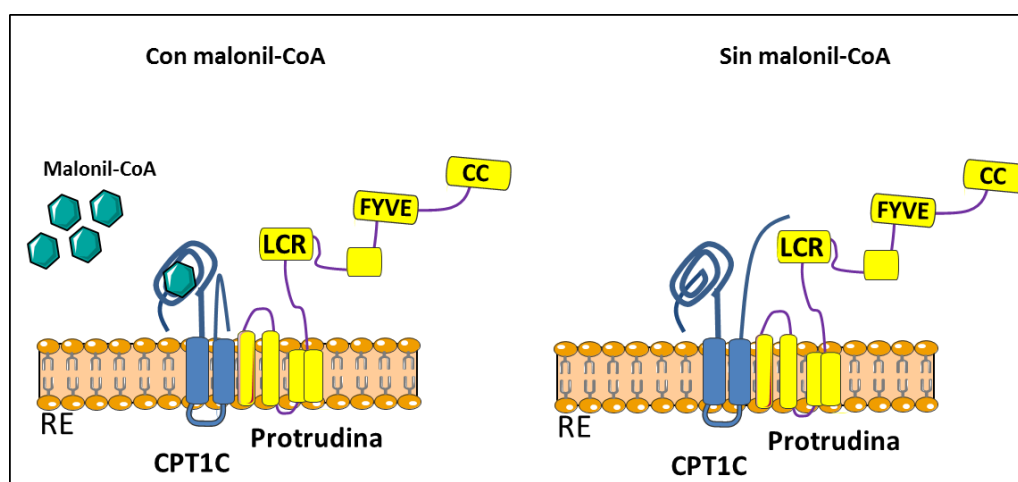


Figura 31. Hipótesis del cambio estructural en CPT1C provocado por la unión de malonil CoA.

2. CPT1C participa en la localización y movimiento de los LEs

Otro resultado importante y novedoso obtenido en este trabajo es que CPT1C favorece la localización periférica de los LEs. En los datos obtenidos se muestra que CPT1C no colocaliza directamente con los LEs, por lo tanto, podría estar regulando la localización de los LEs a través de su interacción con la protrudina. Estos datos van en la línea de los resultados obtenidos por Stenmark y colaboradores en 2015, en los que se muestra que la sobreexpresión de protrudina favorece la localización periférica de los LEs.

En una publicación muy reciente del mismo grupo se describe la importancia de la localización de los LEs en la célula según las condiciones metabólicas (Hong et al. 2017). En este trabajo observan una localización periférica de LEs cuando sobreexpresan protrudina. Sin embargo esta localización pasa a ser perinuclear cuando inducen la autofagia mediante la privación de aminoácidos. Este cambio de localización ocurre cuando mTORC1 se libera del LE, evitando la formación del complejo entre kinesina-1 y FYCO-1, inhibiendo el transporte anterógrado y favoreciendo la localización perinuclear.

En nuestro modelo, cuando sobreexpresamos la CPT1C y disminuimos los niveles de malonil-CoA simulando un estrés energético, la localización periférica de los LEs pasa a ser perinuclear. Estos datos son apoyados por los resultados obtenidos tras analizar el movimiento de los LEs en tiempo real.

El conjunto de estos resultados nos muestra que CPT1C favorece la localización periférica de LEs porque favorece el transporte anterógrado de las vesículas FYCO1 positivas. Además, este efecto es dependiente de la unión a malonil-CoA, ya que cuando se muta el sitio de unión o se bajan sus niveles, el movimiento anterógrado se frena.

Se ha sugerido que el RE podría actuar como un mecanismo de chequeo de las condiciones celulares en el transporte de LEs (Raiborg, Eva M. Wenzel, et al. 2015; Krauß & Haucke 2015). Si las condiciones energéticas son adecuadas los LEs continuarían hacia la periferia para la formación de nuevas membranas o para

la formación de exosomas (Huotari and Helenius 2011). Sin embargo, si las condiciones no son favorables, el transporte anterógrado de LEs se frenaría para favorecer otros procesos como la autofagia, o para ahorrar energía, ya que este tipo de transporte requiere consumo de ATP. Los LEs presentan un movimiento bidireccional (retrógrado y anterógrado) por lo que una localización más perinuclear puede indicar una disminución del transporte anterógrado o un incremento del retrógrado (Cheng et al. 2015; Wijdeven et al. 2015).

Nuestros resultados muestran que la CPT1C no presenta efecto sobre el transporte retrógrado, por lo tanto la localización perinuclear observada cuando bajamos los niveles de malonil-CoA es debido al frenado del transporte anterógrado.

Estos resultados pueden tener una gran relevancia fisiológica. El transporte de LEs hacia la periferia ha sido relacionado con el crecimiento axonal porque favorece el transporte de componentes importantes para la formación de nuevas membranas. Ante una situación de estrés metabólico este transporte se frena, se paraliza para favorecer otros procesos quizás más importantes para la supervivencia celular y la obtención de energía. El transporte retrógrado de LE favorece la fusión con el lisosoma para la obtención de energía.

Es la primera vez que se describe la regulación del transporte de LE por malonil-CoA en células donde se sobreexpresa la CPT1C. Hasta la fecha sólo hay descrito un mecanismo regulador del movimiento de los LE mediado por los niveles de colesterol a través del sensor ORP1L, presente en los LEs. ORP1L puede presentar dos conformaciones, abierta o cerrada. Cuando los niveles de colesterol son adecuados, se encuentra unido a colesterol y en conformación cerrada. En esta conformación permite la unión del complejo RILP-Rab7, localizado en los LEs, a la proteína motora y facilita el transporte retrógrado de los LEs. Si por el contrario los niveles de colesterol en la célula son bajos, es necesario que se establezcan contactos RE-LEs para la transferencia de colesterol entre los dos orgánulos. Cuando no hay colesterol presente en la membrana de los LEs, ORP1L no se puede unir al colesterol y queda en una conformación abierta,

permitiendo su interacción con VAP-A, presente en la membrana del RE. Este contacto RE-LE ancla el LE al retículo permitiendo la transferencia de colesterol, y evitando el transporte retrógrado de los LEs (Rocha et al. 2009; Raiborg, Wenzel, and Stenmark 2015).

En este trabajo se propone un segundo mecanismo regulador similar al regulado por colesterol en el que el sensor es CPT1C y el sustrato malonil-CoA. En los resultados obtenidos en este trabajo, se observa que CPT1C no establece contactos directos con los LEs. Hipotetizamos que CPT1C a través de la protrudina podría estar regulando el transporte de LEs como sensor de malonil-CoA.

La protrudina se une a los LE mediante Rab7 y PI3P, y media la interacción entre kinesina-5 y FYCO1, favoreciendo el paso de este complejo a los microtúbulos y permitiendo así el transporte anterógrado de los LE (Raiborg et al. 2015). Una posibilidad sería que CPT1C cuando está unida a malonil-CoA permitiría que la protrudina interaccionara con Rab7 y PI3P. Por el contrario cuando la CPT1C no se encuentra unida a malonil-CoA, es decir, en condiciones energéticas desfavorables, podría cambiar su conformación y por impedimento estérico no permitir la interacción de protrudina con Rab7 o con PI3P, o favorecer la unión con otros moduladores que resulten en la paralización del transporte anterógrado.

Otra hipótesis de cómo CPT1C podría participar en la regulación del transporte anterógrado sería mediante la interacción con Sac1, descrita recientemente (Brechet et al. 2017) y por un efecto indirecto sobre la protrudina. Sac1 es una fosfatasa, principalmente de PI4P y en menor medida de PI3P. En estudios no publicados, realizados en nuestro grupo de investigación, se demuestra que CPT1C es un regulador negativo de Sac1 cuando las condiciones energéticas son favorables. Cuando CPT1C une malonil-CoA, por un lado inhibiría a Sac1 y se incrementarían los niveles de PI3P, y por otro permitiría la unión de protrudina a Rab7 favoreciendo la unión de kinesina-5 a FYCO-1 e incrementando el transporte anterógrado. Por el contrario, en condiciones energéticamente desfavorables donde los niveles de malonil-CoA disminuyen y no se une a CPT1C, se activaría Sac1, se

disminuirían los niveles de PI3P y se evitaría la unión de protrudina a PI3P y Rab7, parando así el transporte anterógrado.

3. CPT1C es necesaria para el correcto crecimiento axonal y dendrítico

Otro punto novedoso que aporta esta tesis doctoral es la implicación de CPT1C en el desarrollo axonal y dendrítico.

Los resultados obtenidos muestran que CPT1C es necesaria para el correcto crecimiento axonal y dendrítico, ya que las neuronas KO CPT1C presentan disminuidos ambos parámetros. Además, hemos comprobado cómo se produce una recuperación parcial de este crecimiento axonal cuando la CPT1C se sobreexpresa en las neuronas KO. El hecho de que esta recuperación sea parcial podría ser sencillamente una cuestión de tiempo, dado que las neuronas KO han permanecido 2 días en cultivo previamente a la sobreexpresión de CPT1C. Para saber si se trata de un mero retraso o bien de algún tipo de alteración irreversible producida por la falta de CPT1C durante los primeros días de cultivo, sería necesario repetir los estudios esperando tiempos mayores tras la sobreexpresión y observando la evolución del crecimiento.

Esto sugiere que el transporte deficiente de LEs hacia los conos de crecimiento, da lugar a un aporte reducido de membranas para el crecimiento axonal. Los resultados obtenidos al tratar las neuronas KO CPT1C con oleato, que muestran una recuperación parcial de la longitud axonal, apoyan la hipótesis de que la disminución en el crecimiento axonal podría deberse a una alteración en la disponibilidad de lípidos destinados al crecimiento de membrana.

Además, otro dato interesante que obtenemos de estos experimentos es la importancia de la unión del malonil-CoA a CPT1C para su función. Este hecho se observa cuando sobreexpresamos CPT1C^{M589S} en neuronas KO CPT1C y no se produce la recuperación en el crecimiento axonal que en cambio sí observamos cuando reexpresamos CPT1C. Por otro lado esperaríamos que al igual que ocurre con la protrudina, la sobreexpresión de CPT1C en neuronas corticales WT incrementara la longitud axonal, pero en nuestros resultados no observamos

cambios. Estos datos nos llevan a pensar que tiene que haber una proporción entre la cantidad de CPT1C y malonil-CoA. En los experimentos de sobreexpresión de CPT1C, no todas las moléculas de proteína se encontrarían unidas a malonil-CoA y por tanto no podrían realizar su función.

Por otro lado, la sobreexpresión de la CPT1C^{M589S}, provoca una disminución en el crecimiento axonal de neuronas WT. Esto podría indicar que la mutación M589S podría dotar a CPT1C de algún tipo de función que inhibiera de forma activa el crecimiento axonal, o bien que esto sucediera debido a un efecto de competición con la isoforma endógena. Por el momento desconocemos si la mutación en el lugar de unión a malonil-CoA podría estar produciendo un cambio estructural o conformacional en la proteína, que conllevara una deficiencia en su función o en su interacción con protrudina.

Una de las principales vías implicadas en el crecimiento axonal es la dependiente de AMPK. Previamente, Amato y colaboradores, describieron que la activación de AMPK produce un acortamiento y una pérdida de la polaridad neuronal en estadios tempranos del desarrollo, mediante la fosforilación de la kinesina-5 en el lugar de unión de PI3K, evitando el transporte de PI3K a los conos de crecimiento, donde es necesaria para la diferenciación y el crecimiento axonal (Stephen Amato et al. 2011). En nuestro trabajo demostramos que el déficit del crecimiento axonal en las neuronas KO no es debido a alteraciones en la vía AMPK-Kinesina-5-PI3K ya que el nivel de fosforilación de AMPK en las neuronas KO no se encuentra alterado. Estos resultados refuerzan el papel del malonil-CoA en el crecimiento axonal, ya que la activación de AMPK produce una disminución en los niveles, y esto podría explicar el retraso en el crecimiento de neuronas WT pero no en KO CPT1C.

CPT1C no participa en la morfología de los conos de crecimiento

Gao y colaboradores en 2001, describieron que los ratones KO CPT1C tenían alterada la respuesta anorexigénica a la leptina en neuronas hipotalámicas. La leptina incrementa los niveles de malonil-CoA en el hipotálamo. Se ha descrito que

existen receptores de leptina, no sólo en el hipotálamo, sino también en neuronas corticales, y que esta hormona tiene un efecto sobre la morfología de los conos de crecimiento (Valerio et al. 2006). Este hecho, junto con la interacción de CPT1C con ATL-1 y la localización de dicha proteína en los conos (Zhu et al. 2006), nos llevó a pensar si CPT1C podría también participar en la morfología de los conos de crecimiento en respuesta a la leptina, ya que se ha descrito que la ATL-1 permite el dinamismo del citoesqueleto en el terminal axónico y es clave para la formación y elongación de los axones.

Los resultados obtenidos muestran que CPT1C no parece estar implicada en la morfología de los conos de crecimiento, dado que dicha morfología no se encuentra alterada en las neuronas deficientes de CPT1C. Además, no existe una alteración en la respuesta a la leptina debido a la ausencia de CPT1C ya que tanto en neuronas WT como en deficientes en CPT1C el tratamiento con leptina provoca los mismos efectos en cuanto a la morfología de los conos de crecimiento. La señalización de la leptina está bien descrita en neuronas hipotálamicas, y se conoce bien su papel regulador, sin embargo la información para otras áreas del cerebro es escasa. A pesar de que la leptina regula la morfología del cono axonal, hasta el momento no hay ninguna publicación del papel de la leptina en crecimiento axonal.

Con los resultados obtenidos podemos descartar que una respuesta deficiente a la leptina sea la causante del déficit en el crecimiento axonal observada en las neuronas KO CPT1C.

