

**Galván, Cristian Ariel**

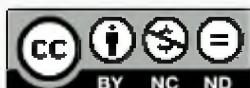
# Relevancia de los rafts en la polaridad neuronal e implicancias de sus alteraciones en la enfermedad de Niemann-Pick tipo A

---

**Tesis para la obtención del título de posgrado de  
Doctor en Bioquímica**

Director: Ledesma Muñoz, María Dolores

Documento disponible para su consulta y descarga en **Biblioteca Digital - Producción Académica**, repositorio institucional de la **Universidad Católica de Córdoba**, gestionado por el **Sistema de Bibliotecas de la UCC**.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.

Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5



UNIVERSIDAD CATOLICA DE CORDOBA

*Universidad jesuita*

Facultad de Ciencias Químicas

**“Relevancia de los rafts en la polaridad neuronal  
e implicancias de sus alteraciones en la  
enfermedad de Niemann-Pick tipo A”**

Tesis para optar al título de Doctor en Bioquímica de la  
Universidad Católica de Córdoba

**Bioq. Cristian Ariel Galván**

Córdoba, 2014

## **Director de Tesis**

*PhD. María Dolores Ledesma Muñoz*

Científico Titular / Jefe de grupo

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), España

## **Co-Director de Tesis**

*PhD. Dante Miguel Beltramo*

Profesor Titular de la Cátedra de Biotecnología

Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba

Investigador Principal del CONICET, Argentina

Investigador Principal del CEPROCOR, Argentina

## **Comisión de Tesis**

*PhD. Gabriela Paglini*

*PhD. Gustavo Baiardi*

*PhD. Roxana Cano*

## **Lugares de Trabajo**

Cavalieri Ottolenghi Scientific Institute, Università degli Studi di Torino, A.O. San

Luigi Gonzaga, Regione Gonzole 10, 10043 Orbassano (Torino), Italia.

Cátedra de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas,

Universidad Católica de Córdoba.

Parte de este trabajo de tesis ha sido financiado por una beca de posgrado otorgada por la Universidad Católica de Córdoba.

*Esta Tesis está dedicada  
a mis queridos Padres  
y a mi amada Familia.*

“Cada logro es un volver a empezar.  
Bendito cada comienzo que nos abre oportunidades  
para comunicarnos y poder interactuar.  
Muchas gracias a ese mundo de personas,  
que en el curso de mi vida y en cada etapa concluida,  
me empujaron a volver a empezar.”

Los quiero mucho

**CRISTIAN ARIEL GALVÁN**

# RESUMEN

## **Relevancia de los rafts en la polaridad neuronal e implicancias de sus alteraciones en la enfermedad de Niemann-Pick tipo A**

Una de las principales características de las neuronas es su extremada polaridad. La diferenciación tanto morfológica como molecular de axones y dendritas es necesaria para la función neuronal. Defectos en esta diferenciación pueden contribuir a la patología de distintas enfermedades neurológicas. Sin embargo, los mecanismos que establecen y mantienen la polaridad neuronal y sus implicancias patológicas no están completamente resueltos. En esta tesis doctoral, nos hemos centrado en investigar la contribución a la polaridad neuronal de los dominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, los llamados rafts. Describimos que los rafts son esenciales para la distribución axonal de moléculas como la proteína del Prion (PrP<sup>C</sup>) o el gangliósido GM1 en neuronas hipocampales maduras y analizamos la contribución a este proceso de sus componentes lipídicos mayoritarios: el colesterol y los esfingolípidos. Los estudios realizados apuntan al control de la endocitosis dendrítica como factor clave para la polarización axonal de moléculas de rafts. Además, caracterizamos las alteraciones de los rafts en el cerebro y neuronas de un modelo murino para la enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA). La actividad deficiente de la esfingomielinidasa ácida (ASM), que causa la

enfermedad, lleva a la acumulación de la esfingomielina (SM) en la membrana plasmática neuronal. Demostramos que al alterar los rafts esta acumulación reduce la endocitosis dendrítica de moléculas como PrP<sup>C</sup> y GM1 impidiendo la unión a membrana de la GTPasa RhoA. Esto tiene como consecuencia la distribución no polarizada de estas moléculas que aparecen de forma anómala en las dendritas de neuronas de ratones ASMko. La modulación experimental de los niveles de SM promueve o previene este fenotipo. En conjunto, los resultados obtenidos aportan información sobre los mecanismos de polaridad neuronal y sugieren que defectos en la polaridad pueden jugar un relevante papel patológico en NPA.

**Palabras clave:** rafts, polaridad neuronal, esfingomielina, endocitosis, Niemann-Pick Tipo A.



# SUMMARY

## **Relevance of rafts in neuronal polarity and implications of raft alterations in Niemann-Pick disease type A**

One of the main characteristics of neurons is their extreme polarity. Morphological and molecular differentiation of axons and dendrites are necessary for neuronal function. Defects in this differentiation may contribute to the pathology of neurological diseases. However, the mechanisms by which polarity is established and maintained and the pathological implications of polarity defects are not completely understood. In this PhD work we have analyzed the contribution to neuronal polarity of membrane domains enriched in cholesterol and sphingolipids, the so called rafts. We describe that rafts are required for the axonal distribution of molecules such as the Prion protein (PrP<sup>C</sup>) and the ganglioside GM1 in mature hippocampal neurons. We have analyzed the contribution to the process of the two main lipid components of rafts: cholesterol and sphingolipids. Our studies indicate that the control of dendritic endocytosis is a key event for raft molecule polarization. Moreover, we have characterized raft alterations in the brain and neurons of a mouse model for Niemann-Pick disease type A (NPA). Deficient activity of the acid sphingomyelinase (ASM), which causes the disease, leads to sphingomyelin (SM) accumulation at the plasma membrane of neurons. We demonstrate that, through raft alteration, this

accumulation impairs dendritic endocytosis of PrP<sup>C</sup> and GM1 preventing the binding to the membrane of the small GTPase RhoA. This, in turn, leads to the unpolarized distribution of these molecules that remain in dendrites of ASMko neurons. Experimental modulation of SM levels promotes or prevents these defects. Altogether the results obtained bring information on neuronal polarity mechanisms and suggest that defects on them play a relevant pathological role in NPA.

**Key words:** rafts, neuronal polarity, sphingomyelin, endocytosis, Niemann-Pick type A.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	—
<b>RESUMEN</b>	—
<b>SUMMARY</b>	—

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 La membrana celular: Breve introducción a un sistema dinámico y complejo	1
1.2 Composición de la membrana plasmática celular	3
1.2.1 Bicapa lipídica	4
1.2.2 Componentes lipídicos	5
1.2.3 Componentes proteicos	8
1.2.4 Componentes glucídicos	10
1.3 Microdominios de membrana: Balsas lipídicas (Rafts) como estructuras de membrana altamente organizadas	11
1.4 Importancia de los rafts en el desarrollo neuronal	15
1.5 Niemann-Pick Tipo A: “Un ejemplo de enfermedad neurológica causada por alteraciones en el metabolismo de lípidos	19

<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
---------------------------------	-----------

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
--------------------------------	-----------

3.1 Modelo experimental murino	25
3.2 Reactivos y anticuerpos	26
3.3 Cultivos celulares: Cultivo primario de neuronas hipocampales provenientes de rata y ratón	28
3.4 Estudios realizados con neuronas hipocampales de rata	31
3.4.1 Purificación de rafts usando Triton X-100	31
3.4.2 Purificación de rafts por sonicación	32

3.4.3	Reducción de colesterol	32
3.4.4	Reducción de Esfingolípidos	32
3.4.5	Análisis de la viabilidad celular	33
3.4.6	Análisis lipídico	33
3.4.7	Ensayos de Inmunofluorescencia	34
3.4.8	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot	36
3.4.9	Ensayos de endocitosis	37
3.4.10	Ensayos de microscopía electrónica con el uso de anticuerpos	38
3.5	Estudios realizados con neuronas hipocampales de ratón	39
3.5.1	Aislamiento de membranas libres de lisosomas y de fracciones enriquecidas en membranas del aparato de Golgi	39
3.5.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot	40
3.5.3	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE)	41
3.5.4	Análisis de Fosfoproteínas presentes en rafts	43
3.5.5	Aislamiento de rafts de membranas totales o membranas de Golgi	44
3.5.6	Extracción de lípidos y análisis por cromatografía de capa delgada (TLC) y Slot blot	44
3.5.7	Cuantificación de lípidos por ensayos enzimáticos y HPLC	45
3.5.8	Tratamiento de neuronas hipocampales con SM o Smasa	46
3.5.9	Ensayos de inmunofluorescencia	46
3.5.10	Ensayos de inmunomarcación <i>in-situ</i>	48
3.5.11	Transfecciones, estudio de expresión y tráfico de GFP-GPI	48
3.5.12	Ensayos de endocitosis	49
3.5.13	Ensayos de actividad de RhoA y Cdc42	50
3.5.14	Transfección de RhoA constitutivamente activo	50

3.6 Análisis Estadístico	51
--------------------------	----

<b>4. DESARROLLO y RESULTADOS</b>	<b>52</b>
-----------------------------------	-----------

<b>4.1 CAPÍTULO I: Proteína prionica (PrP<sup>C</sup>) como candidato proteico para analizar polarización neuronal dependiente de rafts</b>	<b>53</b>
---	-----------

4.1.1 Análisis de la distribución polarizada de PrP <sup>C</sup> en neuronas hipocampales de rata	53
4.1.2 Asociación de PrP <sup>C</sup> a rafts en neuronas hipocampales	61
4.1.3 Importancia de los rafts en la distribución axonal de PrP <sup>C</sup> en neuronas hipocampales maduras: efecto de la modulación del colesterol	68
4.1.4 Importancia de los rafts en la distribución axonal de PrP <sup>C</sup> en neuronas hipocampales maduras: efecto de la modulación de los esfingolípidos	72
4.1.5 Papel crítico de los rafts en la endocitosis de PrP <sup>C</sup> en neuronas hipocampales maduras	77

<b>4.2 CAPÍTULO II: Aletaraciones de la polaridad neuronal en la enfermedad de Niemann-Pick Tipo A: Relevancia de los rafts</b>	<b>83</b>
---	-----------

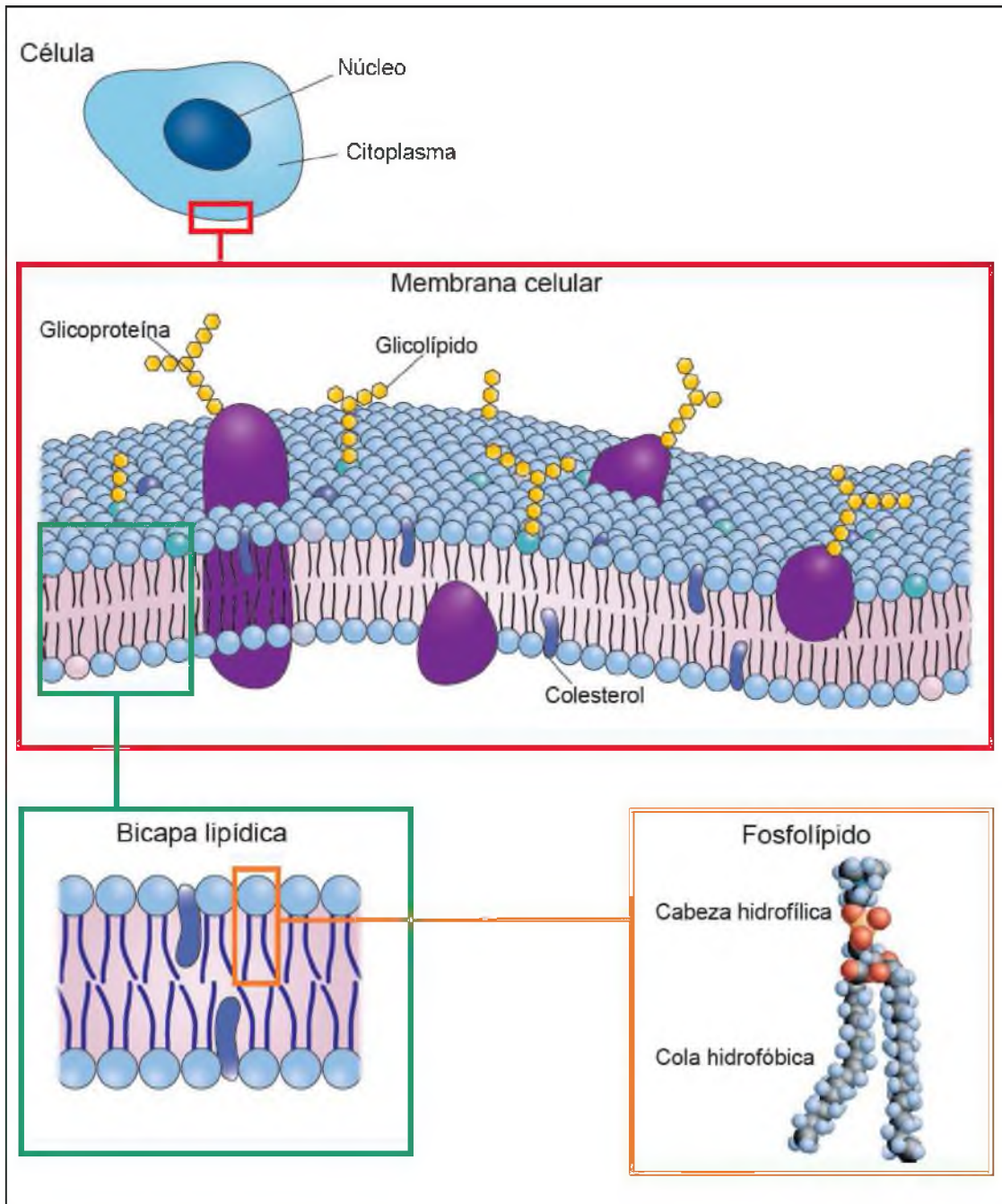
4.2.1 Alteraciones en la composición lipídica de los rafts neuronales en ausencia de ASM	83
4.2.1.1 Análisis lipídico de rafts provenientes de membranas totales de cerebros y de cultivos primarios neuronales de ratones wt y ASMko	83
4.2.1.2 Análisis lipídico de rafts provenientes de membranas de Golgi	90
4.2.1.3 Análisis lipídico de rafts provenientes de membrana plasmática neuronal	92
4.2.2 Composición proteica de rafts neuronales en ausencia de ASM	95
4.2.2.1 Análisis proteico de rafts provenientes de membranas totales de cerebro	95
4.2.2.2 Análisis proteico de rafts provenientes de cultivos primarios neuronales	99

4.3	<b>CAPÍTULO III: Alteraciones de las funciones de rafts, particularmente en la distribución polarizada de proteínas neuronales en ausencia de ASM</b>	<b>101</b>
4.3.1	Análisis de la distribución polarizada de moléculas de rafts en neuronas hipocampales de ratones ASMko	101
4.3.2	Análisis del tráfico exocítico del dominio GPI en neuronas hipocampales de ratones ASMko	108
4.3.3	Análisis de la endocitosis de moléculas de rafts en neuronas hipocampales de ratones ASMko	111
4.3.4	El aumento de SM es responsable de la endocitosis deficiente de moléculas de rafts en neuronas hipocampales de ratones ASMko	114
4.3.5	Alteraciones en la unión a membrana de RhoA reducen la endocitosis de moléculas de rafts en neuronas ASMko	119
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>123</b>
5.1	Relevancia de los rafts en la polarización axonal: mecanismo molecular	123
5.2	Polarización axonal de PrP <sup>C</sup> en neuronas hipocampales: implicancias fisiológicas y patológicas	127
5.3	La ASM como moduladora de la composición proteica y lipídica de la MP: implicancias para NPA	128
5.4	Modulación de la SM como posible terapia para NPA: efecto en otros lípidos?	130
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIÓN FINAL</b>	<b>133</b>
<b>7.</b>	<b>ABREVIATURAS</b>	<b>134</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>137</b>
<b>9.</b>	<b>PUBLICACIONES</b>	<b>151</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 LA MEMBRANA CELULAR: BREVE INTRODUCCIÓN A UN SISTEMA DINÁMICO Y COMPLEJO.