4. Consideraciones finales

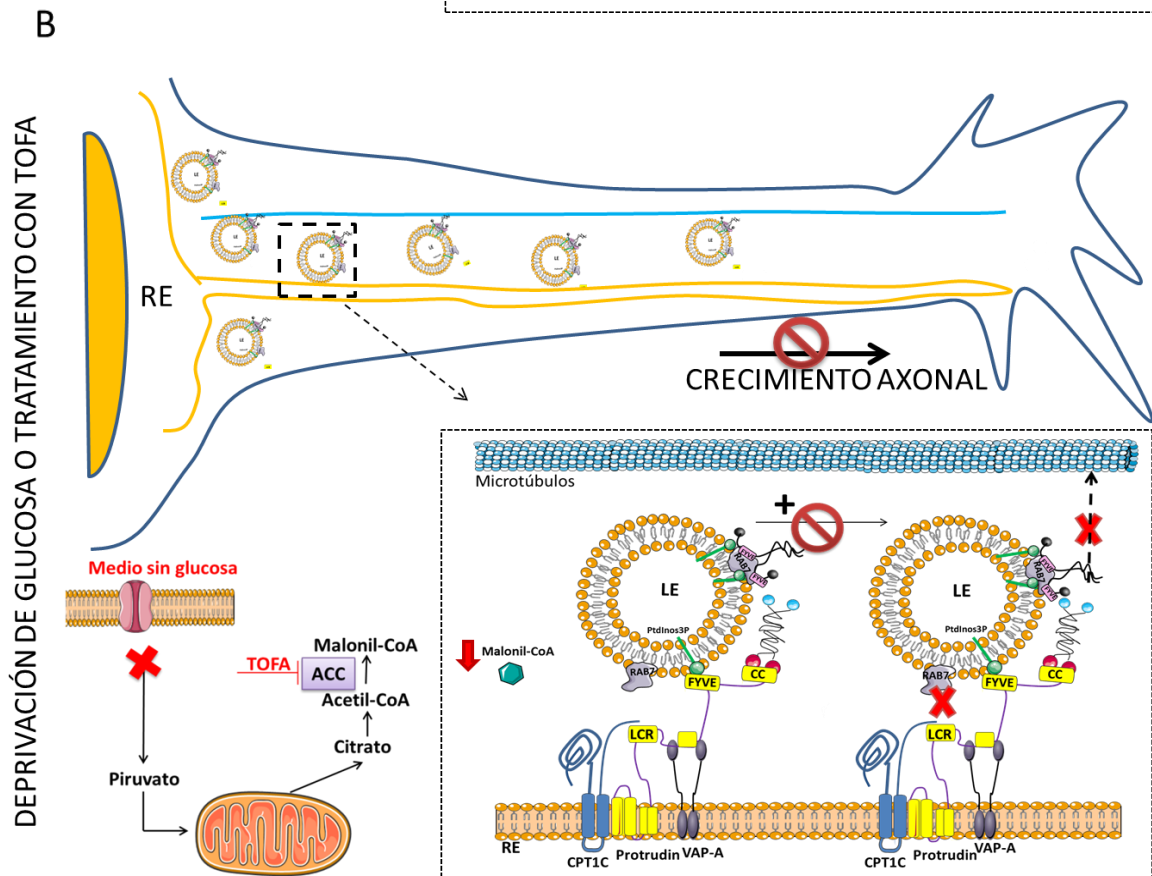
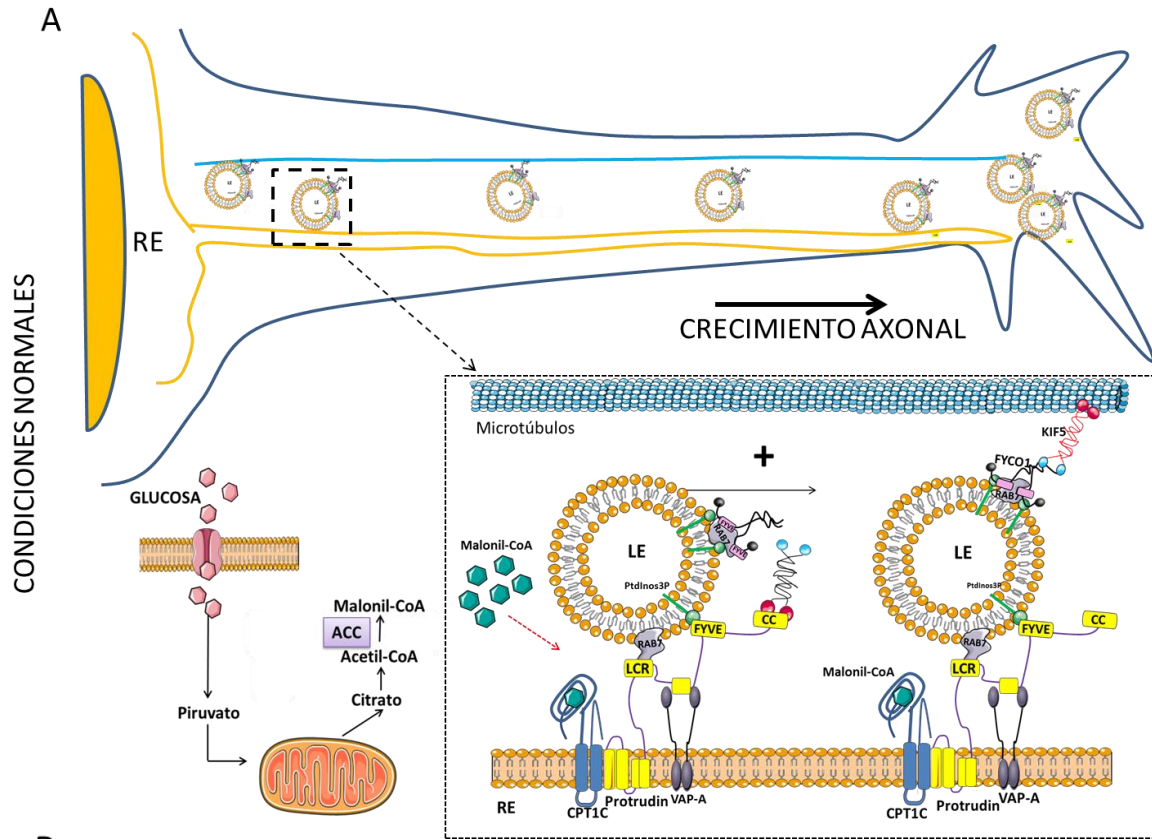
En conclusión, se propone a CPT1C como un sensor de los niveles de malonil-CoA y regulador de la función de la protrudina en el transporte anterógrado de LEs y desarrollo axonal. En la **figura 32** de esta discusión se muestra un resumen de la aportación de este trabajo sobre la función de CPT1C. En la **figura 32A** se propone el mecanismo de transporte anterógrado regulado por CPT1C en condiciones normales de la célula, es decir, en condiciones energéticamente favorables. Cuando los niveles de malonil-CoA son elevados, se favorecería que la protrudina interactuara con Rab7 y PI3P, facilitando el traspaso de kinesina-1 a FYCO-1, formando un complejo que posteriormente entrará en contacto con los microtúbulos, permitiendo así el transporte de los LEs hacia la periferia celular.

Este transporte anterógrado de LEs favorecerá la formación de nuevas membranas, y así el crecimiento axonal. Por el contrario, en la **figura 32B** se propone cómo sería la regulación del transporte cuando los niveles de malonil-CoA son bajos, simulando un estado de déficit energético. En este caso el malonil-CoA no se encuentra unido a CPT1C y quizás ello conlleve a un cambio conformacional en CPT1C que por impedimento estérico no permita que la protrudina se una a Rab7 o PI3P, disminuyendo o paralizando el transporte hacia la periferia. Como los LEs presentan movimiento bidireccional terminarían localizándose en la zona perinuclear.

Este nuevo mecanismo descrito también podría explicar por qué la mutación Arg37Cys da lugar a PEH (Rinaldi et al. 2015). Aunque en este trabajo no se ha estudiado la mutación que ha dado lugar a esta enfermedad en una familia italiana, sí sabemos que dicha mutación provoca un cambio estructural en la proteína haciendo que el extremo N-terminal esté extendido (situación que simula la ausencia de malonil-CoA). Aunque queda aún mucho por investigar sobre esta mutación, pensamos que el mecanismo podría ser similar al descrito, originando un cambio estructural en CPT1C que no permita la interacción de protrudina con los LEs, frenando el transporte axonal y originando una axonopatía del tracto corticoespinal descrito en esta familia.

El papel de CPT1C en funciones tan necesarias para el desarrollo axonal y dendrítico como es el transporte anterógrado, podría sin embargo ser un elemento negativo en el caso de las células tumorales. El incremento de LE en la periferia celular podría incrementar la formación de protrusiones en células cancerosas favoreciendo la invasión, ya que se ha descrito que los LEs son portadores de metaloproteasas (Linder and Biol 2015). Este dato es importante para nuestros estudios porque Reilly y colaboradores publicaron que CPT1C se expresa en diferentes tipos de tumores, destacando especialmente los tumores relacionados con el sistema nervioso central y sarcomas, tumores muy virulentos (Reilly and Mak 2012a). La obtención de fármacos que eviten la unión de malonil-CoA a CPT1C en células tumorales quizás sea en un futuro una buena terapia para disminuir la virulencia de estos tipos de tumores.

En definitiva, creemos que este trabajo ha abierto un nuevo camino para ayudar a entender el papel de CPT1C en el sistema nervioso central. Nuestros resultados indican que CPT1C colabora en funciones esenciales en las células nerviosas, como es el crecimiento axonal. Este papel no parece estar basado en una actividad directa de CPT1C, debido a la ausencia de actividad catalítica, pero sí que podría deberse a la función de CPT1C como sensor de malonil-CoA, regulando así la función de otras proteínas con las que interacciona en función del estado energético de la célula.



← **Figura 32. Modelo propuesto para la participación de CPT1C en el transporte anterógrado de los LE.** A) Condiciones normales, se muestra un modelo energéticamente favorable, en el que hay malonil-CoA. Cuando hay malonil-CoA en la célula se une a CPT1C y mediante la interacción con protrudina se favorece el transporte de LE a la periferia celular. Este transporte permite la formación de nuevas membranas y el crecimiento y desarrollo celular. B) Deprivación de glucosa o tratamiento con TOFA. Cuando las condiciones energéticas son desfavorables (simuladas con el tratamiento con TOFA o deprivación de glucosa), los niveles de malonil-CoA son bajos y no se uniría a CPT1C, se produciría un cambio conformacional y se pararía el transporte, para el ahorro energético o para favorecer otras vías de obtención de energía. Esto hace que los LE se localicen en la zona perinuclear.



CONCLUSIONES

1. CPT1C es necesaria para el correcto crecimiento axonal y dendrítico en cultivos primarios de neuronas corticales.
2. CPT1C actúa como sensor de malonil-CoA. Cuando los niveles son elevados favorece el crecimiento axonal y cuando están reducidos o CPT1C tiene mutado el sitio de unión a malonil-CoA el crecimiento axonal está reducido.
3. CPT1C favorece la polarización inicial del axón.
4. CPT1C interacciona con protrudina.
5. La interacción de CPT1C con protrudina y atlastina-1 no depende de la unión de malonil-CoA.
6. CPT1C no contacta directamente con los endosomas tardíos.
7. La sobreexpresión de CPT1C en células HeLa promueve la localización periférica de los endosomas tardíos dependiendo de la unión a malonil-CoA.
8. La sobreexpresión de CPT1C en células HeLa favorece el transporte anterógrado dependiendo de la unión a malonil-CoA.



RESUMEN EN INGLÉS

Introduction: Carnitine palmitoyltransferase 1C (CPT1C) is an endoplasmic reticulum protein that has no catalytic activity but maintains the ability to bind to malonyl-CoA, an intermediary in the synthesis of fatty acids, whose levels highly fluctuate depending on the energetic status of the cell. Consequently, CPT1C has been proposed to be a sensor of malonyl-CoA in neurons. A CPT1C mutation in the human gene has been described to cause pure hereditary spastic paraplegia (HSP), a group of neurological disorders characterized by slowly progressive weakness and spasticity of the muscles of the legs, caused by axonopathy of corticospinal motor neurons. Genetic analysis has identified more than 50 different loci involved in HSP, with the mutations in the Protrudin gene being responsible for a large number of cases. Protrudin has been recently involved in late endosome (LE) transport along the axon and in neurite growth. We aimed to demonstrate: 1) the interaction between CPT1C and Protrudin, 2) CPT1C regulation of LE transport depending on malonyl-CoA levels, and 3) CPT1C involvement in axon growth.

Material and methods: CPT1C-Protrudin interaction was monitored by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis. Neurite outgrowth measurements were performed in primary culture mouse cortical neurons from WT or CPT1C KO embryos. Analysis of the LE velocity and distance was determined in living Hela cells.

Results: We demonstrate that CPT1C is necessary for the proper growth of axons and dendritic arborization in cortical neurons. FYCO1-positive LEs show a strong movement towards the cell periphery only in CPT1C overexpressing cells and this effect is dependent on malonyl-CoA levels. When CPT1C and Protrudin are overexpressed and malonyl-CoA levels are decreased, LEs are localized in perinuclear area. Moreover, FRET studies demonstrate the interaction between CPT1C and Protrudin.

Conclusions:

1. CPT1C is necessary for the correct axonal and dendritic growth in primary cultures of cortical neurons.

2. CPT1C acts as a malonyl-CoA sensor. High levels of malonyl-CoA favor axonal growth, while low levels or the CPT1C mutation at the malonyl-CoA binding site reduce axonal growth.

3. CPT1C favors the initial polarization of the axon.

4. CPT1C interacts with protrudin.

5. The interaction of CPT1C with protrudin or with atlastin-1 does not depend on malonyl-CoA levels.

6. CPT1C does not contact directly with late endosomes.

7. CPT1C overexpression in HeLa cells promotes the peripheral localization of late endosomes and this effect requires the binding of CPT1C to malonyl-CoA.

8. CPT1C overexpression in HeLa cells favors anterograde transport of LEs. This action is also dependent on the binding of CPT1C to malonyl-CoA.



BIBLIOGRAFÍA

- Amato, S, and H Y Man. 2011. "AMPK Links Cellular Bioenergy Status to the Decision Making of Axon Initiation in Neurons." *Cellular Logistics* 1 (3): 103–5. doi:10.4161/cl.1.3.16815.
- Amato, Stephen, Xiuxin Liu, Bin Zheng, Lewis Cantley, Pasko Rakic, and Heng-Ye Man. 2011. "AMP-Activated Protein Kinase Regulates Neuronal Polarization by Interfering with PI 3-Kinase Localization." *Science (New York, N.Y.)* 332 (6026): 247–51. doi:10.1126/science.1201678.
- Blackstone, Craig, Cahir J O Kane, Evan Reid, Cahir J O’Kane, and Evan Reid. 2011. "Hereditary Spastic Paraplegias: Membrane Traffic and the Motor Pathway." *Nature Reviews. Neuroscience* 12 (1). Nature Publishing Group: 31–42. doi:10.1038/nrn2946.
- Brechet, Aline, Rebecca Buchert, Jochen Schwenk, Sami Boudkkazi, Gerd Zolles, Karine Siquier-pernet, Irene Schaber, et al. 2017. "Ability," no. May. doi:10.1038/ncomms15910.
- Brusselmans, Koen, Ellen De Schrijver, Guido Verhoeven, Koen Brusselmans, Ellen De Schrijver, Guido Verhoeven, and Johannes V Swinnen. 2005. "RNA Interference – Mediated Silencing of the Acetyl-CoA-Carboxylase- A Gene Induces Growth Inhibition and Apoptosis of Prostate Cancer Cells Carboxylase- a Gene Induces Growth Inhibition and Apoptosis of Prostate Cancer Cells." doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0571.
- Carrasco, Patricia, Jordi Jacas, Ignasi Sahún, Helena Muley, Sara Ramírez, Beatriz Puisac, Pau Mezquita, Juan Pié, Mara Dierssen, and Núria Casals. 2013. "Carnitine Palmitoyltransferase 1C Deficiency Causes Motor Impairment and Hypoactivity." *Behavioural Brain Research* 256. Elsevier B.V.: 291–97. doi:10.1016/j.bbr.2013.08.004.
- Carrasco, Patricia, Ignasi Sahún, Jerome McDonald, Sara Ramírez, Jordi Jacas, Esther Gratacós, Adriana Y. Sierra, et al. 2012. "Ceramide Levels Regulated by Carnitine Palmitoyltransferase 1C Control Dendritic Spine Maturation and Cognition." *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M111.337493.
- Casals, Núria, Victor Zammit, Laura Herrero, Rut Fadó, Rosalía Rodríguez-Rodríguez, and Dolors Serra. 2016. "Carnitine Palmitoyltransferase 1C: From Cognition to Cancer." *Progress in Lipid Research* 61. Elsevier B.V.: 134–48. doi:10.1016/j.plipres.2015.11.004.
- Chang, Jaerak, Seongju Lee, and Craig Blackstone. 2013. "Protrudin Binds Atlastins and Endoplasmic Reticulum-Shaping Proteins and Regulates Network Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.1307391110.

- Cheng, Xiu Tang, Bing Zhou, Mei Yao Lin, Qian Cai, and Zu Hang Sheng. 2015. "Axonal Autophagosomes Recruit Dynein for Retrograde Transport through Fusion with Late Endosomes." *Journal of Cell Biology* 209 (3): 377–86. doi:10.1083/jcb.201412046.
- Colombo, Marina. 2014. "Biogenesis , Secretion , and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles," 255–92. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- Dai, Yun, Michael J. Wolfgang, Seung Hun Cha, and M. Daniel Lane. 2007. "Localization and Effect of Ectopic Expression of CPT1c in CNS Feeding Centers." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359 (3): 469–74. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.161.
- De Souza, Paulo Victor Sgobbi, Wladimir Bocca Vieira de Rezende Pinto, Gabriel Novaes de Rezende Batistella, Thiago Bortholin, and Acary Souza Bulle Oliveira. 2016. "Hereditary Spastic Paraplegia: Clinical and Genetic Hallmarks." *The Cerebellum*. The Cerebellum. doi:10.1007/s12311-016-0803-z.
- Doherty, Gary J, and Harvey T McMahon. 2009. "Mechanisms of Endocytosis." doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- Esser, Victoria, Nicholas F Brown, Andrew T Cowan, Daniel W Foster, J Denis McGarry, and H Febs Lett. 1996. "Expression of a cDNA Isolated from Rat Brown Adipose Tissue and Heart Identifies the Product as the Muscle Isoform of Carnitine Palmitoyltransferase I (M-CPT I) Isolated from Rat Brown Adipose Tissue (BAT) by." *Biochemistry* 271 (12): 6972–77. doi:10.1074/jbc.271.12.6972.
- Fadó, Rut, David Soto, Alfredo J. Miñano-Molina, Macarena Pozo, Patricia Carrasco, Natalia Yefimenko, José Rodríguez-Álvarez, and Núria Casals. 2015. "Novel Regulation of the Synthesis of γ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid (ampa) Receptor Subunit glua1 by Carnitine Palmitoyltransferase 1C (CPT1C) in the Hippocampus." *Journal of Biological Chemistry* 290 (42): 25548–60. doi:10.1074/jbc.M115.681064.
- Finsterer, Josef, Wolfgang Löscher, Stefan Quasthoff, Julia Wanschitz, Michaela Auer-Grumbach, and Giovanni Stevanin. 2012. "Hereditary Spastic Paraplegias with Autosomal Dominant, Recessive, X-Linked, or Maternal Trait of Inheritance." *Journal of the Neurological Sciences* 318 (1-2). Elsevier B.V.: 1–18. doi:10.1016/j.jns.2012.03.025.
- Friedman, Jonathan R, Jared R Dibenedetto, Matthew West, Ashley a Rowland, and Gia K Voeltz. 2013. "Endoplasmic Reticulum-Endosome Contact Increases as Endosomes Traffic and Mature." *Molecular Biology of the Cell* 24 (7): 1030–40. doi:10.1091/mbc.E12-10-0733.

- Gao, Su, Kimberly P Kinzig, Susan Aja, Karen a Scott, Wendy Keung, Sandra Kelly, Ken Strynadka, et al. 2007. "Leptin Activates Hypothalamic Acetyl-CoA Carboxylase to Inhibit Food Intake." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (44): 17358–63. doi:10.1073/pnas.0708385104.
- Gao, Su, Guangjing Zhu, Xuefei Gao, Donghai Wu, Patricia Carrasco, Núria Casals, and Fausto G Hegardt. 2011. "Important Roles of Brain-Specific Carnitine Palmitoyltransferase and Ceramide Metabolism in Leptin Hypothalamic Control of Feeding," no. 25. doi:10.1073/pnas.1103267108.
- Gibbs, Katherine L, Linda Greensmith, and Giampietro Schiavo. 2015. "Regulation of Axonal Transport by Protein Kinases." *Trends in Biochemical Sciences* 40 (10). Elsevier Ltd: 597–610. doi:10.1016/j.tibs.2015.08.003.
- Go, Paulino, Assia Bentebibel, Eva Selle, Nuria Casals, Alfonso Valencia, Fausto G Hegardt, Guillermina Asins, and Dolors Serra. 2003. "Identification of Conserved Amino Acid Residues in Rat Liver Carnitine Palmitoyltransferase I Critical for Malonyl-CoA Inhibition" 278 (11): 9058–63. doi:10.1074/jbc.M209999200.
- Gratacòs-Batlle, Esther, Natalia Yefimenko, Helena Cascos-García, and David Soto. 2014. "AMPA Interacting Protein CPT1C Enhances Surface Expression of GluA1-Containing Receptors." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (February): 469. doi:10.3389/fncel.2014.00469.
- Guerra, Flora, and Cecilia Bucci. 2016. "Multiple Roles of the Small GTPase Rab7." *Cells* 5 (3). doi:10.3390/cells5030034.
- Hardie, D Grahame. 2004. "The AMP-Activated Protein Kinase Pathway – New Players Upstream and Downstream." doi:10.1242/jcs.01540.
- Hashimoto, Yutaka, Michiko Shirane, Fumiko Matsuzaki, Shotaro Saita, Takafumi Ohnishi, and Keiichi I. Nakayama. 2014. "Protrudin Regulates Endoplasmic Reticulum Morphology and Function Associated with the Pathogenesis of Hereditary Spastic Paraplegia." *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M113.528687.
- Herrero, Laura, Blanca Rubí, David Sebastia, Dolors Serra, Guillermina Asins, Pierre Maechler, Marc Prentki, and Fausto G Hegardt. 2005. "Alteration of the Malonyl-CoA / Carnitine Palmitoyltransferase I Interaction in the β -Cell Impairs Glucose-Induced Insulin Secretion" 54 (February).
- Hong, Zhi, Nina Marie Pedersen, Ling Wang, Maria Lyngaas Torgersen, Harald Stenmark, and Camilla Raiborg. 2017. "PtdIns3P Controls mTORC1 Signaling through Lysosomal Positioning," 1–17.

- Huotari, Jatta, and Ari Helenius. 2011. "Endosome Maturation." *The EMBO Journal* 30 (17). Nature Publishing Group: 3481–3500. doi:10.1038/emboj.2011.286.
- Jiang, Lake Q, Thais De Castro Barbosa, Julie Massart, Atul S Deshmukh, Lars Löfgren, Daniella E Duque-guimaraes, Arda Ozilgen, Megan E Osler, Alexander V Chibalin, and Juleen R Zierath. 2016. "Diacylglycerol Kinase- α Regulates AMPK Signaling , Lipid Metabolism , and Skeletal Muscle Energetics," no. 13: 51–60. doi:10.1152/ajpendo.00209.2015.
- Klemm, Robin W., Justin P. Norton, Ronald A. Cole, Chen S. Li, Seong H. Park, Matthew M. Crane, Liying Li, et al. 2013. "A Conserved Role for Atlastin GTPases in Regulating Lipid Droplet Size." *Cell Reports*. doi:10.1016/j.celrep.2013.04.015.
- Krauß, Michael, and Volker Haucke. 2015. "In Membrane Protrusion Formation and Neurite Outgrowth" 34 (11): 1442–44.
- Lane, M D, Z Hu, S Cha, Y Dai, M Wolfgang, and A Sidhaye. 2005. "Role of Malonyl-CoA in the Hypothalamic Control of Food Intake and Energy Expenditure," 1063–67.
- Laurino, Lisandro, Xiaoxin X Wang, Becky A De Houssaye, Lucas Sosa, Sebastian Dupraz, Alfredo Cáceres, Karl H Pfenninger, and Santiago Quiroga. 2005. "PI3K Activation by IGF-1 Is Essential for the Regulation of Membrane Expansion at the Nerve Growth Cone," no. c. doi:10.1242/jcs.02490.
- Li, Ji-nong, Myriam Gorospe, Francis J Chrest, Tirukalikundram S Kumaravel, Michele K Evans, Wan Fang Han, and Ellen S Pizer. 2001. "Pharmacological Inhibition of Fatty Acid Synthase Activity Produces Both Cytostatic and Cytotoxic Effects Modulated by p53 1," no. 21: 1493–99.
- Linder, Stefan, and J Cell Biol. 2015. "MT1-MMP : Endosomal Delivery Drives Breast Cancer Metastasis" 211 (2): 215–17. doi:10.1083/jcb.201510009.
- Lo Giudice, Temistocle, Federica Lombardi, Filippo Maria Santorelli, Toshitaka Kawarai, and Antonio Orlacchio. 2014. "Hereditary Spastic Paraplegia: Clinical-Genetic Characteristics and Evolving Molecular Mechanisms." *Experimental Neurology* 261. Elsevier B.V.: 518–39. doi:10.1016/j.expneurol.2014.06.011.
- Maday, Sandra, Alison E Twelvetrees, Armen J Moughamian, and Erika L F Holzbaur. 2014. "Review Axonal Transport : Cargo-Specific Mechanisms of Motility and Regulation." *Neuron* 84 (2). Elsevier Inc.: 292–309. doi:10.1016/j.neuron.2014.10.019.

- Mayor, Satyajit, Richard E Pagano, and Rab Gtpase. 2007. "Pathways of Clathrin-Independent Endocytosis" 8 (August): 603–12. doi:10.1038/nrm2216.
- McGarry, J D, and N F Brown. 1997. "The Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase System. From Concept to Molecular Analysis." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 244 (1): 1–14. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00001.x.
- Medina, José M., and Arantxa Tabernero. 2002. "Astrocyte-Synthesized Oleic Acid Behaves as a Neurotrophic Factor for Neurons." *Journal of Physiology Paris* 96 (3-4): 265–71. doi:10.1016/S0928-4257(02)00015-3.
- Namba, Takashi, Yasuhiro Funahashi, Shinichi Nakamuta, Chundi Xu, Tetsuya Takano, and Kozo Kaibuchi. 2015. "Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity," 995–1024. doi:10.1152/physrev.00025.2014.
- Noreau, Anne, Patrick A. Dion, and Guy A. Rouleau. 2014. "Molecular Aspects of Hereditary Spastic Paraplegia." *Experimental Cell Research*. doi:10.1016/j.yexcr.2014.02.021.
- Ohnishi, Takafumi, Michiko Shirane, Yutaka Hashimoto, and Shotaro Saita. 2014. "Identification and Characterization of a Neuron-Specific Isoform of Protrudin," 97–111. doi:10.1111/gtc.12109.
- Ohnishi, Takafumi, Michiko Shirane, and I N Keiichi. 2017. "Alternative Splicing of Protrudin Transcripts Regulates Neurite Outgrowth," no. August 2016: 1–13. doi:10.1038/srep41130.
- Pankiv, Serhiy, Endalkachew a. Alemu, Andreas Brech, Jack Ansgar Bruun, Trond Lamark, Aud ??Vervatn, Geir Bj??rk??y, and Terje Johansen. 2010. "FYCO1 Is a Rab7 Effector That Binds to LC3 and PI3P to Mediate Microtubule plus End - Directed Vesicle Transport." *Journal of Cell Biology* 188 (2): 253–69. doi:10.1083/jcb.200907015.
- Pantakani, D V Krishna, Marta M Czyzewska, Anna Sikorska, Chiranjeevi Bodda, and Ashraf U Mannan. 2011. "Oligomerization of ZFYVE27 (Protrudin) Is Necessary to Promote Neurite Extension" 6 (12). doi:10.1371/journal.pone.0029584.
- Papadopoulos, Chrisovalantis, Genny Orso, Giuseppe Mancuso, Marija Herholz, Sentiljana Gumeni, Nimesha Tadepalle, Christian Jüngst, et al. 2015. "Spastin Binds to Lipid Droplets and Affects Lipid Metabolism." *PLoS Genetics* 11 (4): e1005149. doi:10.1371/journal.pgen.1005149.
- Park, Seong H., Peng Peng Zhu, Rell L. Parker, and Craig Blackstone. 2010. "Hereditary Spastic Paraplegia Proteins REEP1, Spastin, and Atlastin-1

- Coordinate Microtubule Interactions with the Tubular ER Network.” *Journal of Clinical Investigation*. doi:10.1172/JCI40979.
- Pozo, Macarena, Rosalía Rodríguez-rodríguez, Sara Ramírez, Patricia Seoane-collazo, Miguel López, Dolores Serra, Laura Herrero, and Núria Casals. 2017. “Hypothalamic Regulation of Liver and Muscle Nutrient Partitioning by Brain-Specific Carnitine Palmitoyltransferase 1C (CPT1C) in Male Mice.” doi:10.1210/en.2017-00151.
- Price, Nigel T, Feike R van der Leij, Vicky N Jackson, Clark G Corstorphine, Ross Thomson, Annette Sorensen, and Victor a Zammit. 2002. “A Novel Brain-Expressed Protein Related to Carnitine Palmitoyltransferase I.” *Genomics* 80 (4): 433–42. doi:10.1006/geno.2002.6845.
- Raiborg, Camilla, Eva M Wenzel, and Harald Stenmark. 2015. “ER-Endosome Contact Sites: Molecular Compositions and Functions.” *The EMBO Journal* 34 (1848): 1848–58. doi:10.15252/embj.201591481.
- Raiborg, Camilla, Eva M. Wenzel, Nina M. Pedersen, Hallvard Olsvik, Kay O. Schink, Sebastian W. Schultz, Marina Vietri, et al. 2015. “Repeated ER-Endosome Contacts Promote Endosome Translocation and Neurite Outgrowth.” *Nature* 520 (7546): 234–38. doi:10.1038/nature14359.
- Ramírez, Sara, Luís Martins, Jordi Jacas, Patricia Carrasco, Macarena Pozo, Josep Clotet, Dolores Serra, et al. 2013. “Hypothalamic Ceramide Levels Regulated by cpt1c Mediate the Orexigenic Effect of Ghrelin.” *Diabetes* 62 (7): 2329–37. doi:10.2337/db12-1451.
- Rao, Jampani N, Gemma Z L Warren, Sara Estolt-povedano, Victor A Zammit, and Tobias S Ulmer. 2011. “An Environment-Dependent Structural Switch Underlies the Regulation of Carnitine Palmitoyltransferase 1A * □” 286 (49): 42545–54. doi:10.1074/jbc.M111.306951.
- Reilly, Patrick T, and Tak W Mak. 2012a. “Molecular Pathways : Tumor Cells Co-Opt the Brain-Speci Fi c Metabolism Gene CPT1C to Promote Survival” 18 (13): 5850–56. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3281.
- Reilly, Patrick T., and Tak W. Mak. 2012b. “Molecular Pathways: Tumor Cells Co-Opt the Brain-Specific Metabolism Gene CPT1C to Promote Survival.” *Clinical Cancer Research* 18 (21): 5850–55. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3281.
- Rinaldi, Carlo, Thomas Schmidt, Alan J. Situ, Janel O. Johnson, Philip R. Lee, Ke-lian Chen, Laura C. Bott, et al. 2015. “Mutation in *CPT1C* Associated With Pure Autosomal Dominant Spastic Paraplegia.” *JAMA Neurology*. doi:10.1001/jamaneurol.2014.4769.