La membrana plasmática (MP) es una estructura laminada dispuesta como una bicapa lipídica que delimita todas las células. Está compuesta por lípidos, proteínas y glúcidos. Esta membrana determina la morfología y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior y el exterior celular (**Fig. 1**). Gracias a su permeabilidad selectiva, tiene la capacidad de regular el paso de agua, iones y metabolitos conservando estable el medio intracelular a la vez que mantiene el potencial electroquímico. Además, la MP recibe las señales del exterior celular transfiriéndolas al interior y desencadenando la respuesta a estímulos (Alberts y col., 2006).



**Figura 1. Ilustración de la membrana plasmática de una célula eucariota.** Figura adaptada de Alberts y col. (2006)

Durante mucho tiempo se creyó que la MP era una simple barrera estática formada por la sucesión de capas proteínas-lípidos-lípidos-proteínas. Hoy en día se concibe como una estructura dinámica cuyo modelo se conoce como

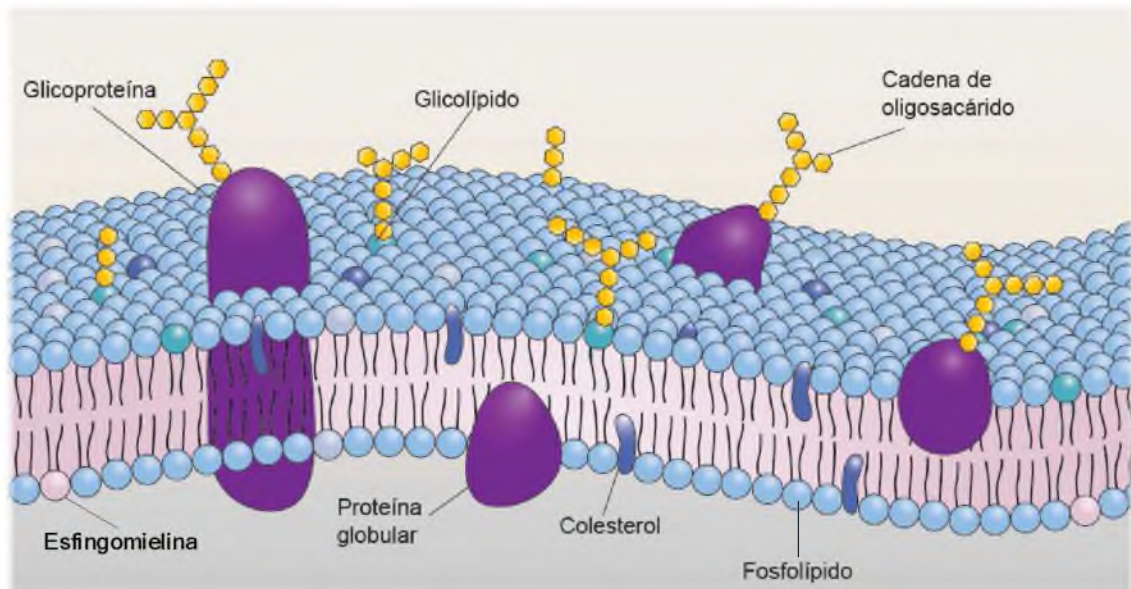


“mosaico fluido”, término acuñado por S.J. Singer y G.L. Nicholson en 1972. Explicar los cambios en la fluidez de las membranas, sus causas y sus consecuencias ha centrado la atención no sólo de biólogos sino también de físicos debido a sus fascinantes propiedades. En los últimos años se han develado un gran número de estructuras moleculares de proteínas de membrana y principios básicos a los que responde la organización de la MP. En el escenario actual la MP se concibe como una estructura compartimentalizada en dominios muy dinámicos de escala nanométrica. En ella, los lípidos han dejado de considerarse meros elementos estructurales para pasar a tener un papel activo en dicha compartimentalización, que es esencial para el tráfico y la señalización intracelular (Gorter & Grendel, 1925; Engelman, 2005; Jacobson y col., 2007; Coskun & Simons, 2010; Simons & Sampaio, 2013).

## 1.2 COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA CELULAR.

La composición química de la MP varía entre células dependiendo de la función que ejercen o del tejido en el que se encuentren. De manera general esta membrana está compuesta por una doble capa de fosfolípidos a la que se unen proteínas y glúcidos. Las moléculas más numerosas son las de lípidos estimándose que por cada 50 lípidos hay una proteína. Sin embargo, las proteínas, debido a su mayor tamaño, representan aproximadamente el 50%

de la masa de la membrana (Alberts y col., 2006) (**Fig. 2**).



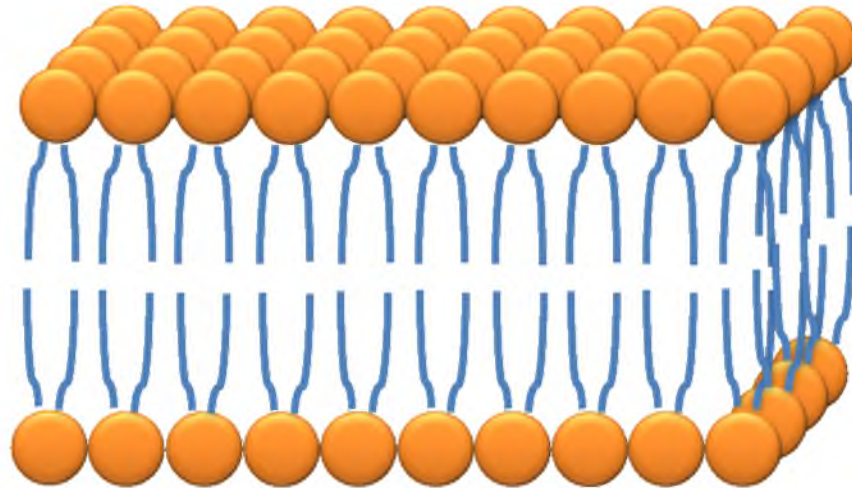
**Figura 2. Esquema general de una membrana celular.** Según el modelo de mosaico fluido, las proteínas (en violeta) serían como icebergs que navegarían en un mar de lípidos (en celeste). Figura adaptada de Alberts y col. (2006)

### 1.2.1 BICAPA LIPÍDICA.

El orden de las cabezas hidrofílicas y las colas hidrofóbicas de la bicapa lipídica impide que solutos polares, como sales minerales, agua, carbohidratos y proteínas, difundan a través de la membrana permitiendo en general la difusión pasiva de moléculas hidrofóbicas.

La doble capa lipídica de la MP se forma espontáneamente gracias a la propiedad que poseen las mitades hidrofóbicas de los lípidos de asociarse entre ellas y a la tendencia de las porciones hidrofílicas a interactuar con ambientes acuosos (**Fig. 3**). Esta característica anfipática de los lípidos es la propiedad química que permite a las células aislar su interior y este mismo

principio permite a nivel subcelular el ensamblaje de las membranas de las organelas.



**Figura 3. Diagrama del orden de los lípidos anfipáticos para formar una bicapa lipídica.** Las cabezas polares (de color anaranjado) separan las colas hidrofóbicas (de color azul) del medio citosólico y extracelular.

### 1.2.2 COMPONENTES LIPÍDICOS.

El 98% de los lípidos presentes en las membranas celulares son anfipáticos. Los más abundantes son los fosfolípidos y los esfingolípidos (SLs), que se encuentran en todas las células; le siguen los glicolípidos y los esteroides (principalmente colesterol).

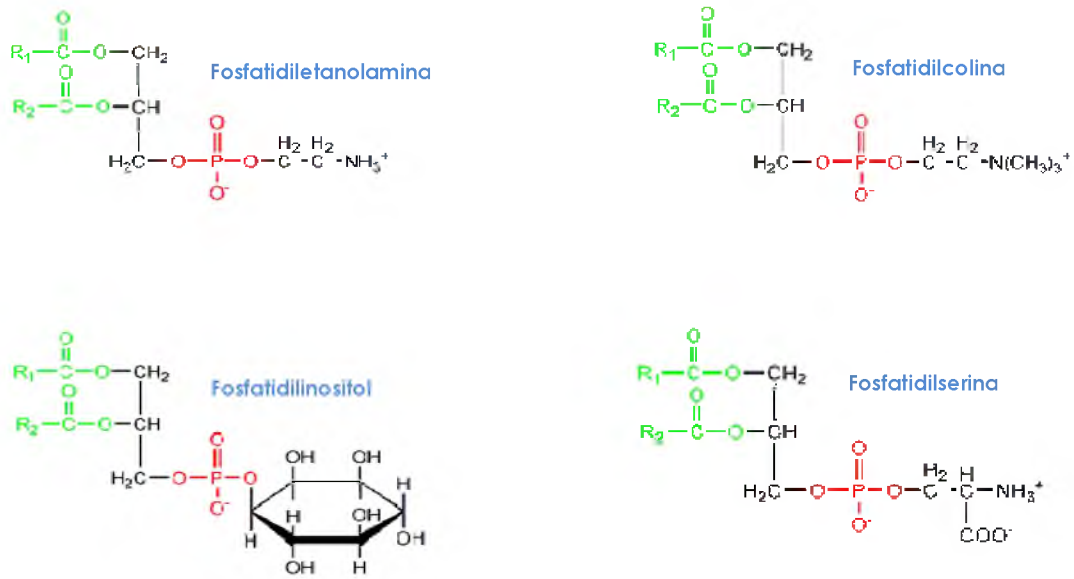
Los fosfolípidos tienen una molécula de glicerol con la que se esterifica un ácido fosfórico y dos ácidos grasos de cadena larga; los principales fosfolípidos de membrana son la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilcolina (PC), el fosfatidilinositol (PI) y la fosfatidilserina (PS) (Alberts y col., 2002).

Los SLs, son lípidos de membrana constituidos por ceramida (esfingosina + ácido graso); donde solo la familia de la esfingomielina (SM) posee fósforo; el

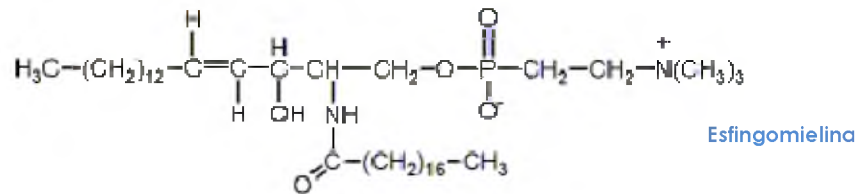
resto posee glúcidos, por lo que se denominan glucoesfingolípidos. Los cerebrósidos poseen principalmente glucosa, galactosa y sus derivados (N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina). Los gangliósidos contienen una o más unidades de ácido siálico (Futerman & Hannun, 2004) (**Fig. 4**).

El colesterol representa un porcentaje importante (en torno al 20% en células de mamífero) de los lípidos de membrana. Sus moléculas son más pequeñas y anfipáticas en comparación con otros lípidos entre los que se intercala. Se dispone con el grupo hidroxilo hacia el exterior de la célula por su afinidad con el agua. Dadas sus características y abundancia, el colesterol es un factor clave para controlar la fluidez y permeabilidad de la membrana. A mayor cantidad de colesterol menos permeable y fluida es la misma.

## Fosfolípidos



## Esfingolípidos



## Esteroles

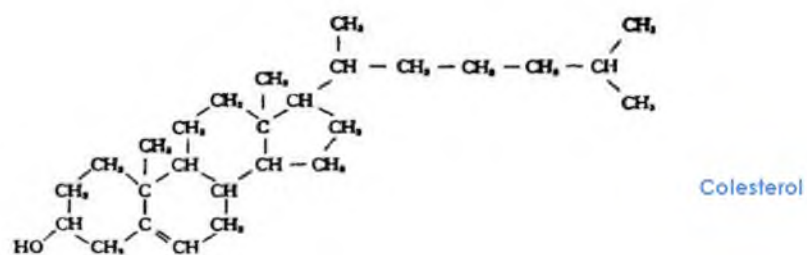


Figura 4. Estructuras químicas de los principales lípidos constitutivos de la membrana plasmática. Figura adaptada de Blanco A. (2007)

De manera general se postula que los lípidos de membrana se podrían encontrar en dos formas: como un líquido bidimensional o como una estructura más ordenada formando las llamadas balsas lipídicas (rafts) en las que el colesterol y los SLs juegan un papel esencial y de las que daremos detalle más adelante (Mouritsen & Zuckermann, 2004).

Por su protagonismo en esta tesis doctoral merece especial atención la composición lipídica de las membranas neuronales. Si bien esta composición puede variar dependiendo del tipo neuronal, las células nerviosas presentan membranas particularmente enriquecidas en SLs, gangliósidos y colesterol, (Sonnino & Prinetti, 2013).

### 1.2.3 COMPONENTES PROTEICOS.

Las proteínas de la MP son responsables de funciones tales como transporte, adhesión, recepción y transducción de señales, proteólisis o catálisis (enzimas). Se pueden clasificar según el modo de disposición en la bicapa lipídica como:

- ✚ **Proteínas integrales:** Embebidas en la bicapa lipídica atravesando la membrana una o varias veces (proteínas transmembrana) o mediante enlaces covalentes con un lípido o un glúcido. Estas proteínas representan aproximadamente el 80% de las proteínas de membrana.
  
- ✚ **Proteínas periféricas:** A un lado u otro de la bicapa lipídica se unen débilmente a la membrana por enlaces no covalentes. Entre ellas, se encuentran proteínas que incorporan a su molécula una modificación

lipídica como el grupo glicosil fosfatidil inositol (GPI) o el ácido palmítico. Estas proteínas representan el 20% de las proteínas de membrana.

La distribución de las proteínas en la MP es clave para su función y en muchos casos, esta distribución no es homogénea sino polarizada. Las neuronas, tipo celular que centra el presente trabajo de tesis, son el paradigma de la polaridad celular y la especialización a nivel de membrana. Este tipo celular posee dos tipos de procesos, molecular y funcionalmente distintos, los axones y las dendritas, que tienen además dominios especializados como la sinapsis. En las neuronas, el alto grado de polarización produce la especificación local de sus funciones, en sitios eventualmente muy lejanos, como ocurre por ejemplo en las neuronas del tracto cortico-espinal (Horton & Ehlers, 2003). A establecer la organización de las membranas dendríticas y axonales contribuyen el transporte polarizado, la fusión a MP y la retención selectiva. Muchas proteínas sinápticas están fuertemente retenidas en la MP gracias a sistemas de "andamiaje" en el que participan proteínas del citoesqueleto (Bork y col., 1997; Ledesma & Dotti, 2003; Leenders y col., 2008). Sin embargo, otras proteínas polarizadas en axones o dendritas no presentan esta fuerte retención y no están aún claros los mecanismos que impiden su difusión lateral de un dominio al otro. Aunque se postula la existencia de una barrera (Kobayashi y col., 1992; Futerman y col., 1993; Winckler y col., 1999) no está aún clara la naturaleza de la misma como es el caso de las uniones estrechas, conocidas como "*tight junctions*",

en las células epiteliales (Stevenson & Keon, 1998).

El análisis de neuronas hipocampales en cultivo que desarrollan axones y dendritas de manera secuencial y estereotipada ha sido y sigue siendo muy útil para entender las señales iniciales y las vías de establecimiento de la polaridad neuronal como se describirá más adelante (Kunda y col., 2001, González-Billault y col., 2002; Calderon de Anda y col., 2008; Leach y col., 2011; Dupraz y col., 2009; Sachdev y col., 2007).

#### 1.2.4 COMPONENTES GLUCÍDICOS.

Estos componentes se encuentran en el exterior de la membrana formando el glicocalix. Se unen covalentemente a las proteínas o a los lípidos. Pueden ser polisacáridos u oligosacáridos y sus principales funciones son dar soporte a la membrana y el reconocimiento celular (Alberts y col., 2006).



### 1.3 MICRODOMINIOS DE MEMBRANA: BALSAS LIPÍDICAS (RAFTS) COMO ESTRUCTURAS DE MEMBRANA ALTAMENTE ORGANIZADAS.

Además de macrodominios diferenciados como son los axones, las dendritas o la sinapsis, las membranas neuronales (y las de todas las células) cuentan también con una compartimentalización a micro/nano escala. La afinidad química que existe entre determinados lípidos, SLs y colesterol, que los lleva a asociarse formando nanodominios que incorporan proteínas de manera selectiva, es la base del concepto de balsa lipídica o raft.

La primera función asignada a los rafts fue la de contribuir a la generación de la membrana apical de las células epiteliales rica en glicolípidos (Simons & Van Meer, 1988). Durante mucho tiempo la existencia de rafts en células vivas fue cuestionada ya que resultaba muy difícil visualizarlos por microscopía convencional debido a su reducido tamaño y gran dinamismo. Sin embargo el uso de nuevas técnicas y herramientas, como por ejemplo la toxina colérica que se une al gangliósido enriquecido en rafts GM1, colorantes lipófilos que detectan el grado de fluidez de la membrana como el Laurdan, o técnicas que permiten analizar la interacción y dinamismo de proteínas marcadas como FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*), SFTM (*single fluorophore tracking microscopy*) o SPFT (*single particle fluorescence tracking*) han permitido confirmar la existencia de los rafts en células vivas (Munro, 2003; Sonnino & Prinetti, 2013). Gracias a estos estudios se ha llegado a la elaboración de simuladores virtuales que interpretan la formación y la

relevancia fisiológica de los rafts en distintos tipos celulares (Abe y col., 2012; Toulmay & Prinz, 2013; Bennett & Tieleman, 2013).

El método más extendido para el estudio de estas balsas lipídicas sigue siendo sin embargo una técnica bioquímica basada en una característica física de estos complejos de membrana: su resistencia a la extracción con detergentes no iónicos a baja temperatura (4°C). El uso de distintos detergentes (por ejemplo, Triton X-100, CHAPs, Lubrol, Triton X-114) en frío y el fraccionamiento en gradientes de densidad permiten obtener las membranas resistentes a detergentes (DRMs o rafts) en las fracciones ligeras del gradiente. Este comportamiento se debe a la composición lipídica rica en SLs, colesterol y el gangliósido GM1. Entre las proteínas con afinidad por rafts que se obtienen en las fracciones ligeras después de la extracción en frío con detergentes, están las ancladas a la membrana a través del grupo GPI, las doblemente acetiladas y asociadas al colesterol, y proteínas palmitoiladas (Schroeder y col., 1994; Hanada y col., 1995; Scheiffele y col., 1997; Simons & Toomre, 2000).

En la actualidad, se acepta la definición de rafts establecida en el año 2006 durante el *Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function*: "Las balsas lipídicas de membrana o rafts son pequeños dominios de entre 10 y 200 nm, heterogéneos y muy dinámicos, enriquecidos en SLs y esteroides, que compartimentalizan los procesos celulares. A veces, estas pequeñas balsas se estabilizan y forman estructuras más grandes mediante interacciones proteína-proteína y proteína-lípido" (**Fig. 5**).

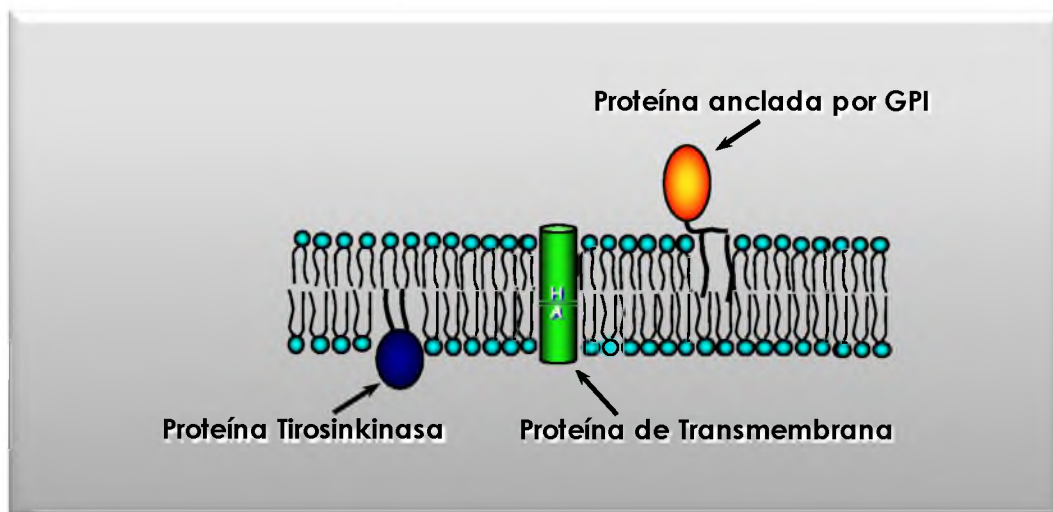
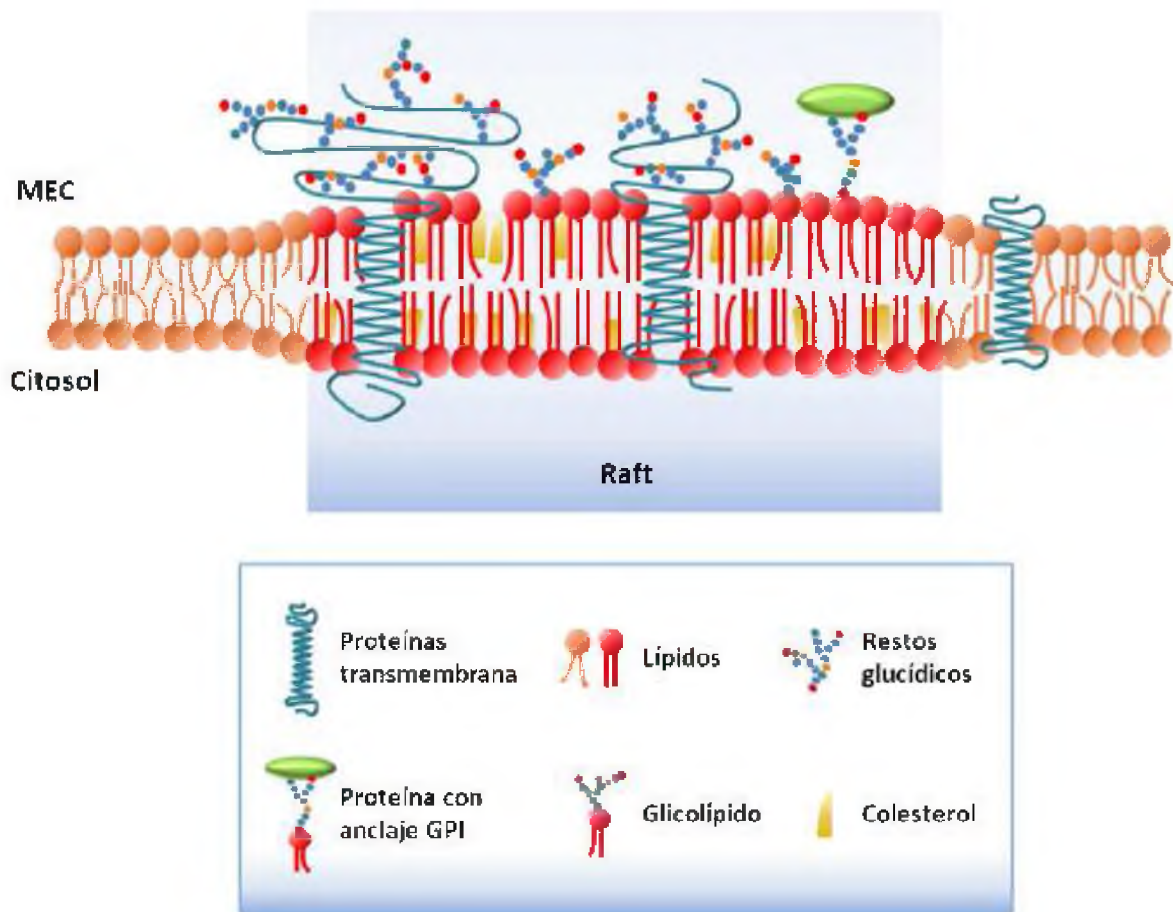


Figura 5. Diagrama simplificado de un raft lipídico.

Los rafts se ensamblan en la región trans del aparato de Golgi (TGN) donde se producen los SLs y entran en contacto con el colesterol previamente sintetizado en el retículo endoplásmico y transportado luego al TGN. El alto contenido en ácidos grasos saturados confiere a las membranas de rafts más orden y menos fluidez teniendo una temperatura de fusión más alta que otras zonas de la membrana (Harder y col., 1998). Ese alto grado de empaquetamiento de las cadenas aciladas es esencial para la organización de estos microdominios de membrana ya que hace que estas regiones ricas en SLs formen una fase "líquida ordenada" ( $L_o$ ) rodeada por dominios ricos en glicerofosfolípidos que constituyen una estructura "líquida desordenada" ( $L_d$ ), (Munro, 2003; Lucero & Robbins, 2004) (**Fig. 6**).



**Figura 6. Esquema de una balsa lipídica o raft de membrana.** En la figura se muestran algunos de los principales componentes de la membrana plasmática, y cómo éstos se organizan, interaccionan entre ellos y forman las balsas lipídicas. Figura gentilmente cedida por Natalia Díez Revuelta.

Los rafts están implicados en muchos procesos celulares; participan no solo en el correcto transporte de proteínas desde el TGN hacia la membrana plasmática, sino también en ciertos procesos de endocitosis, transducción de señales, proteólisis, adhesión celular y migración, transmisión sináptica y en la organización del citoesqueleto (Simons & Ikonen, 1997; Hancock, 2006; Orlandi & Fishman, 1998; Parton & Richards, 2003; Sonnino & Prinetti, 2013).

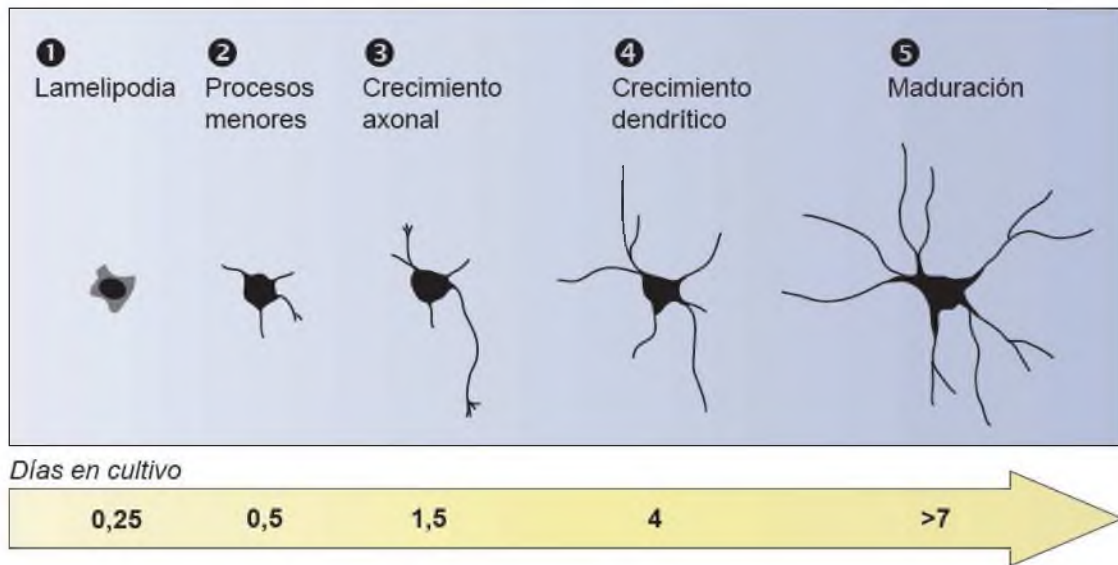
## 1.4 IMPORTANCIA DE LOS RAFTS EN EL DESARROLLO NEURONAL.

La maduración neuronal es un proceso gradual, donde el axón y las dendritas se diferencian primero morfológicamente para después adquirir una composición molecular distinta que les permite llevar a cabo sus diferentes funciones. Sólo luego de adquirir la polarización molecular de la membrana plasmática la neurona podrá establecer sinapsis (Dotti y col., 1988).