- Rismanchi, Neggy, Cynthia Soderblom, Julia Stadler, Peng Peng Zhu, and Craig Blackstone. 2008. "Atlantin GTPases Are Required for Golgi Apparatus and ER Morphogenesis." *Human Molecular Genetics*. doi:10.1093/hmg/ddn046.
- Rocha, Nuno, Coenraad Kuijl, Rik Van Der Kant, Lennert Janssen, Diane Houben, Hans Janssen, Wilbert Zwart, and Jacques Neefjes. 2009. "Cholesterol Sensor ORP1L Contacts the ER Protein VAP to Control Rab7-RILP-p150Glued and Late Endosome Positioning." *Journal of Cell Biology* 185 (7): 1209–25. doi:10.1083/jcb.200811005.
- Ruano, Luis, Claudia Melo, M. Carolina Silva, and Paula Coutinho. 2014. "The Global Epidemiology of Hereditary Ataxia and Spastic Paraplegia: A Systematic Review of Prevalence Studies." *Neuroepidemiology* 42 (3): 174–83. doi:10.1159/000358801.
- Ruderman, Neil B, Asish K Saha, and Edward W Kraegen. 2010. "Minireview : Malonyl CoA , AMP-Activated Protein" 144 (12): 5166–71. doi:10.1210/en.2003-0849.
- Saita, Shotaro, Michiko Shirane, Tohru Natume, Shun Ichiro Iemura, and Keiichi I. Nakayama. 2009. "Promotion of Neurite Extension by Protrudin Requires Its Interaction with Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein." *Journal of Biological Chemistry* 284 (20): 13766–77. doi:10.1074/jbc.M807938200.
- Samanta, Soma, Alan J. Situ, and Tobias S. Ulmer. 2014. "Structural Characterization of the Regulatory Domain of Brain Carnitine Palmitoyltransferase." *Biopolymers* 101 (4): 398–405. doi:10.1002/bip.22396.
- Schmieg, Nathalie, Guillermo Menendez, Giampietro Schiavo, and Marco Terenzio. 2014. "Signalling Endosomes in Axonal Transport: Travel Updates on the Molecular Highway." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 27. Elsevier Ltd: 32–43. doi:10.1016/j.semcd.2013.10.004.
- Scho, L, A Visbeck, T Papke, S Sauter, B Mitterski, S Klimpe, and D Bo. 2002. "Mutation Analysis of the Spastin Gene (SPG4) in Patients in Germany With Autosomal Dominant Hereditary Spastic Paraplegia" 132: 127–32. doi:10.1002/humu.10105.
- Schwenk, Jochen, Nadine Harmel, Aline Brechet, Gerd Zolles, Henrike Berkefeld, Catrin Swantje Mu, Uwe Schulte, et al. 2012. "NeuroResource High-Resolution Proteomics Unravel Architecture and Molecular Diversity of Native AMPA Receptor Complexes," no. Mu 2010: 621–33. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.034.

- Scott, Cameron C, Fabrizio Vacca, and Jean Gruenberg. 2014. “Endosome Maturation, Transport and Functions.” *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 1–9. doi:10.1016/j.semcdb.2014.03.034.
- Shirane, Michiko, and Keiichi I Nakayama. n.d. “Protrudin Induces Neurite Formation.”
- Sierra, Adriana Y., Esther Gratacós, Patricia Carrasco, Josep Clotet, Jesús Ureña, Dolors Serra, Guillermina Asins, Fausto G. Hegardt, and Núria Casals. 2008. “CPT1c Is Localized in Endoplasmic Reticulum of Neurons and Has Carnitine Palmitoyltransferase Activity.” *Journal of Biological Chemistry* 283 (11): 6878–85. doi:10.1074/jbc.M707965200.
- Simo, Diana, and Juan Jose. 2007. “GSK3 Alpha and GSK3 Beta Are Necessary for Axon Formation” 581: 1579–86. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.018.
- Song, Yanmin et al. 2014. “Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Manifested as Spastic Paraplegia: A Clinical and Genetic Study.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 9: 417–20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4280951/>.
- Valerio, Alessandra, Valentina Ghisi, Marta Dossena, Cristina Tonello, Antonio Giordano, Andrea Frontini, Marina Ferrario, et al. 2006. “Leptin Increases Axonal Growth Cone Size in Developing Mouse Cortical Neurons by Convergent Signals Inactivating Glycogen Synthase Kinase-3?” *Journal of Biological Chemistry* 281 (18): 12950–58. doi:10.1074/jbc.M508691200.
- Welz, Tobias, Joel Wellbourne-wood, and Eugen Kerkhoff. 2014. “Orchestration of Cell Surface Proteins by Rab11.” *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 1–9. doi:10.1016/j.tcb.2014.02.004.
- Wijdeven, Ruud H, Hans Janssen, Leila Nahidiazar, Lennert Janssen, Kees Jalink, Ilana Berlin, and Jacques Neefjes. 2016. “Cholesterol and ORP1L-Mediated ER Contact Sites Control Autophagosome Transport and Fusion with the Endocytic Pathway.” *Nature Communications* 7 (May). Nature Publishing Group: 11808. doi:10.1038/ncomms11808.
- Wijdeven, Ruud H., Marlieke L M Jongsma, Jacques Neefjes, and Ilana Berlin. 2015. “ER Contact Sites Direct Late Endosome Transport.” *BioEssays* 37 (12): 1298–1302. doi:10.1002/bies.201500095.
- Williams, Tyisha, and Jay E. Brenman. 2008. “LKB1 and AMPK in Cell Polarity and Division.” *Trends in Cell Biology* 18 (4): 193–98. doi:10.1016/j.tcb.2008.01.008.
- Wolfgang, Michael J, Takeshi Kurama, Yun Dai, Akira Suwa, Makoto Asaumi, Shun-Ichiro Matsumoto, Seung Hun Cha, Teruhiko Shimokawa, and M

- Daniel Lane. 2006. "The Brain-Specific Carnitine Palmitoyltransferase-1c Regulates Energy Homeostasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (19): 7282–87. doi:10.1073/pnas.0602205103.
- Wood, Jonathan D., Jennifer A. Landers, Megan Bingley, Christopher J. McDermott, Vickie Thomas-McArthur, Lisa J. Gleadall, Pamela J. Shaw, and Vincent T. Cunliffe. 2006. "The Microtubule-Severing Protein Spastin Is Essential for Axon Outgrowth in the Zebrafish Embryo." *Human Molecular Genetics*. doi:10.1093/hmg/ddl212.
- Yamazaki, N, Y Shinohara, a Shima, and H Terada. 1995. "High Expression of a Novel Carnitine Palmitoyltransferase I like Protein in Rat Brown Adipose Tissue and Heart: Isolation and Characterization of Its cDNA Clone." *FEBS Letters* 363 (1-2): 41–45.
- Yu, Wenqian, Liang Qiang, Joanna M Solowska, Arzu Karabay, Sirin Korulu, and Peter W Baas. 2008. "The Microtubule-Severing Proteins Spastin and Katanin Participate Differently in the Formation of Axonal Branches" 19 (April): 1485–98. doi:10.1091/mbc.E07.
- Zaugg, K., Yao, Y., Reilly, P. T., Kannan, K., Kiarash, R., Mason, J. Huang, P., Sawyer, S. K., Fuerth, B., Faubert, B., Elia, A., Luo, X., Nadeem, V., Bungard, D., Yalavarthi, S., Growney, J. D., Wakeham, A., Moolani, Y., Silvester, J., Ten, A. Y., Bakke, M. O. 2011. "Carnitine Palmitoyltransferase 1C Promotes Cell Survival and Tumor Growth under Conditions of Metabolic Stress." *Genes & Development* 25 (1): 1041–51. doi:10.1101/gad.1987211.Freely.
- Zhu, Peng Peng, Cynthia Soderblom, Jung H. Tao-Cheng, Julia Stadler, and Craig Blackstone. 2006. "SPG3A Protein Atlastin-1 Is Enriched in Growth Cones and Promotes Axon Elongation during Neuronal Development." *Human Molecular Genetics*. doi:10.1093/hmg/ddl054.



ANEXO 1

Type	MI	Gene/Protein	PPF	References
SPG1	XR	L1CAM/NCAM	Neuronal cell adhesion and signaling	Jouet et al. (1994)
SPG2	XR	PLP1/MPLP	Myelination and axonal survival	Saugier-Weber et al. (1994)
SPG3A	AD	ATL1/ATLASTIN-1	Neurite outgrowth, membrane trafficking, ER and Golgi morphogenesis	Zhao et al. (2001)
SPG4	AD	SPAST/SPASTIN	Microtubule dynamics, membrane trafficking, ER morphogenesis, BMP signaling	Hazan et al. (1999)
SPG5A	AR	CYP7B1/OAH1	Brain cholesterol metabolism	Tsaousidou et al. (2008)
SPG6	AD	NIPA1/NIPA1	Cellular magnesium ion metabolism, endosomal/ER morphogenesis, protein folding	Rainier et al. (2003)
SPG7	AR	PGN/PARAPLEGIN	Mitochondrial protease, ribosome maturation	Casari et al. (1998)
SPG8	AD	KIAA0196/STRUMPELLIN	Endosomal morphogenesis, protein folding	Valdmanis et al. (2007)
SPG9	AD	–	Unknown	Seri et al. (1999)
SPG10	AD	KIF5A/KINESIN HC5A	Microtubule-based motor protein	Reid et al. (2002)
SPG11	AR	KIAA1840/SPATACSIN	Vesicles sorting	Stevanin et al. (2007b)
SPG12	AD	RTN2/RETICULON 2	ER morphogenesis	Montenegro et al. (2012)
SPG13	AD	HSPD1/HSP60	Protein folding and assembly in mitochondria	Hansen et al. (2002)
SPG14	AR	–	Unknown	Vazza et al. (2000)
SPG15	AR	ZFYVE26/SPASTIZIN	Endosomal trafficking, autophagy, cytokinesis	Hanein et al. (2008)
SPG16	XR	–	Unknown	Steinmuller et al. (1997)
SPG17	AD	BSCL2/SEIPIN	Lipid metabolism, ER stress response	Windpassinger et al. (2004)
SPG18	AR	ERLIN2/SPFH2	Regulation of ERAD pathway	Alazami et al. (2011)
SPG19	AD	–	Unknown	Valente et al. (2002)
SPG20	AR	SPG20/SPARTIN	Protein folding, turnover in mitochondria and microtubule dynamics	Patel et al. (2002)
SPG21	AR	ACP33/MASPARDIN	Endosomal trafficking and sorting	Simpson et al. (2003)
SPG22	XL	SLC16A2/MCT8	Membrane transporter (axon development)	Schwartz et al. (2005)
SPG23	AR	–	Unknown	Blumen et al. (2003)
SPG24	AR	–	Unknown	Hodgkinson et al. (2002)
SPG25	AR	–	Unknown	Zortea et al. (2002)
SPG26	AR	B4GALNT1/B4GALNT1	Ganglioside biosynthesis	Boukhris et al. (2013)
SPG27	AR	–	Unknown	Meijer et al. (2004)
SPG28	AR	DDHD1/PAPLA1	Fatty-acid and/or phospholipid metabolism	Tesson et al. (2012)
SPG29	AD	–	Unknown	Orlacchio et al. (2005a)
SPG30	AR	KIF1A/KINESIN3	Anterograde transport	Erlich et al. (2011)
SPG31	AD	REEP1/REEP1	Chaperon-like activities, ER morphogenesis	Züchner et al. (2006)

SPG32	AR	–	Unknown	Stevanin et al. (2007a)
SPG33	AD	ZFYVE27/PROTRUDIN	Specific spastin binding protein	Mannan et al. (2006)
SPG34	XL	–	Unknown	Macedo-Souza et al. (2008)
SPG35	AR	FA2H/FA2H	Sphingolipids synthesis	Dick et al. (2010)
SPG36	AD	–	Unknown	Schüle et al. (2009a)
SPG37	AD	–	Unknown	Hanein et al. (2007)
SPG38	AD	–	Unknown	Orlacchio et al. (2008b)
SPG39	AR	NTE/PNPLA6	Maintain the integrity of motor neurons, phospholipid homeostasis	Rainier et al. (2008)
SPG40	AD	–	–	Subramony et al. (2009)
SPG41	AD	–	Unknown	Zhao et al. (2008)
SPG42	AD	SLC33A1/ACoA CARRIER	Acetyl-CoA transporter	Lin et al. (2008)
SPG43	AR	C19orf12/C19ORF12	Unknown	Landouré et al. (2013)
SPG44	AR	GJC2/CONNEXIN 47	Formation of gap junctions, direct cell-to cell diffusion of ions and small molecules	Orthmann-Murphy et al. (2009)
SPG45	AR	–	Unknown	Dursun et al. (2009)
SPG46	AR	GBA2/GBA2	Ganglioside biosynthesis	Martin et al. (2013)
SPG47	AR	AP4B1/AP4B1	Vesicle formation, molecular cargo	Abou Jamra et al. (2011)
SPG48	AR	KIAA0415/AP5Z1	Helicase that repair DNA double-strand break and interacts with spatacsin and spastin	Slabicki et al. (2010)
SPG49	AR	TECPR2/KIAA0329	Intracellular autophagy	Oz-Levi et al. (2012)
SPG50	AR	AP4M1/AP4M1	Vesicle formation, molecular cargo	Abou Jamra et al. (2011)
SPG51	AR	AP4E1/AP4E1	Vesicle formation, molecular cargo	Abou Jamra et al. (2011)
SPG52	AR	AP4S1/AP4S1	Vesicle formation, molecular cargo	Abou Jamra et al. (2011)
SPG53	AR	VPS37A/VPS37A	Sorting of ubiquitinated transmembrane proteins into internal vesicles	Zivony-Elboun et al. (2012)
SPG54	AR	DDHD2/DDHD2	Intracellular phospholipase	Schuurs-Hoeijmakers et al. (2012)
SPG55	AR	C12orf65/C12ORF65	Peptide chain termination in the mitochondrial translation machinery	Shimazaki et al. (2012)
SPG56	AR	CYP2U1/CYP2U1	Fatty acids hydroxylation	Tesson et al. (2012)
SPG57	AR	TFG/TFG	Oncogenesis and vesicle biogenesis and trafficking	Beetz et al. (2013)
SPG58	AR	KIF1C/KINESIN FAMILY MEMBER 1C	Retrograde Golgi to ER transport	Novarino et al. (2014)
SPG59	AR	USP8/UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 8	Deubiquitinating enzyme	Novarino et al. (2014)
SPG60	AR	WDR48/WD REPAET DOMAIN 48	Regulator of deubiquitination	Novarino et al. (2014)
SPG61	AR	ARL6IP1/ADP-RIBOSYLATION FACTOR-LIKE 6 INTERACTING PROTEIN 1	Protein transport	Novarino et al. (2014)
SPG62	AR	ERLIN1/ER LIPID RAFT ASSOCIATED 1	ER-associated degradation	Novarino et al. (2014)
SPG63	AR	AMPD2/ADENOSINE MONOPHOSPHATE DEAMINASE 2	Deaminates AMP to IMP in purine nucleotide metabolism	Novarino et al. (2014)