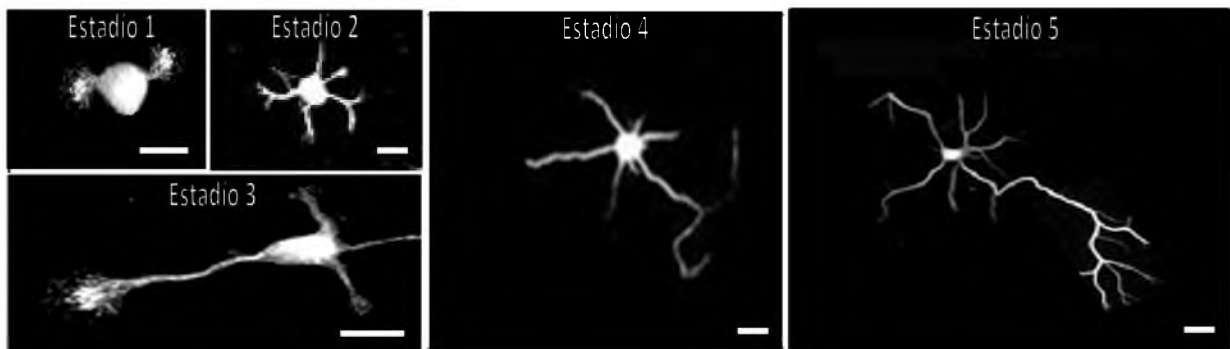
Los diferentes cambios morfológicos y moleculares que ocurren durante la diferenciación neuronal, desde que son células redondas hasta el desarrollo de complejas ramificaciones dendríticas y axonales, han sido caracterizados en detalle en cultivos primarios de neuronas hipocampales derivados de embriones de ratón o rata (Craig & Banker, 1994; Dotti y col., 1988; Calderon de Anda y col., 2008; Leach y col., 2011).

Hasta llegar a su madurez, las neuronas hipocampales en cultivo pasan por 5 estadios diferenciables morfológicamente (**Fig. 7**). En el estadio inicial inmediatamente posterior a la disección, las neuronas hipocampales tienen una morfología redonda sin ningún tipo de procesos (Estadio 1). En el curso de las siguientes 4 – 24 horas varios procesos con características morfológicas y longitudes similares emergen del cuerpo celular (Estadio 2). Entonces, uno de los procesos empieza a elongar más rápido gracias a un mayor transporte de organelas de membrana y proteínas citosólicas (Bradke & Dotti, 1997), mientras los demás permanecen estacionarios, y si nada lo impide este proceso se convertirá posteriormente en el axón (Dotti & Banker, 1987). Esta etapa es conocida como Estadio 3 del desarrollo neuronal y constituye el

primer signo de polarización. El estadio 4 del desarrollo comienza después de 4 días en cultivo e implica la elongación tanto axonal como dendrítica. A este punto, proteínas del citoesqueleto como la proteína asociada a microtúbulos MAP2, comienza a ser segregada a los procesos dendríticos (Caceres y col., 1984). Las neuronas en estadio 5 (desde los 7 días en cultivo en adelante) tienen procesos axonales y dendríticos largos y muy ramificados con numerosos contactos intercelulares (**Fig. 8**). En este momento, proteínas del citoesqueleto como MAP2 y tau, y ciertas proteínas de membrana dendrítica presentan distribución polarizada (Caceres y col., 1984; Craig y col., 1994; Rao y col., 1998). La segregación molecular, al igual que la restricción de ciertas proteínas de superficie y la agrupación de los receptores de neurotransmisores y canales iónicos necesarios para la actividad sináptica, tiene lugar a partir de los 13 – 15 días en cultivo y sólo entonces la neurona es totalmente funcional (Craig y col., 1994). Por ello se asume que la asimetría funcional de la membrana neuronal ocurre a través de la maduración de dos mecanismos del desarrollo: primero la maduración de la vía del transporte polarizado de componentes de membrana y posteriormente el anclaje y agrupamiento de los mismos en la superficie celular.



**Figura 7. Establecimiento de la polaridad en neuronas hipocampales en cultivo.** Se indica para cada estadio, el tiempo aproximado al cual se puede encontrar cada fase expresado en días en cultivo, así como la morfología característica de cada uno. Figura adaptada de Dotti y col. (1998)



**Figura 8. Imágenes representativas de los distintos estadios del desarrollo neuronal.** Neuronas hipocampales en cultivo provenientes de cerebros de embriones de rata de 18 días de gestación. Las barras blancas indican 10  $\mu\text{m}$ . Imágenes gentilmente cedidas por María Dolores Ledesma Muñoz.

En neuronas, el establecimiento de los rafts es necesario para una correcta maduración y mantenimiento del transporte polarizado de ciertas proteínas hacia la membrana axonal. Así, la reducción farmacológica de los niveles de colesterol o SLs en neuronas maduras suprime la polarización axonal de

proteínas como la GPI Thy-1 (Ledesma y col., 1998). Además, el aumento de la síntesis de esfingomielina durante el desarrollo es clave para la formación de rafts y el establecimiento de la polaridad axonal de esta proteína (Ledesma y col., 1999). Es también importante destacar que los rafts participan en el transporte polarizado de proteínas en otros tipos celulares de cerebro tales como oligodendrocitos. De hecho, ciertas proteínas constitutivas de la capa de mielina necesitan de éstos microdominios para asociarse con la misma (Kramer y col., 1997).

A pesar de que hay evidencias de la participación de los rafts en el desarrollo y funcionamiento neuronal, aun no se conocen en detalle los mecanismos moleculares de esta participación, cuál es la contribución de los distintos lípidos de rafts, qué proteínas utilizan este mecanismo y si alteraciones de rafts que afectan a la polaridad neuronal están involucrados en la patología de enfermedades neurológicas (Ledesma y col., 1998; Simons & Ikonen, 1997; Ledesma y col., 2011). Por ello, esta tesis doctoral se ha centrado en aportar información sobre estas cuestiones.



## 1.5 NIEMANN-PICK TIPO A: UN EJEMPLO DE ENFERMEDAD NEUROLÓGICA CAUSADA POR ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS.

De acuerdo con un papel relevante de los lípidos en el funcionamiento neuronal muchas lipidosis cursan con problemas cognitivos, retardo mental y neurodegeneración. Entre ellas están las esfingolipidosis provocadas por alteraciones en el metabolismo de SLs que son componentes esenciales de los rafts. La enfermedad de Niemann-Pick tipo A y B (NPA y NPB) es una esfingolipidosis causada por mutaciones en el gen *SMPD1* que codifica para la esfingomielinidasa ácida (ASM) (Brady y col., 1966). Ambos tipos se caracterizan por un progresivo compromiso visceral, incluyendo hepatoesplenomegalia, insuficiencia respiratoria y enfermedad cardiovascular (Schuchman & Desnick, 2001). Sin embargo, mientras el NPB tiene manifestaciones tardías y presenta leve o incluso ningún compromiso neurológico, el NPA es la forma infantil caracterizada por deficiencias cognitivas severas y por un proceso neurodegenerativo que conduce a la muerte en los primeros 3 – 4 años de vida. La presentación clínica diferente entre ambos tipos de la enfermedad se debe a diferencias en la actividad enzimática residual de la ASM. Mientras la actividad residual en NPB está reducida pero es aún superior a un 5% de la actividad normal, en NPA la actividad residual es menor al 1% de la normal (Graber y col., 1994). Estas observaciones sugieren que mientras niveles bajos de actividad enzimática son suficientes para mantener intacta la función neurológica, la ausencia total de la misma tiene consecuencias devastadoras en el cerebro.

La ASM es una enzima lisosomal que convierte a la SM en ceramida y fosfocolina (Gatt, 1963; Fowler, 1969). Por lo tanto, la acumulación de SM en los lisosomas caracteriza a las células de los pacientes con enfermedad de Niemann-Pick (NPD), tanto tipo A como B, clasificando a esta patología como una metabolopatía de depósito lisosomal (Futerman & van Meer, 2004). Se supone que el almacenamiento lisosomal tiene lugar sólo cuando la actividad residual de la enzima ASM cae por debajo de un umbral crítico donde la tasa de degradación del sustrato es inferior a la tasa de recaptación (Conzelmann & Sandhoff, 1983). La recaptación de SM en células neurales es menor que en hígado, bazo o linfonodos y por ello se ha propuesto que los niveles bajos de actividad enzimática en la enfermedad NPB son suficientes para impedir el almacenamiento lisosomal en neuronas (Graber y col., 1994), evitando de esta manera el severo compromiso neurológico.

Desafortunadamente, a pesar de esta correlación entre la actividad enzimática residual y el fenotipo, los ensayos realizados *in-vitro* para medir la actividad de la ASM no han sido suficientes para predecir el desarrollo y la magnitud del compromiso neurológico en los pacientes con NPA. Más aún, aunque el almacenamiento lisosomal de sustrato no metabolizado ha sido considerado la causa principal de la enfermedad, el mecanismo molecular que conduce a este evento patológico con compromiso neurológico aún se desconoce.

Es muy probable que este defecto enzimático, considerado como primario, desencadene muchas alteraciones bioquímicas y celulares secundarias que podrían conducir a complicaciones mayores o incluso ser la

principal causa del daño tisular y la muerte del paciente. Los SLs, incluida la SM, ejercen muchas de sus funciones biológicas a nivel de la MP donde, como ya se ha comentado, modulan la organización lateral de la membrana afectando la función de las proteínas asociadas (Lingwood & Simons, 2010). Por lo tanto, la deficiencia lisosomal de la ASM y el defecto resultante en el catabolismo a nivel de esta organela podrían directamente conducir a una alteración en la composición y funcionamiento de la MP. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de una reserva de ASM en la superficie celular (Grassmé y col., 2001; Gulbins, 2003) sugiriendo que independientemente del defecto lisosomal, las alteraciones de la MP podrían deberse directamente al defecto enzimático en este sitio celular. Un objetivo importante de esta tesis ha sido investigar esta posibilidad.

Para ello, hemos utilizado un modelo animal (murino) para NPA creado por técnicas de transferencia genética. En estos ratones el gen SMPD se truncó (ratones ASMko) por lo que no se expresa la ASM, lo cual lleva a la ausencia total de actividad de la enzima en todos los tejidos incluido el cerebro. Este modelo presenta los mismos síntomas que los pacientes con NPA entre los que se encuentran: el declive motor progresivo que deriva en ataxia, neurodegeneración y muerte temprana (a los 7 – 8 meses de edad) (Horinouchi y col., 1995). En el cerebro de estos ratones la falta de ASM lleva a la acumulación de la SM que es uno de los principales componentes de rafts. Por ello consideramos que el ratón ASMko es una herramienta ideal para estudiar tanto *in-vitro* como *in-vivo* la repercusión de alteraciones de rafts en la polaridad neuronal y su posible contribución al desarrollo de la NPA, que

hoy en día no tiene cura ni tratamiento, causando deficiencias cognitivas severas.

## 2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

Considerando el marco teórico descrito proponemos como hipótesis de trabajo que la falta de actividad de la ASM provoca dos situaciones aberrantes que producen alteraciones en los rafts. Por una parte, existe un bloqueo de la producción de ceramida a partir de SM en los lisosomas. Esto disminuye la cantidad de ceramida disponible en el TGN para sintetizar *de novo* SM, lo que conduce a una menor formación de rafts.

Por otro lado, la falta de actividad de ASM a nivel de la membrana plasmática provoca un aumento de la cantidad de SM a ese nivel alterando la composición y las funciones de los rafts en la superficie celular.

Para el abordaje de ésta hipótesis de trabajo con dos escenarios, nos planteamos los siguientes objetivos:

### OBJETIVO GENERAL:

Comprender los mecanismos moleculares por los que los rafts participan en la polaridad neuronal y determinar si alteraciones en estos mecanismos contribuyen a la patología de la enfermedad de Niemann-pick tipo A.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✚ Caracterizar marcadores proteicos neuronales cuya polarización depende de rafts.
  
- ✚ Determinar el mecanismo de la polarización dependiente de rafts.
  
- ✚ Caracterizar las alteraciones en la composición lipídica y proteica de los rafts neuronales en el ratón modelo para NPA que carece de ASM.
  
- ✚ Determinar si la polarización dependiente de rafts se ve afectada en neuronas carentes de ASM, y si es así, caracterizar el mecanismo molecular aberrante.
  
- ✚ Ensayar estrategias de rescate de los fenotipos aberrantes.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 MODELO EXPERIMENTAL MURINO.

Una colonia de ratones heterocigotas para el gen codificante de la ASM (Cg5BL) (Horinouchi y col., 1995) se estableció a partir de dos parejas gentilmente donadas por el dr. Schuchman (Mount Sinai School of Medicine, New York). Los experimentos se realizaron usando ratones wt o ASMko de 7 meses de edad, cuyo genotipo se determinó a partir de ADN genómico mediante reacción de PCR según fue descrito por Horinouchi y col. (1995). Todos los procedimientos que necesitaron el uso de animales fueron supervisados por el veterinario encargado del bioterio, siguiendo las guías de protección y bienestar animal publicadas por el Ministerio de Salud Italiano (DDL 116/92).

## 3.2 REACTIVOS y ANTICUERPOS.

<b>Cultivos:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM, Glucosa, HEPES, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, L-Glutamina, MEM, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, NGF, Poly-L-Lisina, Tripsina</li> <li>• CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> <li>• Neurobasal, Penicilina-Estreptomicina, Suero de Caballo, Suero fetal bovino (FBS), Suplemento B27</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sigma-Aldrich</li> <li>• Merck</li> <li>• Invitrogen</li> </ul>
<b>Tratamientos:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subunidad <math>\beta</math> de la toxina colérica conjugada con Fluoresceína, Fumonicin B (FB1), SM, Smase, Methyl-<math>\beta</math>-cyclodextrin (M<math>\beta</math>C), Mevilonin</li> <li>• FM4-64</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sigma-Aldrich</li> <li>• Molecular Probes</li> </ul>
<b>Tinción <i>in-situ</i> e</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido pirúvico (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>), BSA, Cloruro de Amonio (NH<sub>4</sub>Cl), DABCO, EGTA, Glucosa, Hepes, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Lactosa, Laminina, L-Glutamina, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, Sacarosa, Triton X-100</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sigma-Aldrich</li> </ul>
<b>Inmunofluorescencias</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gelatina 80-100 blooms, PFA</li> <li>• Suero fetal bovino (FBS)</li> <li>• Ácido tricloroacético (TCA), KCl, Metanol, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> <li>• Mowiol</li> <li>• Parafina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Panreac</li> <li>• Invitrogen</li> <li>• Merck</li> <li>• Calbiochem</li> <li>• Fluka</li> </ul>
<b>Bioquímica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acrylamida/bis-Acrylamida, Azul de bromofenol, CLAP, EDTA, Glucosa, Glicina, Glycerol, Hepes, MES, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, NP-40, Sacarosa, Triton X-100; Trizma base, Tween-20, B-mercaptoetanol (<math>\beta</math>-ME)</li> <li>• Ácido clorhídrico (HCl), CaCl<sub>2</sub>, Cloroformo, Deoxicolato Sódico, KCl, Metanol, MgCl<sub>2</sub></li> <li>• SDS</li> <li>• DSP, DTSSP</li> <li>• APS, TEMED</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sigma-Aldrich</li> <li>• Merck</li> <li>• GE-Healthcare</li> <li>• Pierce</li> <li>• Bio-Rad</li> </ul>

**Tabla 1. Reactivos.** En la tabla se muestra un listado de los reactivos empleados para la realización del presente trabajo distribuidos por técnicas de experimentación (cultivos celulares, tratamientos, ensayos *in-situ* e inmunocitoquímica y bioquímicos), y ordenados en función de la casa comercial de la que son originarios.



Nombre	Especie	Concentración	Origen
<b><math>\gamma</math>-Adaptin</b>	Ratón	1:5000	BD Biosciences
<b>Bip</b>	Ratón	1:2500	BD Biosciences
<b>GM-130</b>	Ratón	1:500	BD Biosciences
<b>Lamp-2</b>	Ratón	1:250	BD Biosciences
<b>Synaptophysin</b> <b>clon Sy-38</b>	Ratón	1:50	Chemicon
<b>Anti-TfRc</b> <b>clon CD-71</b>	Conejo	1:50	Sta. Cruz Biotechnology
<b>APP</b> <b>clon 22C11</b>	Ratón	1:100	Chemicon
<b>Flotillin-1</b>	Ratón	1:100	BD Biosciences
<b>PrP<sup>C</sup> (Pom-1)</b> <b>clon Ag1193</b>	Ratón	1:100	Gentilmente provisto por Dr. A. Aguzzi (Institute of Neuropathology, Zurich, Switzerland)
<b>MAP2</b>	Conejo	1:2000	Peninsula Laboratories
<b>RhoA</b> <b>clon 26C4</b>	Ratón	1:200	Sta. Cruz Biotechnology
<b>Cdc-42 P1</b>	conejo	1:200	Sta. Cruz Biotechnology
<b><math>\alpha</math>-Tubulin</b>	Ratón	1:2000	Sigma
<b>Tau-1</b> <b>clon PC1C6</b>	Ratón	1:1000	Millipore
<b>Thy-1 (CD-90)</b>	Ratón	1:100	Serotec
<b>Anti-GluR1</b>	Conejo	1:50	Upstate
<b>Anti-MBP</b>	Ratón	1:200	Thermo Scientific

**Tabla 2. Anticuerpos primarios.** En la tabla se muestra un listado de los anticuerpos primarios empleados para la realización de inmunofluorescencias indicando el nombre completo del anticuerpo, la especie animal reactiva, la concentración empleada y la casa comercial de la que son originarios.

Para Western blots, los anticuerpos anti PrP<sup>C</sup>,  $\alpha$ -Tubulin y Flotillin-1 se usaron diluidos 1:500. La subunidad  $\beta$  de la toxina colérica (Sigma) se usó diluida 1:1000 en los slot-blots.

Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-especie (Molecular Probes) conjugados con diferentes fluoróforos Alexa Fluor 488, 594 o 647 (1:1000) para las inmunofluorescencias o conjugados con HRP (1:2000) para WB.

### 3.3 CULTIVOS CELULARES.

#### **Cultivo primario de neuronas hipocampales provenientes de rata y ratón.**

Los cultivos de neuronas hipocampales de rata o ratón se obtuvieron a partir de embriones de 18 o 16 días de gestación (E18, E16, respectivamente) según el protocolo descrito por Goslin y Banker en 1989 (Goslin & Banker, 1989; Kaech & Banker, 2006). El motivo por el que se eligieron células de E18 o E16 es porque en estos estadíos la gran mayoría de las neuronas hipocampales de rata o ratón, respectivamente, han finalizado su división celular pero la diferenciación no ha acabado completamente encontrándose en el momento ideal para el estudio de su desarrollo (Dotti y col., 1988).

Para la obtención de estas células se extrajo el cerebro de los embriones y se diseccionó el hipocampo; el tejido se limpió de restos de meninges y se lavó con solución tamponada de Hank libre de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , atemperada a  $37^{\circ}\text{C}$  (HBSS sin  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ; compuesto por 137mM NaCl, 5.36mM KCl, 0.34mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.44mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.2mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5.6mM glucosa, pH 7.4). El tejido limpio se disgregó mecánicamente con una pipeta Pasteur de vidrio y se trató

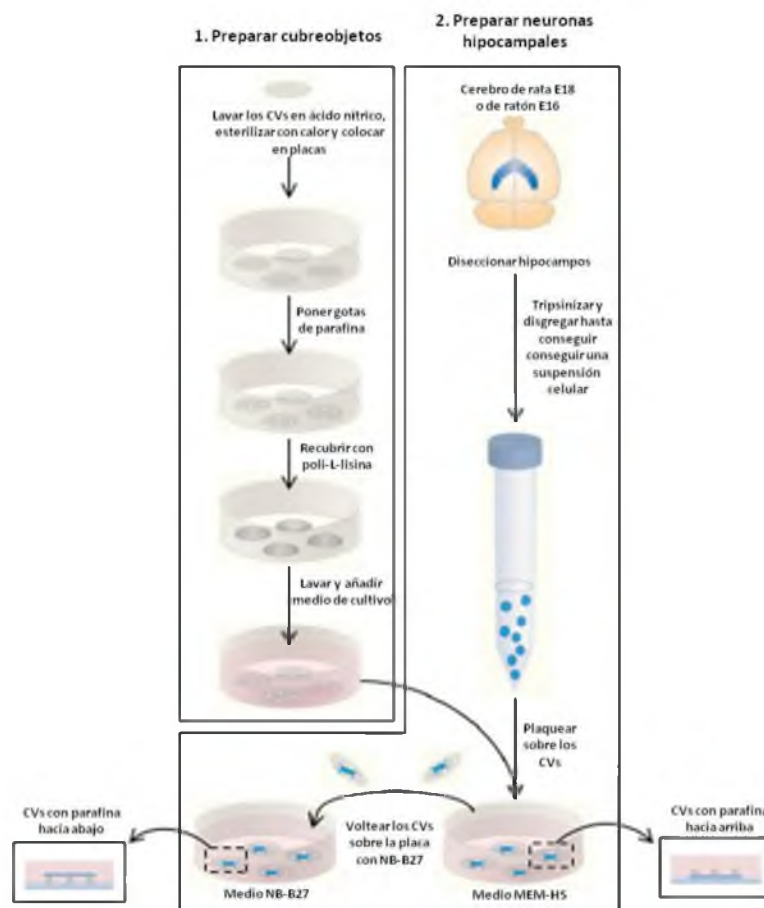
con tripsina durante 15 minutos a 37°C. Se hicieron lavados de nuevo con HBSS con iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (HBSS; compuesto por 137mM NaCl, 5.36mM KCl, 1.26mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.34mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.44mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.6mM glucosa, 0.7% Hepes, pH 7.4), y se cuantificó el número de células por mililitro con una cámara de Neubauer (Brand).

Las células disgregadas se sembraron en placas de Petri de 60 milímetros (Nunc) para los estudios de bioquímica o en placas con cubreobjetos (CVs) de vidrio (Marienfeld) para los estudios de microscopía, ambos recubiertos con Poly-L-Lysina (PLL, Sigma). El recubrimiento de las placas de Petri se realizó por incubación con una suspensión de PLL 0.1 mg/mL durante 12 horas a 37°C. Para el recubrimiento de los CVs se utilizaron vidrios secuencialmente tratados con ácido nítrico (al 50% V/V), lavados con agua destilada y esterilizados por calor seco durante 2 horas a 200°C. Sobre la superficie de cada CV se aplicaron tres pequeñas gotas de parafina equidistantes. Una vez seca la parafina, se recubrieron con una suspensión de PLL 1 mg/mL durante 12 horas a 37°C. Tras varios lavados con agua destilada el material quedó listo para los cultivos celulares (**Fig. 57**, paso 1).

Las suspensiones celulares se sembraron a una densidad de  $15 \times 10^4$  células por placa de 60 milímetros con o sin CVs y se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM; *minimal essential medium*) suplementado con 10% de suero de caballo (MEM-HS) y 0,6% de glucosa, en un incubador con atmósfera húmeda (modelo C150, Binder) al 5% de  $\text{CO}_2$  y 37°C. A las 24 horas los CVs se traspasaron a una nueva placa en posición invertida de forma que las gotas de parafina quedaron en contacto con el plástico. La placa contenía medio

Neurobasal suplementado con 2% B-27 y 0.5 mM de L-Glutamina (NB-B27) previamente atemperado y equilibrado a 5% de CO<sub>2</sub> (**Fig. 57**, paso 2).

Para nuestros experimentos, las células se mantuvieron en cultivo por 3 días (neuronas inmaduras en estadio 3), o por 8 -15 días (neuronas maduras en estadio 5).



**FIGURA 57. Esquema del proceso de disección y cultivo primario de neuronas hipocampales.** En el paso 1 se describe la preparación de CVs de vidrio recubiertos de PLL con gotas de parafina para el cultivo de neuronas. En el paso 2 se representa el proceso de extracción de hipocampo y la obtención y siembra de neuronas hipocampales sobre los CVs previamente preparados. Figura adaptada de Kaech & Banker (2006) y gentilmente cedida por Natalia Díez Revuelta.

### 3.4 ESTUDIOS REALIZADOS CON NEURONAS HIPOCAMPALES DE RATA.

#### 3.4.1 Purificación de rafts usando Triton X-100.

Las neuronas hipocampales se lavaron en tampón fosfato (PBS) en frío y se extrajeron con tampón MBS (25 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6,5) y CLAP (25 µg/mL de cada uno de los siguientes inhibidores de proteasas: quemostatina, leupeptina, antipaina y pepstatina) conteniendo 1% Triton X-100. Luego de 60 minutos de incubación a 4°C en agitación, se cuantificó la cantidad de proteína total empleando un kit comercial basado en el método del ácido bicinonínico (BCA, Bio-Rad Protein Assay Kit). A 1 ml de muestra conteniendo 100 µg de proteínas se le añadieron 2 mL de sacarosa al 90% P/V para llegar a una concentración final de 60% P/V sacarosa. La mezcla se depositó en el fondo de tubos de ultracentrífuga de 12 mL de capacidad (Beckman Coulter). Sobre estas muestras, se añadieron 4 mL de sacarosa al 35% P/V y 4 mL más al 5% P/V, cuidando que no se mezclaran entre sí para formar un gradiente discontinuo de densidad. Los tubos se ultracentrifugaron a 155.000 x g durante 18 horas a 4°C (Optima L-100 XP Ultracentrifuge, rotor SW-41, Beckman Coulter). Partiendo de la superficie del líquido en los tubos se recogieron 11 fracciones de 1 mL cada una. Las fracciones 4 – 5 se identificaron como fracciones de rafts por la presencia de marcadores específicos de estos dominios de membrana en muestras control.

### **3.4.2 Purificación de rafts por sonicación.**

Como método alternativo al aislamiento de rafts con detergentes se utilizó en algún caso el aislamiento por sonicación según lo descrito en Smart y col., 1995. Neuronas hipocampales en cultivo se lavaron en tampón fosfato (PBS) frío y se recogieron en 1 mL de tampón MBS. Las células se homogeneizaron por medio de 10 pasajes a través de una aguja 22-G y se sonicaron usando el 130-W Ultrasonic Processor programado a un ritmo de 12 ráfagas de 5 segundos cada una. El homogenato se fraccionó en gradiente de sacarosa como se describió con anterioridad.

### **3.4.3 Reducción de colesterol.**

La reducción de colesterol en neuronas hipocampales se llevó a cabo tratando las células a los 5 días en cultivo con 0,4  $\mu$ M Mevilonina y 0,5 mM Metyl- $\beta$ -Ciclodextrina (M $\beta$ C) durante 5 días.

### **3.4.4 Reducción de Esfingolípidos.**

La reducción de SLs en neuronas hipocampales se llevó a cabo agregando, a las 24 horas desde el plaqueo, fumonisina B1 (FB1) de una solución stock 1 mM en 20 mM HEPES, pH 7,4 hasta alcanzar una concentración final de 25  $\mu$ M. Las células se trataron durante un total de 8 días añadiendo FB1 25 $\mu$ M cada 48 horas.

### 3.4.5 Análisis de la viabilidad celular.

La ausencia de cambios en parámetros como la morfología neuronal, la concentración total de proteínas de membranas ( $40 \pm 9 \mu\text{g}$  de proteína/100.000 células) y la polarización molecular de componentes del citoesqueleto o sinápticos se utilizaron para descartar la toxicidad de los tratamientos. Con el mismo fin se midieron los niveles de apoptosis y necrosis en un total de 100 células por condición y experimento. La apoptosis se cuantificó por ensayo de TUNEL (Estus y col., 1997). Los niveles de apoptosis fueron muy similares en los casos control, neuronas tratadas con reductores de colesterol y neuronas tratadas con reductores de SLs:  $10 \pm 2,6\%$ ,  $8 \pm 2\%$  y  $12 \pm 3,1\%$ , respectivamente. La necrosis se evaluó mediante la incorporación de Trypan blue (Goslin & Banker, 1991). Los porcentajes de neuronas positivas para Trypan blue no mostraron diferencias significativas entre células control, tratadas con reductores de los niveles de colesterol y tratadas para la disminución de los niveles de SLs ( $5 \pm 1,5\%$ ,  $4 \pm 1,8\%$  y  $6 \pm 2\%$ , respectivamente).

### 3.4.6 Análisis lipídico.

Con el objetivo de comparar el contenido lipídico de rafts y extractos totales provenientes de neuronas de rata en estadio 3 y 5 del desarrollo y monitorear la eficiencia de los protocolos de reducción de colesterol y SLs, los niveles de estos lípidos fueron analizados por cromatografía de capa delgada (TLC). Las membranas celulares fueron obtenidas por centrifugación a  $100.000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por una hora y los lípidos fueron extraídos de acuerdo al protocolo descrito

por Bligh and Dyer (1959). Brevemente, las membranas se extrajeron en tampón Bligh-dyer (metanol/cloroformo [2:1 V/V] con butilhidroxitolueno (BHT) al 0,05% en etanol). Luego de agitar con vortex y centrifugar la fase orgánica (cloroformo) se lavó con cloruro de potasio (KCl) 2 M y se centrifugó. El precipitado se concentró bajo corriente de Nitrógeno. Los extractos lipídicos se analizaron en placas de silica gel 60 HPTLC usando secuencialmente dos solventes: Solvente hidrofílico compuesto por cloroformo/acetona/ácido acético/metanol y agua en proporciones [50:20:10:10:5 V/V]; y solvente hidrofóbico constituido por hexano y acetato de etilo, en proporciones [5:2 V/V]. Estándares para colesterol, ceramida, SM y fosfolípidos (Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina) se cargaron en paralelo para identificar estas especies en las muestras biológicas de interés. Los niveles del gangliósido GM1 se determinaron por slot blot usando la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica conjugada con peroxidasa.