SPG64	AR	ENTPD1/ECTONUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE DIPHOSPHOHYDROLAS	Hydrolyzes ATP and other nucleotides to regulate purinergic transmission	Novarino et al. (2014)
SPG65	AR	NT5C2/5'-NUCLEOTIDASE, CYTOSOLIC II	Preferentially hydrolyzes IMP, in both purine/pyrimidine nucleotide metabolism	Novarino et al. (2014)
SPG66	AR	ARSI/ARYLSULFATASE FAMILY, MEMBER I	Hydrolyze sulfate esters, hormone biosynthesis	Novarino et al. (2014)
SPG67	AR	PGAP1/POST-GPI ATTACHMENT TO PROTEINS 1	GPI biosynthesis	Novarino et al. (2014)
SPG68	AR	FLRT1/FIBRONECTIN LEUCINE RICH TRANSMEMBRANE PROTEIN 1	Cell adhesion and receptor signaling	Novarino et al. (2014)
SPG69	AR	RAB3GAP2/RAB3 GTPASE ACTIVATING PROTEIN SUBUNIT 2	Exocytosis of neurotransmitters and hormones	Novarino et al. (2014)
SPG70	AR	MARS/METHIONYL-TRNA SYNTHETASE	Cytosolic methionyl-tRNA synthetase	Novarino et al. (2014)
SPG71	AR	ZFR/ZINC FINGER RNA-BINDING PROTEIN	RNA localization?	Novarino et al. (2014)
SPG72	AD/AR	REEP2/RECEPTOR EXPRESSION-ENHANCING PROTEIN 2	ER-shaping protein	Esteves et al., 2014;Novarino et al., 20
SPG73	AD	CPT1C	<i>Neurite outgrowth and membrane trafficking.</i>	Rinaldi et al. 2015
SPG74	AR	IBA57	Mitochondrial dysfunction	Lossos et al., 2015
SPG75	AR	MAG/MYELIN ASSOCIATED GLYCOPROTEIN	Component of myelin	Novarino et al. (2014)
SPG76	AR	CAPN1	Regulation and organization of dendritic trees	Gan-Or et al. (2016)
SPG77	AR	FARS2	Unknown	Yang et al. 2016
Ua	AR	GAD1/GLUTAMATE DECARBOXYLASE 1	GABA synthesis	Lynex et al. (2004)
Ua	AR	CCT5	Proteins folding and cytosolic proteins assembly	Bouhouche et al. (2006)
Ua	AR	OPA3/OPTIC ATROPHY 3 PROTEIN	Regulator of mitochondrial activity	Arif et al. (2013)
Ua	AR	BICD2/BICAUDAL D HOMOLOG 2	Protein transport	Novarino et al. (2014)
Ua	AR	LYST/LYSOSOMAL TRAFFICKING REGULATOR	Lysosomal trafficking regulator	Shimazaki et al. (2014)
Ua	AR	MT-ATP6/ATP SYNTHASE 6	Mitochondrial ATP production	Verny et al. (2011)
SPOAN	AR	-	Unknown	Macedo-Souza et al. (2005)

MI= modo herencia PPF= Función de la proteína AD=autosomica dominante; AR=autosomica recesiva; XL=ligada al cromosoma X; Ua = SPG no asignado

Tabla 1 modificada (Finsterer et al. 2012; Lo Giudice et al. 2014).



ANEXO 2: ARTÍCULO

Uridine-5'-Triphosphate Partially Blocks Differentiation Signals and Favors a more Repair State in Cultured rat Schwann Cells

Marta Palomo-Guerrero,^a Jose Miguel Cosgaya,^b Alejandro Gella,^c Núria Casals^{a,d,*} and Carmen Grijota-Martinez^{a*}

^a Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Sant Cugat del Vallès, Spain

^b Department of Endocrine and Nervous System Pathophysiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^c Instituto de Neurociencias, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Biociencias, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

^d Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Abstract—Schwann cells (SCs) play a key role in peripheral nerve regeneration. After damage, they respond acquiring a repair phenotype that allows them to proliferate, migrate and redirect axonal growth. Previous studies have shown that Uridine-5'-Triphosphate (UTP) and its purinergic receptors participate in several pathophysiological responses in the nervous system. Our group has previously described how UTP induces the migration of a Schwannoma cell line and promotes wound healing. These data suggest that UTP participates in the signaling involved in the regeneration process. In the present study we evaluated UTP effects in isolated rat SCs and cocultures of SCs and dorsal root ganglia neurons. UTP reduced cAMP-dependent Krox-20 induction in SCs. UTP also reduced the N-cadherin re-expression that occurs when SCs and axons make contact. In myelinating cocultures, a non-significant tendency to a lower expression of P0 and MAG proteins in presence of UTP was observed. We also demonstrated that UTP induced SC migration without affecting cell proliferation. Interestingly, UTP was found to block neuregulin-induced phosphorylation of the ErbB3 receptor, a pathway involved in the regeneration process. These results indicate that UTP could act as a brake to the differentiation signals, promoting a more migratory state in the repair-SCs. © 2018 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: peripheral nerve regeneration, Schwann cells, UTP, neuregulin, migration, N-cadherin.

INTRODUCTION

In peripheral nerve damage, axons and myelin in the distal nerve stump are eliminated after injury in a process known as Wallerian degeneration. This process involves a series of molecular and cellular changes to create a microenvironment that promotes nerve regeneration. These events must occur successfully to allow injured neurons to regenerate and re-innervate their original targets (Allodi et al., 2012).

Schwann cells (SCs) play a critical role in Wallerian degeneration (Bosse, 2012) and in the regeneration process (Namgung, 2014); when they lose contact with axons, after peripheral nerve injury, they have the capacity to modify their phenotype acquiring a “denerivated state”. Even though this state shares some of the features of an immature SC, it constitutes a different and unique cell type, the repair Schwann cell, with specific features at the biochemical and gene expression levels (Brosius Lutz and Barres, 2014; Jessen and Mirsky, 2016; Arthur-Farraj et al., 2012; Arthur-Farraj et al., 2017).

This change in phenotype is characterized by variations in the expression of several molecular markers (LeBlanc and Poduslo, 1990), such as the down-regulation of Krox-20, a transcription factor that is characteristic of a mature phenotype and necessary for transcription of myelin genes, and the upregulation of c-Jun, an inhibitor of the myelination program that collaborates in the dedifferentiation and proliferation of SCs (Parkinson et al., 2008). The regenerative process is highly dependent on SC migration to the injured site

*Corresponding authors. Address: Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Sant Cugat del Vallès, Spain (N. Casals). Department of Endocrine and Nervous System Pathophysiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain (C. Grijota-Martinez).

E-mail addresses: mpalomo@uic.es (M. Palomo-Guerrero), jmcosgaya@iib.uam.es (J. M. Cosgaya), alex.gella@uab.cat (A. Gella), ncasals@uic.es (N. Casals), cgrijota@iib.uam.es (C. Grijota-Martinez).

Abbreviations: dbcAMP, dibutyryl cyclic-AMP; DRG, dorsal root ganglia; Fsk, forskolin; NRG, neuregulin; SCs, Schwann cells; UTP, Uridine-5'-Triphosphate.

(Chen et al., 2007; Tseng et al., 2003) as well as on their special reorganization to establish the bands of Büngner, structures that act as substrates and guides for regenerating axons (Nangung, 2014; Gomez-Sanchez et al., 2017; Xiao et al., 2015). After axon regrowth, the association between SCs and axons must be re-established to promote SC differentiation and remyelination, thus completing the nerve regeneration process.

When neurons undergo traumatic injury, intracellular molecules, and among them nucleotides, are released to the extracellular milieu and many of them may act on the surrounding cells, promoting early cellular responses in the damaged area. It is generally accepted that nucleotides are involved in many pathophysiological responses (Franke et al., 2006; Pineau and Lacroix, 2009) and that the P2Y purinergic receptor signaling pathways are activated after cellular injury (Yang et al., 2004) and collaborate in cell migration and wound repair processes in response to injury in many cell types (Boucher et al., 2010; Jin et al., 2014; Klepeis et al., 2004; Silva et al., 2015). Uracil nucleotides bind to these specific membrane receptors in glial cells and growing evidence indicates that they could constitute some of the signaling molecules activated after peripheral nerve injury. Uridine-5'-triphosphate (UTP) has been shown to be involved in pain transmission mechanisms in neuropathic pain rat models (Andó et al., 2010; Li et al., 2014; Okada et al., 2002). Moreover, the extracellular concentration of UTP has been observed to be greatly enhanced after injury in several animal and cellular models (Lazarowski and Harden, 1999; Erlinge et al., 2005; Lazarowski et al., 1997). Recently, our group reported that UTP is able to induce changes in cytoskeleton morphology, increasing migration and promoting wound healing in a Schwannoma cell line (Lamarca et al., 2014; Martiáñez et al., 2012). The present study aims to look further into UTP actions on SCs, focusing on those processes that could have a special relevance in the peripheral nerve regeneration process. We used a model consisting of isolated primary SC cultures and cocultures with dorsal root ganglia (DRG) sensory neurons. First, we studied its effects on Krox-20 and c-Jun expression, two transcription factors involved in the control of the SCs development. Next, we tested whether UTP could modulate *in vitro* some of the mechanisms occurring in SCs after nerve injury, such as proliferation and migration. In addition, we investigated its effect on the activation of ErbB3 receptor by neuregulin (NRG), one of the most relevant mechanisms that control differentiation, proliferation, and myelination of SCs, as well as its effect on N-cadherin expression, an essential molecule in both the generation of the bands of Büngner and the re-establishment of contact between axons and SCs and, consequently, myelination. Finally, myelination was evaluated in the presence of UTP in a coculture model with DRG neurons. We found that the activity of UTP *in vitro* in isolated SCs or in coculture with DRG neurons seems to be directed towards the blockage of the differentiation signals and favoring a more migrating and "repair-SC" state.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Ethics statement

All experimental protocols were performed in accordance with EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and approved by the Ethics Committee of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (SAF2011-25,878) and the Research Ethics Committee of the Universitat Internacional de Catalunya (CBAS-2013-16).

Reagents

Uridine-5'-triphosphate (UTP; U6875) and dibutyryl cAMP (dbcAMP; D0627) were purchased from Sigma and used at 250 μ M and 1 mM, respectively. NRG (R&D Systems: 377HB050) was used at 10 ng/ml.

Primary SCs culture

Cells were obtained from neonatal rats as previously described (Brockes et al., 1979) using some modifications. Sprague–Dawley rats aged 0 to 4 postnatal days were used. Cells were obtained by mechanical and enzymatic methods (collagenase A from Roche; 10103578001) and plated onto polylysine-coated plates. Fibroblasts were eliminated in a 72-h treatment with AraC (C-1768, Sigma). After recovery from antimetabolic treatment, the cells were grown in DMEM supplemented with 3% fetal bovine serum (FBS), 5 μ M forskolin (Fsk), and 10 ng/ml NRG (Nrg; 377HB050, R&D Systems) and maintained at 37 °C with 5% CO₂. All experiments were performed with cultures with less than 4 passages. When serum deprivation was necessary, we maintained the cells for 12 h before treatments in a modified Sato medium (Bottenstein and Sato, 1979) consisting in DMEM-F12 (1:1), 20 nM progesterone (Sigma, P8783), 16 μ g/ml putrescin (Sigma, P5780), and a mixture of insulin, transferrin, and sodium selenite (ITS; Sigma, I3146).

DRG neurons culture

E15 embryos extracted from Sprague–Dawley rats were removed and placed in sterile L15 medium. The DRGs were cut from the spinal cord as close as possible to the ganglia, dissociated with trypsin, and plated on poly-L-lysine and laminin-precoated 6-well plates (5 ganglia per well). Non-neuronal cells were eliminated by adding 10 μ M fluorodeoxyuridine to the medium (2 cycles of three-days). Purified neurons were maintained in MEM supplemented with 10% FBS, 25 mM glucose, and 100 ng/ml nerve growth factor (NGF; Sigma, N0513).

Conditioned medium experiments

DRG neurons were maintained for 48 h in Sato medium with or without UTP to produce "UTP-conditioned medium" (UTP-CM) and "control-conditioned medium" (CCM) respectively. The conditioned media were collected and stored at –20 °C.

SCs were previously maintained in Sato medium for 12 h. After this period, the Sato medium was removed and conditioned medium from DRG neurons was added

directly to the SCs. To provide control samples, Sato medium that had not been in contact with axons, and previously stored at -20°C , was added.

SC/DRG coculture for N-cadherin study

Purified SCs were harvested by digestion for 10 min at 37°C with 0.05% trypsin in calcium-free and magnesium-free Hanks' Balanced Salt Solution containing 0.02% EDTA. After trypsinization, the cells were seeded onto neuronal cultures (2×10^4 SCs per well on a 6-well plate). UTP treatment for N-cadherin study was performed in Sato medium.

Myelinating SC/DRG cocultures

Myelinating cocultures were prepared using previously described methods (Latasa et al., 2010) involving small variations. DRGs were dissociated and plated onto Matrigel-coated 6-well plates and non-neuronal cells were eliminated by three 2-day cycles with a serum-free, N2- and fluorodeoxyuridine-containing medium ($10 \mu\text{M}$). NGF-dependent neurons were allowed to recover for 1 additional week before seeding $\approx 100,000$ freshly isolated SCs, which were purified by a 72-h cycle with AraC followed by Thy-1.1 antibody (Sigma)-mediated lysis of the fibroblasts, onto 3-week-old purified neural cultures of $\approx 50,000$ cells in SC-proliferating medium (DMEM/F12 supplemented with L-Gln, N2, 25 mM glucose, and 100 ng/ml NGF). On contact with the axons, SCs started to proliferate rapidly until the axons became fully populated (≈ 7 days later). The cultures were changed again to regular DRG media and, once the SCs ceased proliferation due to complete population of the cultures and the establishment of a one-to-one relationship with the axons, myelination was induced through the addition of ascorbic acid ($50 \mu\text{g/ml}$), which is necessary for the formation of the basal lamina, an absolute requirement for myelin formation.

Western blot analysis

Cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in RIPA buffer with proteases and phosphatase inhibitors. Total protein was quantified using the BCA protein assay kit (Pierce™). The protein samples ($10\text{--}20 \mu\text{g}$) were separated in SDS–polyacrylamide gels (BioRad) and transferred to PVDF or pure nitrocellulose (PROTRAN BA85, for myelin proteins) membranes. The membranes were blocked at RT for 1 h with 5% non-fat milk or 5% PhosphoBLOCKER™ blocking reagent (Cell Biolabs) when primary antibodies were directed against phosphorylated proteins. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in blocking solution with the following dilutions: mouse anti-N-cadherin, 1:1000 (610921; BD); rabbit anti-phospho-c-Jun, 1:650 (9261; Cell Signaling); rabbit anti-phospho-ErbB3, 1:1000 (4791; Cell Signaling); mouse anti- β -tubulin, 1:2000 (T5201; Sigma); mouse anti-GAPDH, 1:50,000 (AM4300; Applied Biosystems), mouse anti-MAG,

1:1000 (MAB1567, Chemicon; used under non-reducing conditions); and mouse anti-P0, 1:5000 (Astex).

Transwell migration assay

Migration was assessed by a transwell migration assay, which allows for a more direct quantification of migrating cells (Kramer et al., 2013). BD BioCoat cell culture inserts with 6.5-mm-diameter filters with an 8- μm pore size were used according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). The upper chamber was seeded with 2×10^5 SCs. Cells were treated with $250 \mu\text{M}$ UTP. At specific time points the remaining cells on the upper side were removed with a cotton swab. Inserts were washed twice with PBS and cells that had migrated to the lower side of the filter were fixed for 10 min with methanol. After fixation, cells were stained for 30 min with 0.2% crystal violet solution and examined under the light microscope at an objective magnification of $\times 10$. The number of migrated cells was counted for 6 fields per well with 4 wells per condition.

Proliferation assay

Estimation of cell number was performed by described methods (Gillies et al., 1986) with slight modifications. In short, 35,000 SCs per well were seeded in 24-well plates in regular SC medium. Twenty-four hours later the medium was removed and replaced by fresh media with the different treatments for the proliferation assay. After 72 h, cells were washed twice with PBS, fixed 5 min with methanol at -20°C and stained with 0.2% crystal violet in PBS for 20 min. After staining, wells were washed with PBS and allowed to dry. SCs were permeabilized with 1% SDS for the crystal violet dye extraction. The solution was transferred into a 96-well plate and absorbance at 595 nm was measured.

RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA from 6×10^5 cells was isolated using TRIZOL® reagent according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with NxGen®M-MuLV Reverse Transcriptase (Lucigen) and random primers, from $1 \mu\text{g}$ of total RNA. Quantitative real-time PCR was performed using the BioRad thermal cycler CFX96™ and the SSoAdvanced™ SYBR®Green Supermix (172-5261 BioRad). All PCR products were verified using melting curve analysis. Quantification was performed by the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ formula and normalized with the housekeeping gene GAPDH.

The sequence of the specific primers was GAPDH (NM_017008) forward: 5'-TGGGAAGCTGGTCATCAAC-3' and reverse: 5'-GCATCACCCATTTGATGTT-3'; Krox-20 (NM_053633) forward: 5'-CACTGTTTCTCC GAGTTCTG-3' and reverse: 5'-ACAGAGGACACTTG CAACAC-3'; c-Jun (NM_021835) forward: 5'-AAGAACA CAAAGCAGGGAGG-3' and reverse: 5'-GGGAGTT CATCCGCAATCTA-3'.

Statistical analysis

Data from a representative experiment of at least 3 independent experiments are shown. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 5.0 Software (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Results in the figures represent the mean \pm SEM. Levels of significance were expressed as * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, or non-significant (ns) after performing either a *t*-test or analysis of variance (ANOVA) with a Tukey's post-test.

RESULTS

UTP partially hinders the dbcAMP differentiation signal

SCs are a very plastic cell type and after peripheral nerve damage, when they lose contact with axons, they acquire a repair phenotype that supports axon regrowth and nerve regeneration. Since UTP is released during this process, we analyzed whether this nucleotide could have a direct effect on the differentiation stage of SCs in culture. We used a 250 μ M concentration of UTP to simulate the high concentration of nucleotides released after damage (Lazarowski and Harden, 1999; Elliott et al., 2009), a concentration that we have previously shown to be active *in vitro* without affecting cell viability (Lamarca et al., 2014; Martinez et al., 2013).

As a first approach, we studied whether the levels of Krox-20, the key transcription factor that controls the intrinsic SC developmental program inducing a more differentiating state, could be altered by a 72-h treatment with UTP in Sato medium in SC primary cultures. As shown in Fig. 1A (Control vs UTP), UTP did not affect Krox-20 basal expression at the mRNA level in these conditions. Based on the inability of UTP to change Krox-20 levels in this model, we tested whether the regulation of Krox-20 during the processes of either differentiation or dedifferentiation could be modulated in the presence of UTP. To induce differentiation, SCs were treated for 72 h with dbcAMP, a well-known axonal contact mimicker that induces SC differentiation in the absence of mitogens. As expected, this treatment resulted in a significant increase in the differentiation marker Krox-20. Interestingly, in the presence of UTP, the strong induction of Krox-20 by dbcAMP was significantly impaired (Fig. 1A; dbcAMP vs dbcAMP + UTP).

Next, we studied the effects of UTP in a model that mimicked SC dedifferentiation. When SCs are dissociated from neonatal nerves and plated in culture they undergo a spontaneous dedifferentiation due to the loss of axonal contact (Parkinson et al., 2008; Yang et al., 2012) characterized by the downregulation of myelin-related genes and the reactivation of a more immature-like phenotype. We tested this spontaneous dedifferentiation in the presence or absence of UTP (Fig. 1C).

As expected, 48 h after plating, Krox-20 mRNA levels fell by 50% (in relation to samples obtained 3 h after plating, when the cells had adhered to the plate). In this paradigm, Krox-20 downregulation was not affected by the presence of UTP.

Next, we decided to analyze the ability of UTP to regulate c-Jun, another transcription factor that controls the other major genetic pathway controlling SC physiology and differentiation status, which plays a key role keeping the SCs in a more undifferentiated state, participates in SC dedifferentiation in some pathological conditions, and presents a cross-antagonistic functional relationship with Krox-20 (Parkinson et al., 2008). UTP was not able to modulate c-Jun mRNA levels neither in resting SCs nor, surprisingly, when UTP was coadministered in the presence of the differentiating agent dbcAMP (Fig. 1B).

Although the c-Jun/Krox-20 antagonistic relationship is apparently independent on c-Jun phosphorylation status (Parkinson et al., 2008), we decided to investigate if UTP could modulate this characteristic both in resting conditions, as well as

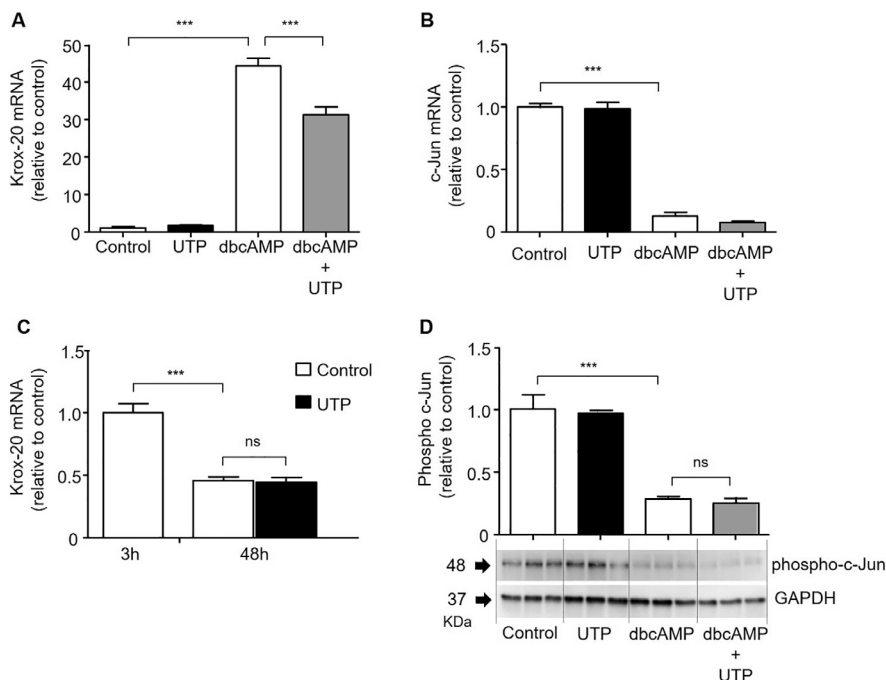


Fig. 1. Effects of UTP on SCs differentiation. (A, B) Primary SCs cultures maintained in Sato medium were induced to differentiate by dbcAMP treatment for 72 h and the effect of UTP on Krox-20 (A) and c-Jun (B) mRNA levels was analyzed by Q-RT-PCR. (C) Evaluation of the UTP effect on acutely denervated SCs. SCs were dissociated from rat sciatic nerves and plated in culture with Sato medium +/- UTP. Krox-20 mRNA expression was evaluated by Q-RT-PCR 3 h and 48 h after plating. The mean value of the control data at 3 h after plating is expressed as 1. (D) Primary SC cultures were induced to differentiate for 72 h with dbcAMP in the presence or absence of UTP and phospho-c-Jun protein was measured by western blot and normalized to GAPDH. The mean value of the control data is expressed as 1. * $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, and ns = non-significant was calculated by a Tukey's post-test after ANOVA analysis.

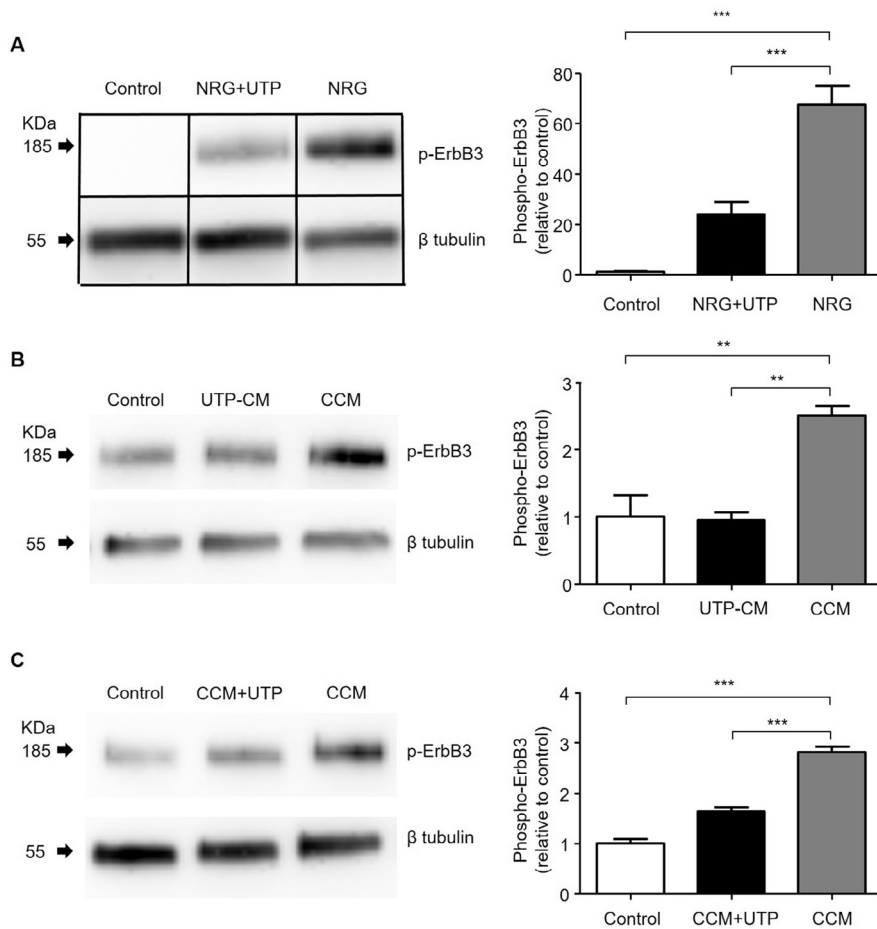


Fig. 2. UTP blocks NRG-dependent ErbB3 activation. SCs were maintained in Sato medium for 12 h before treatment. (A) SCs remained untreated (Control) or were treated with 10 ng/ml NRG for 6 h in the absence or presence of UTP (NRG and NRG + UTP, respectively). (B) SCs remained untreated (Control) or were treated for 6 h with control-conditioned medium (CCM) obtained from untreated DRG neurons or with conditioned medium obtained from DRG neurons cultured in the presence of UTP (UTP-CM). (C) SCs remained untreated (Control) or were treated for 6 h with control-conditioned medium from untreated DRG neurons, alone (CCM) or in combination with UTP (CCM + UTP). In every panel, the effect of treatment on the phosphorylation level of the ErbB3 receptor in SCs was evaluated by Western blot and data were normalized to β -tubulin and the mean value for control data is expressed as 1. The image in panel A shows a representative band for each treatment in the same gel. ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ was calculated by a Tukey's post-test after ANOVA analysis.

in the presence of dbcAMP. As expected, dbcAMP treatment produced a strong decrease in phospho-c-Jun protein levels, but the treatment with UTP was not able to produce any change on its abundance neither in resting conditions nor in the presence of the synthetic cAMP analog (Fig. 1D).

In short, UTP was only able to hamper Krox-20 upregulation in the presence of cAMP analogs, suggesting that it could play a role as a “brake” to maintain SCs in a more dedifferentiated state, although it does not seem to participate in the dedifferentiation process itself.

UTP blocks the activation of ErbB3 receptor by NRG

On top of their intrinsic genetic program, *in vivo*, SC behavior is regulated primarily by instructive signals coming from the axon and, among them, some of the

most relevant are mediated by NRGs, a family of proteins that play a key role in the physiology of SCs and signal mainly through the ErbB2/ ErbB3 receptors. NRGs are not only essential during the development of the peripheral nervous system, but also, according to growing evidence, during nerve repair after injury.

To analyze whether UTP exerts some action on NRG signaling, isolated SCs were maintained in a serum- and mitogen-free medium (Sato medium) for 12 h, and after this period they were treated with 10 ng/ml of the extracellular domain (ECD) of the neuregulin HRG1- β 1 for 6 h in the presence or absence of UTP. As shown in Fig. 2A, HRG1- β 1 ECD was able to induce a strong ErbB3 phosphorylation and, in the presence of UTP, ErbB3 activation was strongly impaired.

NRGs are a complex family of proteins with multiple isoforms. To determine if the observed effect of UTP on ErbB3 activation was a general response or a response to the specific neuregulin used, we selected a more physiological model in which SCs were exposed to conditioned media from DRG neurons to simulate paracrine signaling. DRG neurons were cultured in the presence or absence of UTP and after 48 h the conditioned media were collected and added to isolated SC cultures. Control DRG neuron-conditioned medium (CCM) produced an increase in phosphorylation of the ErbB3 receptor in SCs after 6 h, which was abolished when the DRG neurons were grown in the presence of UTP (UTP-CM) (Fig. 2B). This result

seems to corroborate that UTP is able to impede general ErbB3 activation by neuregulins. Alternatively, UTP could be producing a reduction in the amount of soluble NRG or another unknown factor produced by the DRG neurons instead of acting in a direct fashion on SCs. To clarify this question, the studies were repeated without treating DRG neurons with UTP. Instead, UTP was directly added to the SC culture together with the CCM (CCM + UTP) and we obtained similar results (Fig. 2C), indicating that, indeed, UTP can negatively modulate ErbB3 phosphorylation in a direct fashion in SC culture.

The UTP effect on N-cadherin expression

N-cadherin is a cell–cell adhesion protein that mediates SC–SC and SC–axon interactions during the development of the peripheral nervous system and in

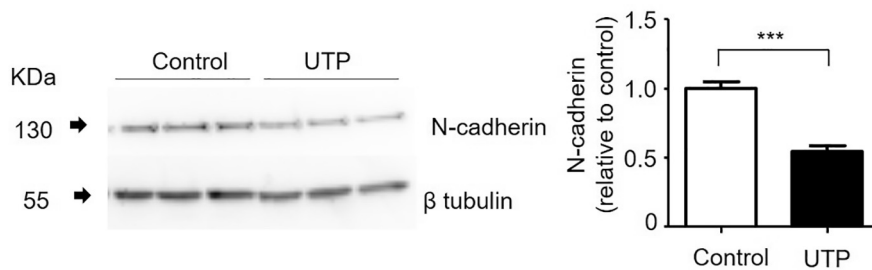


Fig. 3. UTP blocks N-cadherin recovery after contact between SCs and axons. Cultured SCs were harvested with trypsin in the absence of calcium and magnesium to digest N-cadherin from the cellular surface. They were immediately added into a DRG neuron culture. The coculture was maintained for 48h in the absence (Control) or presence of UTP. N-cadherin protein expression was evaluated by Western blot and normalized to β -tubulin. The mean value for control data is expressed as 1. *** $P \leq 0.001$ calculated by a *t*-test.

nerve repair. To investigate the potential role of UTP in SC-axon adhesion, we used a glial/neuronal coculture model to simulate axon-SC recontact, which takes place during the last stages of nerve regeneration. SCs were harvested with trypsin using traditional methods in the absence of calcium and magnesium. This harvesting protocol digests N-cadherin from the cellular surface prior to adding them to DRG neuron cultures (Wanner and Wood, 2002). We studied N-cadherin recovery after

48 h of coculture and found that in the presence of UTP, its expression was not completely recovered (Fig. 3), suggesting less interaction between SCs and axons.