La cuantificación de los resultados, obtenidos en un mínimo de 3 experimentos independientes para cada condición, se realizó sobre imágenes de TLCs o slot blots tomadas con escaners en condiciones de señal no saturada usando el software *Image J* de NIH (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### **3.4.7 Ensayos de Inmunofluorescencia.**

Los ensayos de inmunofluorescencia realizados sobre neuronas permeabilizadas (incubadas con Triton X-100 al 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente), o neuronas extraídas con detergente no iónico a baja temperatura (incubadas con Triton X-100 al 1% por 5 minutos a 4°C) se llevaron a cabo



siguiendo el protocolo descrito en Ledesma y col. (1998). Las tinciones de superficie se realizaron incubando células vivas con el anticuerpo primario (anti-PrP<sup>C</sup>) durante 10 minutos a 12°C y posteriormente fijadas en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% P/V y sacarosa 4% P/V en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la cuantificación de la marcación específica con el anticuerpo primario se seleccionaron de manera aleatoria distintas áreas de cada cono de crecimiento o de cada neurita. En el caso de neuronas maduras las imágenes de contraste de fase se analizaron junto con los ensayos de marcación con MAP2 y Tau para diferenciar correctamente las áreas dendríticas de las axonales (**Fig. 10**). La intensidad expresada en Pixel de la marcación correspondiente a PrP<sup>C</sup> en dichas áreas se cuantificó usando el programa *ImageJ* de NIH. La intensidad media se calculó por unidad de área. Los datos se expresaron como la relación entre la media de los valores provenientes de las neuritas más largas sobre los valores correspondientes a las neuritas más cortas de un total de 25 neuronas en estadio 3. En el caso de neuronas maduras (estadio 5) se determinaron los valores medios provenientes de los axones (procesos MAP2 negativos y Tau positivos) versus los correspondientes a dendritas (MAP2 positivos y Tau negativos). 70 a 80 dendritas y entre 50 y 60 axones se analizaron para cada condición experimental. Las áreas de colocación se calcularon mediante la superposición (*merge*) de los mapas de los puntos positivos para cada marcador. Se consideró como colocación total (más del 80% de superposición, determinado por el color amarillo obtenido de la mezcla de la

señal del canal rojo con la señal del canal verde) o colocación parcial (entre 50 – 80% de superposición).

#### **3.4.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot.**

Extractos de neuronas en cultivo se resuspendieron en solución de carga (Electrophoresis Sample Buffer, 2X (SANTA CRUZ) con azul de bromofenol, como indicador de frente de corrida, DTT, TCEP-HCl, SDS, MES, EDTA, Triton X-100 y glicerol) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 12% con SDS (SDS-PAGE) y se procesaron por electroforesis aplicando un campo eléctrico de 100 V a amperaje constante.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) empleando una cubeta de transferencia horizontal (Bio-Rad) a la que se aplicó una corriente eléctrica de 100 mA a voltaje constante durante 45 minutos.

La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó durante una hora a 42°C con una solución de saturación de BSA 5% en TBS-T (1,36 M NaCl, 26 mM KCl, 0,25 M Tris y 0,1% Tween-20). Posteriormente se incubó la membrana durante una noche a 4°C en agitación con el anticuerpo primario diluído en TBS/0,5% BSA. Después de 3 lavados con TBS-T se incubaron las membranas con el correspondiente anticuerpo secundario anti-especie conjugado con peroxidasa (Horseradish peroxidase; HRP) en TBS/0,5% BSA durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Tras 3 lavados la actividad de la

peroxidasa se utilizó para el revelado con el sistema de detección quimioluminiscente ECL (Western Lightning Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate, Perkin Elmer) y autorradiografía (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare). Como control de carga se repitieron los western blots sobre las mismas membranas con anticuerpos anti  $\alpha$ -Tubulina acetilada después de reacondicionarlas con tampón de extracción (*stripping buffer*; compuesto por 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7 y 2% SDS) incubándolas durante 1 hora a 42°C.

La cuantificación se llevó a cabo en las autorradiografías escaneadas con el software de NIH, *Image J*, en condiciones de señal no saturada.

#### **3.4.9 Ensayos de endocitosis.**

Las neuronas en cultivo se incubaron con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica conjugada con fluoresceína y con el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup> o TfRc durante 2, 6 y 10 minutos a 37°C. Las células se lavaron con PBS, se fijaron en 4% P/V PFA y 4% P/V sacarosa durante 15 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 en PBS durante 5 minutos. Las muestras se bloquearon con una solución conteniendo 2% suero bovino fetal (FBS), 2% albúmina sérica bovina (BSA) y 0,2% gelatina en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo las células se incubaron con anticuerpos secundarios anti-especie conjugados con rodamina (Alexa) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y se montaron sobre portaobjetos de cristal (Línea LAB) utilizando Mowiol y DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) como agente anti-apagamiento. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio

confocal (LSM 510 en una plataforma Axiovert 100 M). La colocalización se determinó mediante la conversión de los círculos coloreados de verde (GM1) y las agrupaciones en rojo (PrP<sup>C</sup> y TfRc). El grado de superposición se consideró como colocalización total (más del 80% de superposición) o colocalización parcial (entre 50 – 80% de superposición). Se analizaron los cuerpos celulares de 10 neuronas diferentes por condición. Con el objetivo de evaluar el nivel de endocitosis se contó el número de agrupaciones (*clusters*) dentro de los cuerpos celulares, excluyendo aquellas de la periferia que se consideraron estructuras de la superficie celular. El valor medio del número de clusters en los cuerpos celulares se normalizó frente al valor medio en neuronas no tratadas y se expresó como porcentaje de este último.

#### **3.4.10 Ensayos de microscopía electrónica con el uso de anticuerpos.**

Secciones ultrafinas de 0,05  $\mu\text{m}$  de espesor provenientes de hipocampos de embriones de rata embebidas en Lowicryl HM20, se marcaron según el protocolo descrito por Sassoe-Pognetto & Ottersen (2000). Para ello las secciones de hipocampo se incubaron con el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup> diluído en tampón Tris 5 mM conteniendo 0,3% NaCl y 0,1% Triton X-100 durante 2 horas y luego con un anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro de 10nm.

### 3.5 ESTUDIOS REALIZADOS CON NEURONAS HIPOCAMPALES DE RATON.

#### **3.5.1 Aislamiento de membranas libres de lisosomas y de fracciones enriquecidas en membranas del aparato de Golgi.**

Extractos totales de cerebros de ratones se homogeneizaron en tampón sacarosa-PKM 0,5 M (Fosfato de potasio 100 mM, pH 6,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM, y HCl 3 mM) a 4°C. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante, libre de núcleos celulares, se centrifugó dos veces más durante 10 minutos a 8000 rpm con el objetivo de obtener una fracción de membranas libre de lisosomas. Se confirmó que el sobrenadante resultante de estas series de centrifugaciones a baja velocidad contenía membranas totales sin lisosomas por western blot, usando anticuerpos específicos contra proteínas residentes en lisosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, membrana plasmática y endosomas (**Fig. 32A**). Para obtener una fracción enriquecida en membranas de Golgi, se siguió el protocolo indicado por Fath & Burgess (1993) en el que este último sobrenadante se colocó sobre un gradiente de densidad discontinuo constituido por sacarosa-PKM 1,3 M y Sacarosa-PKM 0,7 M y se centrifugó a 17500 rpm en un rotor SW40 durante 60 minutos. Las membranas que se concentraron en la interfase 0,7/1,3 M se recogieron y llevaron a una concentración 1,25 M Sacarosa-PKM depositándose en el fondo de un tubo de ultracentrifugación. Sobre la muestra se cargó primero tampón Sacarosa-PKM 1,1 M y luego otro volumen del mismo tampón 0,5 M. Se centrifugó a 15000 rpm en un rotor SW40 durante 90 minutos. Las membranas de Golgi se recogieron en la interfase 0,5/1,1 M que se ajustó a 0,7 M con tampón Sacarosa-PKM y

finalmente se centrifugó a 10400 rpm por 15 minutos para concentrarlas en el precipitado del fondo del tubo.

### **3.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot.**

Extractos de tejido de cerebro o de neuronas en cultivo se resuspendieron en solución de carga (Electrophoresis Sample Buffer, 2X (SANTA CRUZ) con azul de bromofenol, como indicador de frente de corrida, DTT, TCEP-HCl, SDS, MES, EDTA, Triton X-100 y glicerol) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 12% con SDS (SDS-PAGE) y se procesaron por electroforesis aplicando un campo eléctrico de 100 V a amperaje constante.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) empleando una cubeta de transferencia horizontal (Bio-Rad) a la que se aplicó una corriente eléctrica de 100 mA a voltaje constante durante 45 minutos.

La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó durante una hora a 42°C con una solución de saturación de BSA 5% en TBS-T (1,36 M NaCl, 26 mM KCl, 0,25 M Tris y 0,1% Tween-20). Posteriormente se incubó la membrana durante una noche a 4°C en agitación con el anticuerpo primario diluído en TBS/0,5% BSA. Después de 3 lavados con TBS-T se incubaron las membranas con el correspondiente anticuerpo secundario anti-especie conjugado con peroxidasa (Horseradish peroxidase; HRP) en TBS/0,5% BSA durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Tras 3 lavados la actividad de la peroxidasa se utilizó para el revelado con el sistema de detección

quimioluminiscente ECL (Western Lightning Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate, Perkin Elmer) y autorradiografía (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare). Como control de carga se repitieron los western blots sobre las mismas membranas con anticuerpos anti  $\alpha$ -Tubulina acetilada después de reacondicionarlas con tampón de extracción (*stripping buffer*; compuesto por 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7 y 2% SDS) incubándolas durante 1 hora a 42°C.

La cuantificación se llevó a cabo en las autorradiografías escaneadas con el software de NIH, *Image J*, en condiciones de señal no saturada.

### **3.5.3 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE).**

Luego de purificar membranas de rafts wt y ASMko de extractos totales de cerebros o de neuronas hipocampales en cultivo, como ya fue descrito en el apartado correspondiente (página 31), se acondicionaron las muestras en buffer desnaturalizante (urea 7M; tiourea 2M; CHAPS 4% P/V; Tris-HCl 30 mM pH 8,5; DTT 50 mM) y se añadió un cocktail de inhibidores de proteasas (CLAP). El homogenato resultante se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante una hora y se centrifugó durante 30 minutos a 13000 rpm. Las impurezas que podrían interferir con la electroforesis bidimensional (2D) se eliminaron mediante el kit *2D Clean Up* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Este kit generó un pellet de proteínas que se resuspendió en buffer de lisis. La concentración de proteínas se determinó mediante el kit *RC/DC Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Se emplearon 100 µg de extracto proteico para cada ensayo de electroforesis bidimensional que se diluyeron en buffer de lisis y 0,8% V/V de buffer IPG (*Immobilized pH Gradient*) 3-10 (Pharmalytes GE Healthcare). El isoelectroenfoco (IEF) de las proteínas se realizó en tiras individuales de acrilamida de gradiente de pH inmovilizado (IPG, Immobilizing DryStrips, GE Healthcare) con el sistema IPGPhor (GE Healthcare), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El programa de IEF fue el siguiente: *paso 1: 30 V 6hs, paso 2: 60 V 6hs, paso 3: 120 V 1h, paso 4: 200 V 1h, paso 5: 500 V 1h, paso 6: 1000 V 1h, paso 7: desde 1000 hasta 8000 V 1h 30 min, paso 8: 8000 V 1h*. Se utilizaron tiras de gradiente de pH 4-7 de 18 cm de longitud. Con el fin de resolubilizar las proteínas y reducir los puentes disulfuro tras el IEF, las tiras IPG se equilibraron durante 15 minutos en un buffer de equilibrado (urea 6M; glicerol 30% V/V; Tris-HCl 50 mM pH 8,8; SDS 4% P/V; trazas de azul de bromofenol) suplementado con 10 mg/mL de DTT. Luego, las tiras IPG se equilibraron 15 minutos en el mismo tipo de buffer de equilibrado suplementado con 25 mg/mL de iodoacetamida, para prevenir la reoxidación de los grupos tiol durante la electroforesis.

La segunda dimensión se realizó en un sistema Protean II XL (Bio-Rad Laboratories) utilizando geles de poliacrilamida al 12% con SDS mediante los protocolos habituales. Los geles se tiñeron con plata con el kit *PlusOne Silver Staining* (GE Healthcare).

Las imágenes se digitalizaron a una resolución de 300 puntos por pulgada con un densitómetro específico para geles 2D (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad) y con el programa PD-Quest versión 7.1 (Bio-Rad).



### 3.5.4 Análisis de Fosfoproteínas presentes en rafts.

Luego de purificar membranas de rafts de extractos totales de cerebros wt y ASMko como ya fue descrito en el apartado correspondiente (página 31), las muestras conteniendo 100 µg de proteínas se trataron para eliminar restos de lípidos y sales con 600 µL de metanol y se mezclaron con vortex; luego se agregó 150 µL de cloroformo y se volvieron a mezclar con vortex y finalmente se agregaron 450 µL de agua destilada y se mezclaron nuevamente con vortex. Posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se dejó secar en una centrífuga de vacío durante 10 minutos. El pellet se resuspendió en buffer de carga 1X.

Las proteínas se separaron usando geles de poliacrilamida al 12% con SDS mediante los protocolos habituales y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por medio de procedimientos estándares. Una vez transferidas se dejaron secar completamente y se procedió a la tinción con el kit comercial Pro-Q Diamond phosphoprotein blot stain siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las imágenes se documentaron usando una cámara Polaroid 667 black and white film con un filtro fotográfico SYPRO (S-6656) y tiempo de exposición de 2-10 segundos. Una vez documentados los datos correspondientes al análisis de las fosfoproteínas, el blot se trató con el kit SYPRO Ruby protein blot stain para teñir proteínas totales según las recomendaciones del fabricante.