The UTP effect on SC migration

We studied *in vitro* the UTP effect on proliferation and migration of SCs, two events that take place during the early stages of damage repair. We used a Boyden chamber assay to study the migratory ability of SCs. In the presence of UTP they showed an increased migration rate that was statistically significant after 6 h of treatment (Fig. 4).

To test the effect of UTP on proliferation and, at the same time, rule out a potential relationship between enhanced migration and an increase in cell number, SC growth was estimated using crystal violet nuclear staining after 72 h of treatment (Gillies et al., 1986). We tested the UTP effect in non-proliferative medium with 1% FBS (to rule out potential cell death in the complete absence of serum) and in a proliferative environment containing 10% FBS, in both cases in the presence or absence of Fsk, a synergistic agent of mitogens and growth factors, to promote SC proliferation (Iacovelli et al., 2007). As expected, SC number was higher in the presence of 10% serum, and Fsk was observed to synergistically increase this proliferation rate, reaching a value closer to one of the most potent mitogenic combinations for SCs: 10% serum + NRG + Fsk. In all instances, UTP did not affect the proliferation rate of SCs, whether alone or in combination with 10% serum and/or Fsk (Fig. 5).

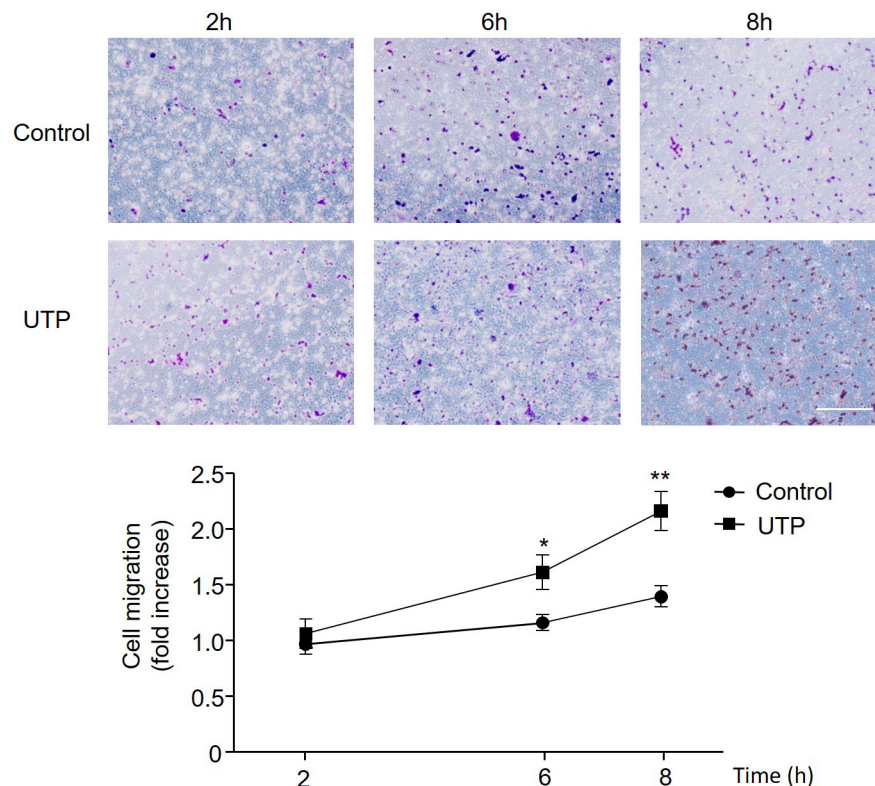


Fig. 4. UTP promotes SC migration. To evaluate the effect of UTP on SC migration, a Transwell migration assay was performed by seeding the cells on the upper side of the membrane in the absence (Control) or presence of UTP. At the indicated time points, the migrating cells were stained with crystal violet and counted under the light microscope (objective magnification $\times 10$; scale bar 200 μ m). The mean value for the control cell number at 2 h is expressed as 1. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ calculated by a *t*-test.

The UTP effect on myelin formation

We decided to analyze whether UTP could have any effect on myelin formation in a coculture model. SCs were seeded onto purified DRG sensory neurons and, after allowing the SCs to proliferate and completely cover and ensheath the axons, myelination was started adding ascorbic acid. The process was allowed to proceed for 7 days in the continuous presence or absence of UTP before the myelin content was measured using Western blot to determine the accumulation of the myelin proteins MAG and P0. In the presence of UTP there was a non-

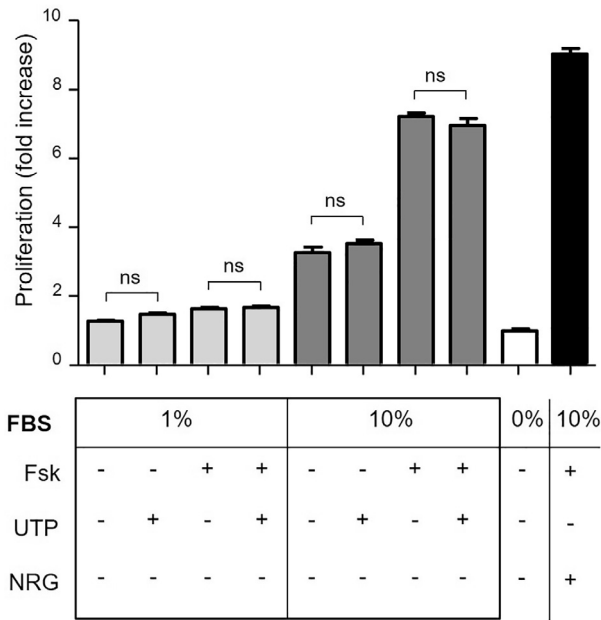


Fig. 5. UTP does not affect the proliferation rate of SCs. SC proliferation was evaluated in different culture media and treatments. A basic non-proliferative medium with 1% fetal bovine serum (FBS) and a proliferative medium containing 10% FBS were used. The UTP effect was evaluated in these media, both alone and in combination with Fsk. As a positive control, cells were treated with 10% FBS + NRG + Fsk. Proliferation was evaluated after 72 h of treatment by crystal violet staining and absorbance measurement. The mean absorbance values under 0% FBS conditions are expressed as 1. ns = non-significant calculated by a Tukey's post-test after ANOVA analysis.

significant tendency showing reduced MAG and P0 protein levels (Fig. 6).

DISCUSSION

Any injury in the peripheral nerve causing damage to the plasma membrane will result in the release of intracellular molecules to the extracellular space. Nucleotides are present in the normal content of a cell and are known to have physiological actions. Our previous findings (Lamarca et al., 2014), together with

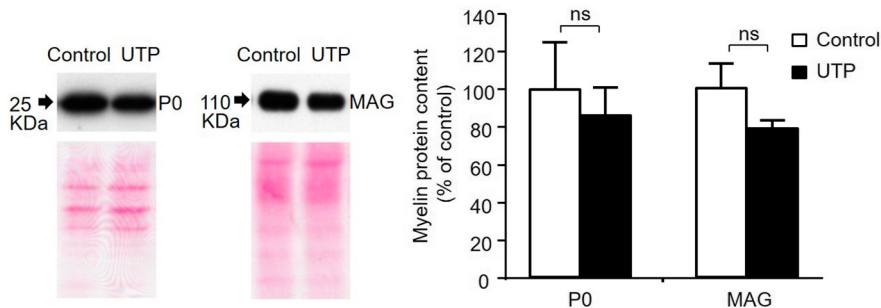


Fig. 6. UTP does not significantly affect myelin formation. Purified SCs were added into DRG neuron cultures. After a period of proliferation and axon ensheathment, myelination was induced by ascorbic acid addition in the presence and absence of UTP. Myelin content was evaluated 7 days later by measuring P0 and MAG protein expression by Western blot. Total protein content was estimated by Ponceau staining. The mean value for control data is expressed as 100%. ns = non-significant calculated by a t-test.

the fact that extracellular UTP concentration is increased after several stimuli and in pathologic situations such as injury or inflammation (Lazarowski and Harden, 1999; Lazarowski et al., 2003), suggest that UTP may play an additional role as a modulator of SC behavior during peripheral nerve regeneration. This study aimed to determine whether UTP could affect the behavior of cultured SCs in some key aspects such as differentiation, proliferation, migration or myelination.

UTP alone was unable to cause any change in gene expression in the key transcription factors Krox-20 and c-Jun in a model of isolated SCs. In culture, these cells more closely resemble denervated SCs because they have been previously separated from axons, plated, and treated with mitogens. This result suggests that, once dedifferentiated, the SC phenotype is not modified in the presence of UTP.

Additionally, the lack of effect immediately after dissociation and plating of SCs on Krox-20 downregulation suggests that UTP does not affect the process of dedifferentiation after losing contact with axons either. These results indicate that UTP does not seem to participate in the phenotypic changes that occur after denervation. However, our results suggest that UTP could play a role as a brake to SC redifferentiation in response to mimickers of the main axon-derived instructive signals, as evidenced by a decrease in the cAMP-dependent upregulation of Krox-20, as well as by a blunted NRG response.

This effect on Krox-20 expression, seems to be specific for this transcription factor rather than a general blockage of cAMP pathways, since we have shown that UTP was not able to abolish the proliferative effect of Fsk, a mitotic agent that acts by increasing cAMP levels. However, it should be noted that proliferative and differentiation signals have been shown to activate different cAMP effectors (Bacallao and Monje, 2013) and therefore we cannot rule out that UTP action could be restricted to a specific pathway downstream cAMP or that UTP-dependent inhibition of Krox-20 could be carried out through other pathways rather than through cAMP effectors.

One of the most relevant findings in the present study is the effect of UTP on the NRG pathway through the ErbB3 receptor. NRG is known to be one of the master regulators of SC physiology, controlling multiple aspects, such as survival, migration, proliferation, and myelination. It is also well known that after peripheral nerve injury there is an upregulation of NRG-1 related to the regeneration process (Carroll et al., 1997; Cohen et al., 1992; Kwon et al., 1997). In fact, together with the increase in intracellular cAMP due to the activation of the G-protein coupled receptor Gpr126 (Monk et al., 2009), it is considered as one other major axon-derived instructive signals controlling SC behavior.

UTP action on cultured SCs

Role of SCs on peripheral nerve regeneration

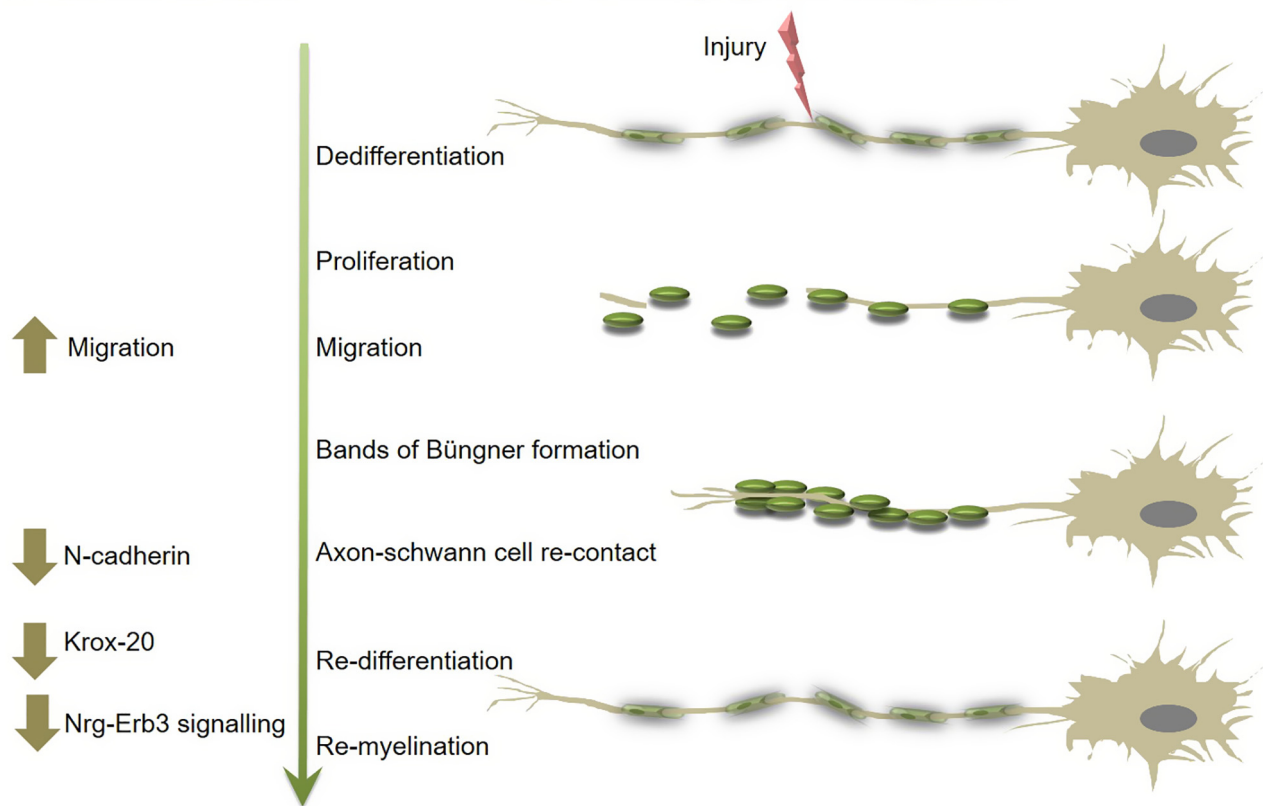


Fig. 7. Overview of UTP effects on SCs behavior in culture: potential relevance *in vivo*. Neither the acquisition of a denervated phenotype nor the proliferation rate of SCs was modulated in isolated SCs *in vitro* in the presence of UTP, two important events that take place shortly after injury. Migration of SCs in culture was increased by UTP, which could be relevant to promote SCs migration through the injured area after damage. UTP also decreased N-cadherin recovery during SC-axon contact, an essential process for axon guidance and SC redifferentiation. This potential effect in the redifferentiation process is also supported by the observation that Krox-20 increase in the presence of differentiation signals such as dbcAMP was strongly impaired by UTP. Moreover, UTP diminished the activation of ErbB3 receptor by NRG in SCs, which could hamper axonal Nrg1 signaling and contribute to the impairment of the SC redifferentiation process and, consequently, that of myelination.