### 3.5.5 Aislamiento de rafts de membranas totales o membranas de Golgi.

Tanto las membranas totales como las membranas de Golgi, libres del aporte lisosomal, se incubaron durante 1 hora a 4°C en Triton X-100 al 1%, 25 mM MES, pH 7,00, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, e inhibidores de proteasas (CLAP: quemostatina, leupeptina, antipaina, pepstatina, cada uno de ellos a concentración final de 25 µg/mL). Los extractos se mezclaron con 90% P/V sacarosa en tampón MBS (25 mM MES, pH 7,00, 150 mM NaCl y CLAP) consiguiendo una concentración final de 60% P/V sacarosa. Sobre estas muestras se añadieron 4 ml de sacarosa al 35% P/V y 4 ml al 5% P/V, cuidando que no se mezclaran entre sí, para formar un gradiente discontinuo de densidad. Los tubos se ultracentrifugaron a 155.000 g durante 18 horas a 4°C (Optima L-100 XP Ultracentrifuge, rotor SW-41, Beckman Coulter) y los rafts se obtuvieron en las fracciones 4 y 5 del gradiente de densidad.

### 3.5.6 Extracción de lípidos y análisis por cromatografía de capa delgada (TLC) y Slot blot.

Las fracciones de membranas se obtuvieron de los distintos extractos de tejido o neuronales luego de un paso de centrifugación a 100.000 x g a 4°C durante 1 hora. Los lípidos se extrajeron de acuerdo al protocolo descrito por Bligh and Dyer (1959) y se analizaron por TLC en placas de silica gel HPTLC usando un sistema de doble solvente (Solvente hidrofílico: cloroformo/acetona/ácido acético/metanol/agua [50:20:10:10:5 V/V]; solvente hidrofóbico: hexano/acetato de etilo [5:2 V/V]). Soluciones estándares de colesterol, ceramida y SM (Sigma, St. Louis, MO) se cargaron en cada TLC para poder

identificar las diferentes especies lipídicas. GM1 se analizó por slot blot usando la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica conjugada con peroxidada (Sigma). La imágenes escaneadas de TLC o slot blot se cuantificaron usando el software *ImageJ* de NIH en condiciones de señal no saturada.

### **3.5.7 Cuantificación de lípidos por ensayos enzimáticos y HPLC.**

Se utilizaron diversos métodos para la cuantificación precisa de lípidos en extractos lipídicos obtenidos de hemisferios cerebrales o neuronas en cultivo mediante extracción en cloroformo/metanol/agua (1/2/0.8 V/V) y separación en fases en presencia de sales (Van Veldhoven & Bell, 1988). Se cuantificó la cantidad de fosfolípidos (mediante el método de fosfato orgánico; Van Veldhoven and Bell, 1988), de ceramida (por medio de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP y ceramida kinasa recombinante; Van Overloop y col., 2006) o de triglicéridos, colesterilésteres y colesterol (mediante separación en TLC (0.25 mm Silica gel 60, Merck, Rahway, NJ; usando un sistema solvente de hexano/dietileter/ácido acético 70:30:1 V/V) seguido de elución y cuantificación enzimática; Van Veldhoven y col., 1997; 1998). Colesterilésteres y triglicéridos fueron hidrolizados químicamente (5% de KOH 5 M en etanol a 75°C durante 90 minutos). El análisis de los SLs, incluida la esfingosina, se llevó a cabo en extractos a los que se añadió un estándar interno (C<sub>17</sub>-esfingonina, Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canada) y se cargaron en un cartucho hidrofóbico SPE (60 mg HLB-Oasis, Waters Associates, Millipore, Milford, MA). Los compuestos eluidos con metanol se derivatizaron con 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (Lester & Dickson, 2001) y se sometieron a SPE (100 mg NH<sub>2</sub>-

BondElut, Varian, Sunnyvale, CA) para separar las bases esfingoides derivatizadas de los SLs. Luego de dos pasos de hidrólisis selectiva las muestras se separaron por HPLC de fase reversa (columna de C18 Symmetry de 4.6 x 150; 5  $\mu$ m; 100 Å; agua) con un gradiente de metanol/acetonitrilo seguido de análisis fluorométrico (Van Veldhoven, datos no publicados).

### **3.5.8 Tratamiento de neuronas hipocampales con SM o SMasa.**

Una solución stock de SM se preparó en etanol/Me2SO 2:1 V/V como se describe en Puri y col., 2003 y se agregó a neuronas de ratones wt a los 8 DIV llegando a una concentración final de 40  $\mu$ g/ $\mu$ L. Treinta minutos antes de la adición de SM las neuronas fueron incubadas con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM para inhibir la actividad de la ASM (Testai y col., 2004). La SMasa bacteriana proveniente del *Bacillus aureus* (SIGMA) se agregó a neuronas de ratones ASMko a los 8 DIV a una concentración de 0.1 Unidades/100  $\mu$ L. Después de 48 horas de tratamiento con SM o SMasa, las células se recogieron para análisis bioquímico o se fijaron en 4% P/V PFA para estudios de inmunofluorescencia. La viabilidad celular se analizó midiendo los niveles de apoptosis por el método de TUNEL (Estus y col., 1997) en un total de 100 células para cada condición de tratamiento de cada cultivo independiente.

### **3.5.9 Ensayos de inmunofluorescencia.**

Para la marcación de lípidos de superficie las neuronas se incubaron con: la toxina lysenina conjugada con MBP (2,5  $\mu$ g/mL, gentilmente donada por el Dr. T. Kobayashi, RIKEN Institute, Saitama, Japón) que se une específicamente a SM

(Nakai y col., 2000; Shakor y col., 2003; Kiyokawa y col., 2004); con el antibiótico fluorescente Filipina (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , SIGMA) que se une específicamente al colesterol (Börnig & Geyer, 1974; Behnke y col., 1984); o con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica conjugada con fluoresceína (0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , SIGMA) que se une con alta afinidad a GM1 (Fishman y col., 1993; Orlandi y col., 1993). Se utilizó en todos los casos el protocolo de fijación con 4% P/V PFA sin permeabilización (ausencia de detergente) durante 15 minutos. Para visualizar específicamente la cantidad de SM presente en rafts de la MP, las neuronas se incubaron con 1% Triton X-100 en baño de hielo durante 5 minutos (Ledesma y col., 1998) luego de haber sido tratadas con Lysenin-MBP. Las células se fijaron e incubaron con un anticuerpo policlonal anti-MBP y un anticuerpo anti-conejo conjugado con Rodamina.

Para analizar la distribución polarizada de moléculas se realizaron inmunofluorescencias de doble marcación usando la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica conjugada con fluoresceína o el anticuerpo monoclonal anti-PrP<sup>C</sup>, APP, o TfRc en combinación con el anticuerpo policlonal anti-MAP2. Las células se fijaron en 4% P/V PFA y se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 durante 3 minutos para poder detectar MAP2. Un anticuerpo anti-ratón conjugado con fluoresceína y un anticuerpo anti-conejo conjugado con rodamina (Alexa, Molecular Probes, Eugene, OR) se utilizaron como anticuerpos secundarios.

La cuantificación se llevó a cabo en áreas seleccionadas aleatoriamente en cada neurita. Las imágenes de contraste de fase y las de marcación con MAP2 se utilizaron para diferenciar las áreas axonales de las dendríticas. La intensidad en Pixel proveniente de la marcación de GM1, PrP<sup>C</sup>, APP, o TfRc en

estas áreas se cuantificó usando el software ImageJ. Los valores de intensidad media se calcularon por unidad de área. Los datos se presentaron como el porcentaje promedio obtenido para los axones (procesos MAP2 negativos) versus dendritas (MAP2 positivos). Se analizaron entre 70 – 80 dendritas y 50 – 60 axones por cada condición experimental. Todas las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Leica (Deerfield, IL).

### **3.5.10 Ensayos de inmunomarcación *in-situ*.**

Cerebros de ratones wt y ASMko se fijaron por perfusión transcardiaca con 4% P/V PFA seguida de crioprotección en 30% P/V sacarosa. Secciones de 15 micras se obtuvieron usando un micrótopo de precisión (Leica RM2265), se lavaron en PBS durante 10 minutos y se incubaron con solución de bloqueo (2% FCS, 2% BSA y 0.2% gelatina de piel de pescado en PBS) y 0.5% Triton X-100 durante 30 minutos. Se incubó con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche, seguido de lavados con PBS e incubación con los anticuerpos secundarios anti-especie conjugados con fluoresceína y rodamina durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras una serie de lavados con PBS los cortes se montaron con Mowiol-DABCO y las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Leica.

### **3.5.11 Transfecciones, estudio de expresión y tráfico de GFP-GPI.**

Neuronas hipocampales maduras en cultivo (más de 8 DIV) de ratones wt y ASMko se transfectaron con un cDNA GFP-GPI usando fosfato de calcio como se describe en Köhrmann y col. (1999). Las células se fijaron con 4% P/V PFA a

diferentes tiempos post-transfección y se incubaron con un anticuerpo anti MAP2 para determinar la distribución polarizada del constructo GFP-GPI. Las muestras se examinaron en un microscopio de fluorescencia Leica. Las imágenes de contraste de fase y la marcación MAP2 se utilizaron para identificar inequívocamente las áreas dendríticas y axonales. Para la cuantificación, la intensidad media en pixel proveniente de la señal GFP-GPI en los segmentos proximales de las dendritas (distancia máxima de 20  $\mu\text{m}$  desde el cuerpo celular) y de los axones se calculó por unidad de área con el software ImageJ. Treinta neuronas de al menos dos cultivos independientes se analizaron para cada condición.

### **3.5.12 Ensayos de endocitosis.**

Neuronas maduras de ratones wt o ASMko con más de 8 DIV se incubaron durante 10 minutos con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica conjugada con fluoresceína, con la sonda FM 4-64 (Molecular Probes, T3166) o con el anticuerpo monoclonal PrP<sup>C</sup> (0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y el anticuerpo diluído 1:100, respectivamente). Las células se lavaron extensivamente, se fijaron con 4% P/V PFA y se permeabilizaron con 0.1% Triton-X100. Luego de la incubación con solución de bloqueo, se incubó con anticuerpos secundarios anti-especie conjugados con fluoresceína o rodamina (Alexa). Las muestras se examinaron en un microscopio confocal (LSM 510 en una plataforma Axiovert 100M). Se analizaron 15 neuronas de cada uno de 3 cultivos independientes por condición. Con el objetivo de evaluar el grado de internalización se cuantificaron los siguientes parámetros para FM 4-64, PrP<sup>C</sup> y GM1: número de

clusters, fluorescencia total asociada a todos los clusters, y fluorescencia y tamaño de cada cluster. Las mediciones se realizaron usando el software ImageJ y se expresaron como unidad de área en el cuerpo celular (excluyendo los clusters presentes en la periferia celular que se consideraron como estructuras de marcación de la superficie celular). Los datos se representaron como el promedio del número total de estructuras intracelulares en al menos 4 niveles diferentes de profundidad (Z: stacks) de cada cuerpo celular analizado.

### **3.5.13 Ensayos de actividad de RhoA y Cdc42.**

El kit EZ-Detect Rho Activation (Pierce, Rockford, IL) se utilizó para determinar la afinidad de RhoA a su efector, Rhotekin, que es directamente proporcional a la actividad de RhoA. El kit EZ-Detect Cdc42 Activation (Pierce) se utilizó para determinar la unión de Cdc42 al dominio PBD de la quinasa 1 activada p21 (Pak1), que sólo ocurre cuando Cdc42 está en su forma activa. Homogenatos frescos de cerebros provenientes de ratones adultos wt y ASMko conteniendo 500 µg de proteínas se procesaron en paralelo siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.5.14 Transfección de RhoA constitutivamente activo.**

Neuronas maduras ASMko de 8 DIV se transfectaron con la forma constitutivamente activa de RhoA (L63) clonada en el sitio BamHI-EcoRI del vector RFPC1, usando el Kit Effectene (Qiagen, Santa Clarita, CA). Quince horas pos-transfección neuronas vivas se incubaron durante 10 minutos con el



anticuerpo monoclonal anti-PrP<sup>C</sup>. Las neuronas eficientemente tranfectadas se identificaron por la señal roja proveniente de la proteína fluorescente roja (RFP) codificada por el vector. Los niveles de internalización de PrP<sup>C</sup> fueron comparados entre neuronas tranfectadas y no tranfectadas usando un microscopio confocal.

### 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa SPSS 17.0. Los gráficos representan los valores medios S.E.M. (error estándar de la media). La normalidad de los datos fue comprobada previamente mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En los casos en que la distribución fue normal o paramétrica se llevó a cabo una prueba t-de Student. En los casos en los que la distribución resultó ser no normal o no paramétrica se aplicó el test U de Mann Whitney. Para el estudio de la distribución de GFP-GPI en cultivos de neuronas en los que se analizaron varios grupos de datos (**Fig. 46**, pág 109) se utilizó ANOVA de dos vías. En todos los casos el resultado se consideró significativo cuando el valor  $p$  obtenido fue  $<0,05$ . En las gráficas se indica \* en valores  $p$  menores de 0,05 pero mayores que 0,01, \*\* en valores  $p$  menores de 0,01 pero mayores que 0,001 y \*\*\* en valores  $p$  menores de 0,001.

## 4. DESARROLLO y RESULTADOS

La primera evidencia de la participación de los rafts en la polarización neuronal se obtuvo analizando la distribución de la glicoproteína viral hemaglutinina y la proteína endógena Thy-1 en cultivos primarios de neuronas hipocámpales (Ledesma y col., 1998). La distribución axonal de estas moléculas se evitaba al disminuir los niveles de uno de los dos componentes lipídicos principales de rafts: el colesterol o la SM. Esta estrategia no afectaba sin embargo a proteínas dendríticas como la subunidad del receptor de glutamato (GluR1) (Ledesma y col., 1998) o el receptor de la transferrina (TfRc)(Ledesma y col., 1999), indicando la especificidad axonal de este mecanismo. Sin embargo, no todas las proteínas axonales necesitan de los rafts para polarizarse. Este es el caso de la proteína precursora del amiloide (APP), que aún teniendo una distribución axonal (Yamazaki y col., 1995), no está presente en estos dominios lipídicos (De Strooper y col., 1995; Abad-Rodríguez y col., 2004). Por ello, consideramos importante caracterizar otras proteínas con dependencia de rafts para su polarización con el doble objetivo de i) determinar que tan general es este mecanismo para proteínas axonales; y ii) generar herramientas que nos faciliten el estudio de los mecanismos moleculares para la polarización dependiente de rafts y las consecuencias de sus alteraciones.

## 4.1 CAPÍTULO I: LA PROTEINA PRIONICA (PrP<sup>C</sup>) COMO CANDIDATO PROTEICO PARA ANALIZAR POLARIZACION NEURONAL DEPENDIENTE DE RAFTS

### 4.1.1 Análisis de la distribución polarizada de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocampales de rata.