In our model, the activation of ErbB3 in SCs after the addition of NRG is strongly inhibited in the presence of UTP. The relevance of this data is evident, given the central regulatory role of NRG in the regeneration process. However, the exact meaning and the exact molecular NRG-dependent mechanisms that can be affected in the presence of UTP is unknown, due to the extreme complexity of all the existing NRG isoforms. Stassart and collaborators described a different role for axonal and SC-derived NRG1 during the regeneration process (Stassart et al., 2013): after injury, the temporary loss of juxtacrine signaling from axonal NRG (NRG-1 type III) during the first hours causes NRG-1 type I to be upregulated in SCs, which will be responsible for the first events in Wallerian degeneration in an autocrine or paracrine manner, controlling SC behavior and its dedifferentiation and, ultimately, also promoting remyelination. On the other hand, axonal NRG1 seems to play a later role in the redifferentiation and remyelination processes, when the contact between axons and SCs is re-established. Although our results only demonstrate the inhibitory activity of UTP on soluble (type I and II) NRG1-ErbB3 signaling, in a coculture model, in which NRG1 type III signaling should therefore be active, preliminary results

from our laboratory indicate that UTP can also partially prevent phosphorylation of the ErbB3 receptor by these isoform. The regulation of the different isoforms of NRG and their different ErbB receptors in a model of nerve damage *in vivo* has been recently described at the mRNA and protein level (Ronchi et al., 2016), showing that each isoform is specifically regulated during the different phases after peripheral nerve damage. Interestingly, the authors found a strong decrease of ErbB receptors at the protein level during the first days after injury, which do not recover until a few days later, when the axonal regrowth in the damaged nerve starts. In that sense, the release of UTP by the damaged cells is also an early event that could be contributing to the blockade of the NRG/ErbB signaling during the early phases of Wallerian degeneration.

To study one of the physiological effects of UTP in SCs with potential implications in the process of regeneration, we decided to study its influence on N-cadherin expression. This molecule plays a critical role during the development of the peripheral nervous system and its expression decreases as precursors differentiate into mature SCs and the myelination program starts (Corell et al., 2010), but after damage its

expression is recovered (Shibuya et al., 1995; Squitti et al., 1999; Thornton et al., 2005) and it is considered essential for a proper repair in two principal ways: initially, by mediating SC-SC unions necessary for establishing the bands of Büngner, a structure that will guide axonal regrowth, and later for subsequent SC-axon recontact (Wanner and Wood, 2002; Arthur-Farraj et al., 2012). When SCs are added to a DRG neuron culture, they acquire a bipolar morphology, extending their processes along the axons. This phenomenon is evident within the first hours of coculture, and N-cadherin expression at SC-axon contacts has been shown to be necessary for proper alignment (Wanner and Wood, 2002). The results of the present study show that N-cadherin expression is impaired in the presence of UTP. Although further studies would be required to discern between a lack of recovery of glial N-cadherin or a reduction in neuronal N-cadherin, our findings suggest that the correct axon-SC contact and alignment could be negatively affected by the presence of UTP.

Myelination in the peripheral nervous system has been shown to be a process highly dependent of NRG signaling (Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005), as well as of cAMP pathways *in vitro* (Bacallao and Monje, 2015; Monje et al., 2009; Parkinson et al., 2008; Yoon et al., 2008) and *in vivo* (Mogha et al., 2013), being Krox-20 the main transcriptional regulator of myelin genes in SCs. However, although we observed a tendency toward a small reduction in myelin protein accumulation, which could be potentially explained mostly by the partial block in NRG/ErbB3 signaling we describe in the present work, UTP did not appear to remarkably affect myelin formation.

Interestingly, UTP was able to enhance the migratory behavior of SCs, similarly to what has been described for several neural cells in the central nervous system (Neary and Zimmermann, 2009). Although the exact cues and mechanisms that regulate SC migration after nerve damage have not been adequately elucidated yet, some evidence indicates that this process is highly dependent on both the interaction of SCs with the fibroblasts that accumulate in the injured area as well as a fine regulation of N-cadherin expression and localization within the cell (Parrinello et al., 2010). We have shown here and in previous works (Martínez et al., 2013) that N-cadherin expression is modulated by UTP in several experimental models. The N-cadherin regulatory capacity of UTP therefore might somehow participate in the increased migration observed and it would be interesting to study this regulation in a more physiological model of nerve damage.

In summary, our findings indicate that UTP administration *in vitro* favors the maintenance of a denervated state of SCs by blocking the two main axon-derived signaling pathways, reducing the cAMP-dependent upregulation of Krox-20 and limiting NRG signaling through ErbB3 receptor. UTP also prevents the expression of N-cadherin at SC-axon contacts and promotes a more pro-migratory undifferentiated phenotype. By virtue of the implications of all these processes in the peripheral nerve regeneration, the present results highlight the importance of further

investigating the potential role of UTP on Schwann cell throughout the regeneration process *in vivo* (Fig. 7).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Ferrer S.A. (Barcelona, Spain) and by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad – Plan Nacional de I+D+i (grant number SAF2011-25878 awarded to JMC). The funders had no role in study design, data collection, analysis and interpretation, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Allodi I, Udina E, Navarro X (2012) Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol* 98:16–37.
- Andó RD, Méhész B, Gyires K, Illes P, Sperlágh B (2010) A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 159:1106–1117.
- Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, Quintes S, Chabrol E, Banerjee A, Woodhoo A, Jenkins B, Rahman M, Turmaine M, Wicher GK, Mitter R, Greensmith L, Behrens A, Raivich G, Mirsky R, Jessen KR (2012) C-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron* 2012:633–647. Elsevier Inc, United States.
- Arthur-Farraj PJ, Morgan CC, Adamowicz M, Gomez-Sanchez JA, Fazal SV, Beucher A, Razzaghi B, Mirsky R, Jessen KR, Aitman TJ (2017) Changes in the coding and non-coding transcriptome and DNA methylome that define the Schwann cell repair phenotype after nerve injury. *Cell Rep* 20:2719–2734.
- Bacallao K, Monje PV (2013) Opposing roles of PKA and EPAC in the cAMP-dependent regulation of schwann cell proliferation and differentiation [corrected]. *PLoS ONE* 8:e82354.
- Bacallao K, Monje PV (2015) Requirement of cAMP signaling for Schwann cell differentiation restricts the onset of myelination. *PLoS ONE* 10:e0116948.
- Bosse F (2012) Extrinsic cellular and molecular mediators of peripheral axonal regeneration. *Cell Tissue Res* 349:5–14.
- Bottenstein JE, Sato GH (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:514–517.
- Boucher I, Rich C, Lee A, Marcincin M, Trinkaus-Randall V (2010) The P2Y2 receptor mediates the epithelial injury response and cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C411–421.
- Brockes JP, Fields KL, Raff MC (1979) Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* 165:105–118.
- Brosius Lutz A, Barres BA (2014) Contrasting the glial response to axon injury in the central and peripheral nervous systems. *Dev Cell* 28:7–17.
- Carroll SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS, Corbett JA (1997) Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 17:1642–1659.
- Chen ZL, Yu WM, Strickland S (2007) Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci* 30:209–233.
- Cohen JA, Yachnis AT, Arai M, Davis JG, Scherer SS (1992) Expression of the neu proto-oncogene by Schwann cells during peripheral nerve development and Wallerian degeneration. *J Neurosci Res* 31:622–634.
- Corell M, Wicher G, Limbach C, Kilimann MW, Colman DR, Fex Svenningsen Å (2010) Spatiotemporal distribution and function of N-cadherin in postnatal Schwann cells: a matter of adhesion? *J Neurosci Res* 88:2338–2349.
- Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ,

- Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461:282–286.
- Erlinge D, Harnek J, van Heusden C, Olivecrona G, Jern S, Lazarowski E (2005) Uridine triphosphate (UTP) is released during cardiac ischemia. *Int J Cardiol*, Ireland:427–433.
- Franke H, Krügel U, Illes P (2006) P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch* 452:622–644.
- Gillies RJ, Didier N, Denton M (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 159:109–113.
- Gomez-Sanchez JA, Pilch KS, van der Lans M, Fazal SV, Benito C, Wagstaff LJ, Mirsky R, Jessen KR (2017) After nerve injury, lineage tracing shows that myelin and remak schwann cells elongate extensively and branch to form repair Schwann cells, which shorten radically on remyelination. *J Neurosci* 37:9086–9099.
- Iacovelli J, Lopera J, Bott M, Baldwin E, Khaled A, Uddin N, Fernandez-Valle C (2007) Serum and forskolin cooperate to promote G1 progression in Schwann cells by differentially regulating cyclin D1, cyclin E1, and p27Kip expression. *Glia* 55:1638–1647.
- Jessen KR, Mirsky R (2016) The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol* 594:3521–3531.
- Jin H, Seo J, Eun SY, Joo YN, Park SW, Lee JH, Chang KC, Kim HJ (2014) P2Y2 R activation by nucleotides promotes skin wound-healing process. *Exp Dermatol* 23:480–485.
- Klepeis VE, Weinger I, Kaczmarek E, Trinkaus-Randall V (2004) P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *J Cell Biochem* 93:1115–1133.
- Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, Dolznig H (2013) In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res* 752:10–24.
- Kwon YK, Bhattacharyya A, Alberta JA, Giannobile WV, Cheon K, Stiles CD, Pomeroy SL (1997) Activation of ErbB2 during wallerian degeneration of sciatic nerve. *J Neurosci* 17:8293–8299.
- Lamarca A, Gella A, Martiáñez T, Segura M, Figueiro-Silva J, Grijota-Martinez C, Trullas R, Casals N (2014) Uridine 5'-triphosphate promotes in vitro Schwannoma cell migration through matrix metalloproteinase-2 activation. *PLoS ONE* 9:e98998.
- Latasa MJ, Ituero M, Moran-Gonzalez A, Aranda A, Cosgaya JM (2010) Retinoic acid regulates myelin formation in the peripheral nervous system. *Glia* 58:1451–1464.
- Lazarowski ER, Harden TK (1999) Quantitation of extracellular UTP using a sensitive enzymatic assay. *Br J Pharmacol* 127:1272–1278.
- Lazarowski ER, Homolya L, Boucher RC, Harden TK (1997) Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *J Biol Chem* 272:24348–24354.
- Lazarowski ER, Shea DA, Boucher RC, Harden TK (2003) Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. *Mol Pharmacol* 63:1190–1197.
- LeBlanc AC, Poduslo JF (1990) Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve. *J Neurosci Res* 26:317–326.
- Li N, Lu ZY, Yu LH, Burnstock G, Deng XM, Ma B (2014) Inhibition of G protein-coupled P2Y2 receptor induced analgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Mol Pain* 10:21.
- Martiáñez T, Carrascal M, Lamarca A, Segura M, Durany N, Masgrau R, Abian J, Gella A (2012) UTP affects the Schwannoma cell line proteome through P2Y receptors leading to cytoskeletal reorganisation. *Proteomics* 12:145–156.
- Martiáñez T, Lamarca A, Casals N, Gella A (2013) N-cadherin expression is regulated by UTP in schwannoma cells. *Purinergic Signal* 9:259–270.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700–703.
- Mogha A, Benesh AE, Patra C, Engel FB, Schöneberg T, Liebscher I, Monk KR (2013) Gpr126 functions in Schwann cells to control differentiation and myelination via G-protein activation. *J Neurosci* 33:17976–17985.
- Monje PV, Rendon S, Athauda G, Bates M, Wood PM, Bunge MB (2009) Non-antagonistic relationship between mitogenic factors and cAMP in adult Schwann cell re-differentiation. *Glia* 57:947–961.
- Monk KR, Naylor SG, Glenn TD, Mercurio S, Perlin JR, Dominguez C, Moens CB, Talbot WS (2009) A G protein-coupled receptor is essential for Schwann cells to initiate myelination. *Science* 325:1402–1405.
- Namgung U (2014) The role of schwann cell-axon interaction in peripheral nerve regeneration. *Cells Tissues Organs*:6–12. Switzerland.
- Neary JT, Zimmermann H (2009) Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. *Trends Neurosci* 32:189–198.
- Okada M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M (2002) Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J Pharmacol Exp Ther* 303:66–73.
- Parkinson DB, Bhaskaran A, Arthur-Farraj P, Noon LA, Woodhoo A, Lloyd AC, Feltri ML, Wrabetz L, Behrens A, Mirsky R, Jessen KR (2008) C-Jun is a negative regulator of myelination. *J Cell Biol* 181:625–637.
- Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, Wingfield Digby P, Fedorova M, Parkinson DB, Doddrell RD, Nakayama M, Adams RH, Lloyd AC (2010) EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell* 2010:145–155. Elsevier Inc, United States.
- Pineau I, Lacroix S (2009) Endogenous signals initiating inflammation in the injured nervous system. *Glia* 57:351–361.
- Ronchi G, Haastert-Talini K, Fornasari BE, Perroteau I, Geuna S, Gambarotta G (2016) The Neuregulin1/ErbB system is selectively regulated during peripheral nerve degeneration and regeneration. *Eur J Neurosci* 43:351–364.
- Shibuya Y, Mizoguchi A, Takeichi M, Shimada K, Ide C (1995) Localization of N-cadherin in the normal and regenerating nerve fibers of the chicken peripheral nervous system. *Neuroscience* 67:253–261.
- Silva TM, França GR, Ornelas IM, Loiola EC, Ulrich H, Ventura AL (2015) Involvement of nucleotides in glial growth following scratch injury in avian retinal cell monolayer cultures. *Purinergic Signal* 11:183–201.
- Squitti R, De Stefano ME, Edgar D, Toschi G (1999) Effects of axotomy on the expression and ultrastructural localization of N-cadherin and neural cell adhesion molecule in the quail ciliary ganglion: an in vivo model of neuroplasticity. *Neuroscience* 91:707–722.
- Stassart RM, Fledrich R, Velanac V, Brinkmann BG, Schwab MH, Meijer D, Sereda MW, Nave KA (2013) A role for Schwann cell-derived neuregulin-1 in remyelination. *Nat Neurosci* 16:48–54.
- Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL (2005) Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47:681–694.
- Thornton MR, Mantovani C, Birchall MA, Terenghi G (2005) Quantification of N-CAM and N-cadherin expression in axotomized and crushed rat sciatic nerve. *J Anat*, England:69–78.
- Tseng CY, Hu G, Ambron RT, Chiu DT (2003) Histologic analysis of Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration in the autogenous venous nerve conduit (AVNC). *J Reconstr Microsurg* 19:331–340.
- Wanner IB, Wood PM (2002) N-cadherin mediates axon-aligned process growth and cell-cell interaction in rat Schwann cells. *J Neurosci* 22:4066–4079.
- Xiao Y, Faucher A, Pola-Morell L, Heddleston JM, Liu TL, Chew TL, Sato F, Sehara-Fujisawa A, Kawakami K, López-Schier H (2015) High-resolution live imaging reveals axon-glia interactions during peripheral nerve injury and repair in zebrafish. *Dis Model Mech* 8:553–564.
- Yang DP, Kim J, Syed N, Tung YJ, Bhaskaran A, Mindos T, Mirsky R, Jessen KR, Maurel P, Parkinson DB, Kim HA (2012) P38 MAPK

- activation promotes denervated Schwann cell phenotype and functions as a negative regulator of Schwann cell differentiation and myelination. *J Neurosci* 32:7158–7168.
- Yang L, Cranson D, Trinkaus-Randall V (2004) Cellular injury induces activation of MAPK via P2Y receptors. *J Cell Biochem* 91:938–950.
- Yoon C, Korade Z, Carter BD (2008) Protein kinase A-induced phosphorylation of the p53 subunit of nuclear factor-kappaB promotes Schwann cell differentiation into a myelinating phenotype. *J Neurosci* 28:3738–3746.

(Received 15 November 2017, Accepted 3 January 2018)
(Available online 11 January 2018)