La proteína del prion (PrP<sup>C</sup>) juega un rol crucial en la enfermedad priónica (Bueler y col., 1993) ya que cambios en su conformación, que la transforman en la isoforma resistente a proteasas (PrP<sup>Sc</sup>), son necesarios para la propagación de la enfermedad (Prusiner, 1998). Muchos estudios se han enfocado en entender las implicancias patológicas de esta proteína pero se conoce muy poco sobre sus funciones fisiológicas. De hecho, aspectos básicos de la biología de PrP<sup>C</sup> como su localización en neuronas, células donde se expresa mayoritariamente (Kretzschmar y col., 1986), no estaban completamente definidos. Tampoco estaban claros aspectos del tráfico intracelular de PrP<sup>C</sup>. Si bien se sabía que esta proteína respondía a un rápido transporte axonal anterógrado en nervios del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) (Borchelt y col., 1994), se desconocían cuales eran los mecanismos que llevaban adelante este tipo de transporte.

La PrP<sup>C</sup> es una proteína anclada a la membrana por el grupo GPI (Borchelt y col., 1993; Taraboulos y col., 1995; Kaneko y col., 1997) quien, como se mencionó en la introducción, es una señal para la incorporación a rafts. Este mecanismo también lo presentan otras proteínas como por ejemplo Thy-1 que se distribuye específicamente en el axón de neuronas hipocampales maduras (Ledesma y col., 1998). Por ello postulamos que PrP<sup>C</sup> podría ser un buen candidato para analizar distribución axonal dependiente de rafts. Sin embargo, se ha descrito que PrP<sup>C</sup> en células epiteliales se transporta independientemente de estos dominios a la membrana basolateral (Sarnataro y col., 2002). Mas aún, se demostró que la distribución polarizada de proteínas-GPI en células

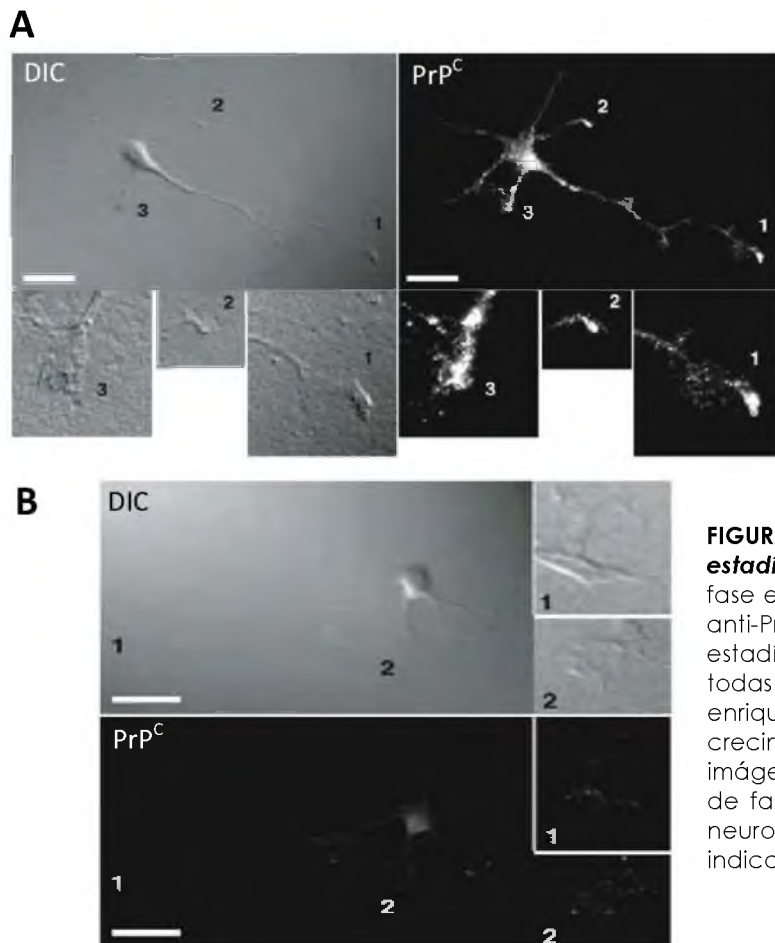
epiteliales depende de un proceso endocítico a nivel de la MP seguido de un evento de transcitosis más que del tráfico directo desde el TGN hacia la superficie celular (Polishchuck y col., 2004). Mientras eventos de endocitosis mediados por caveolina habían sido descritos para PrP<sup>C</sup> en fibroblastos, células gliales y células de neuroblastoma (Peters y col., 2003; Marella y col., 2002; Kaneko y col., 1997), otros estudios proponían que la internalización de PrP<sup>C</sup> en células de neuroblastoma y neuronas sensoriales se llevaría a cabo mediante vesículas cubiertas por clatrina (Sunyach y col., 2003).

Debido a todos estos datos contradictorios sobre el tráfico y distribución polarizada de PrP<sup>C</sup> y a la posibilidad de que los rafts estén involucrados en estos eventos en células neuronales, decidimos estudiar en detalle la distribución y el tráfico de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocampales durante su desarrollo y maduración.

Con estos objetivos realizamos inmunofluorescencias incubando neuronas fijadas en PFA al 4% P/V y permeabilizadas con Tritón X-100 a diferentes estadios del desarrollo con un anticuerpo específico anti-PrP<sup>C</sup> (ver materiales y métodos, apartado 3.4.7, pág. 34). Los resultados obtenidos en este análisis mostraron que en el estadio 3 de diferenciación, momento en el cual las neuronas presentan una polarización morfológica pero no molecular (Ledesma & Dotti, 2003), la cantidad de PrP<sup>C</sup> era similar en todas las neuritas (Cantidad de PrP<sup>C</sup> en neuritas más largas vs neuritas más cortas= 0,94; ver materiales y métodos, apartado 3.4.7, pág. 35) destacándose un enriquecimiento relativo (3 veces más) en los conos de crecimiento con respecto a los ejes de los procesos (Cantidad de PrP<sup>C</sup> en los ejes de los procesos vs la cantidad en los conos de crecimiento= 0,27) (**Fig. 9A**, N=3 cultivos independientes, 25 neuronas en estadio 3 de cada cultivo, \*\*\*p<0,001). Es importante resaltar que no encontramos diferencias significativas en la cantidad de PrP<sup>C</sup> entre los conos de crecimiento de los procesos más largos, los que luego se convertirán en el axón (Dotti y col., 1988) y los de

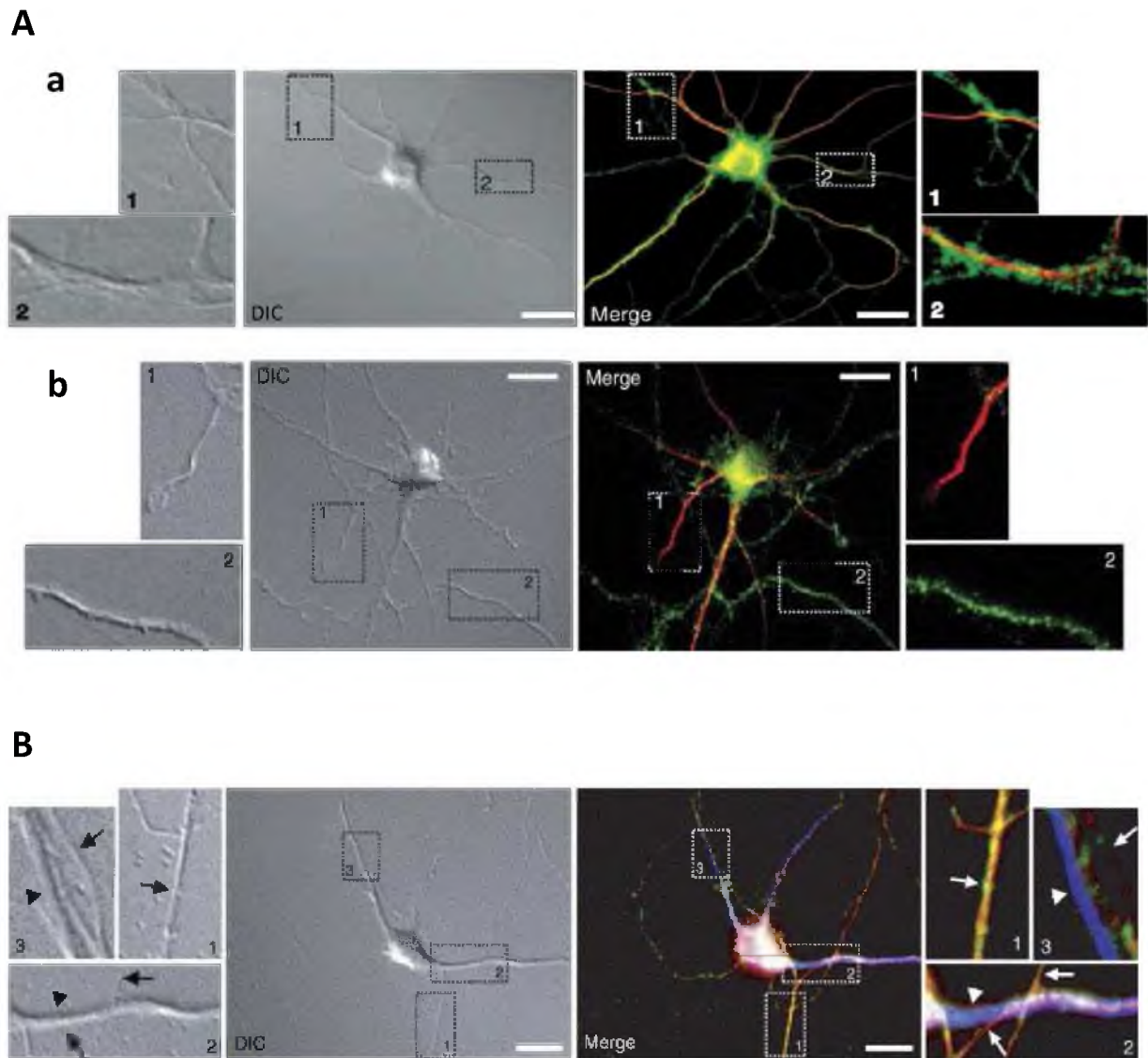
los procesos más cortos destinados a convertirse en dendritas (Cantidad de PrP<sup>C</sup> en cono de crecimiento de la neurita más larga vs la cantidad en cono de crecimiento de otras neuritas= 0,99) (**Fig. 9A**, N=3 cultivos independientes, 25 neuronas en estadio 3 de cada cultivo,  $p>0,05$ ).

A los fines de establecer más específicamente la localización de PrP<sup>C</sup> en la superficie neuronal, incubamos neuronas vivas con el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup> fijándolas posteriormente en PFA al 4% P/V y procesándolas para inmunofluorescencia sin permeabilizar. Este análisis reveló una intensidad de tinción significativamente menor a la obtenida en neuronas permeabilizadas (Cantidad de PrP<sup>C</sup> en la superficie neuronal vs la cantidad intracelular= 0,05) (comparar **Fig. 9A** con **Fig. 9B**, N=3 cultivos independientes, 25 neuronas en estadio 3 de cada cultivo,  $***p<0,001$ ) indicando que la mayor parte de PrP<sup>C</sup> es intracelular en neuronas hipocampales en estadio 3 del desarrollo.



**FIGURA 9. Distribución neuronal de PrP<sup>C</sup> en estadio 3 del desarrollo.** (A) Contraste de fase e inmunomarcación con el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup> de una neurona inmadura en estadio 3. La proteína está presente en todas las neuritas con un relativo enriquecimiento en los conos de crecimiento (como se muestra en las imágenes ampliadas 1; 2 y 3). (B) Contraste de fase y marcación de superficie de una neurona en estadio 3. Las barras blancas indican 10 μm.

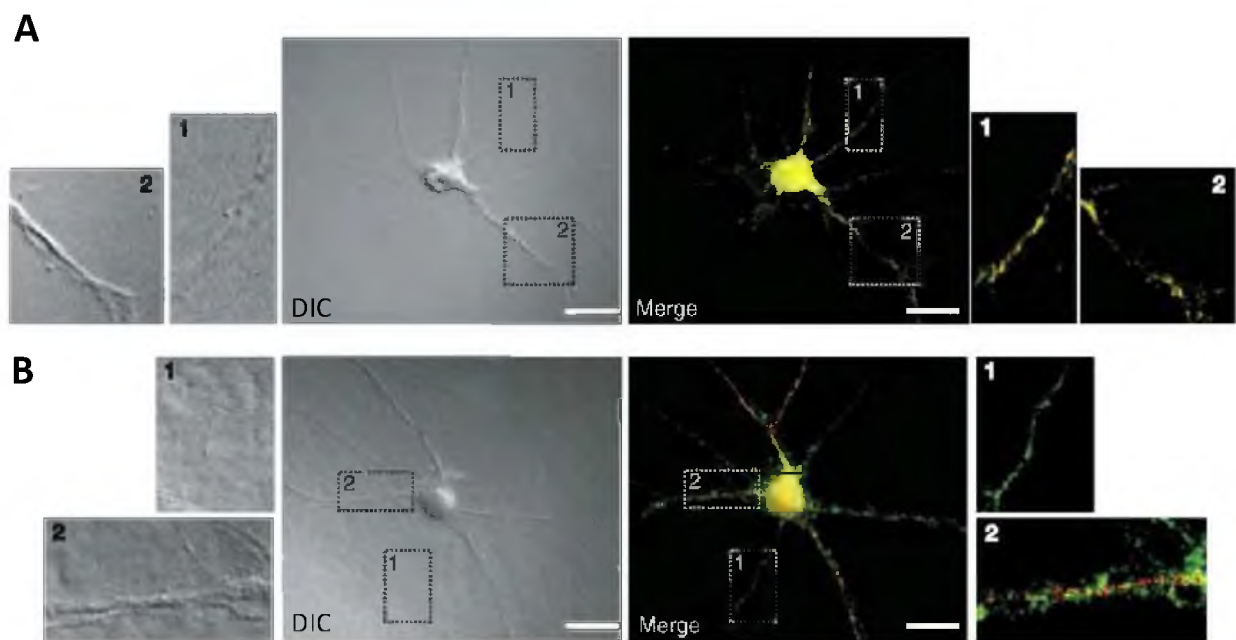
A continuación, analizamos la distribución de PrP<sup>C</sup> en neuronas mantenidas por más de una semana en cultivo, momento en el que la MP del axón y de las dendritas se diferencia molecular y funcionalmente (Estadío 5 del desarrollo) (Dotti y col., 1988; Ledesma & Dotti, 2003). En este caso la marcación de PrP<sup>C</sup> se restringía a una sola subpoblación de neuritas (**Fig. 10**). Para evaluar si esta distribución polarizada de PrP<sup>C</sup> correspondía a un enriquecimiento dendrítico o axonal, hicimos inmunofluorescencias con doble marcación usando el anticuerpo que reconoce PrP<sup>C</sup> y otro anticuerpo contra MAP2 que marca específicamente las dendritas. De los resultados obtenidos podemos concluir que PrP<sup>C</sup> se enriquece específicamente en el axón ya que no colocaliza con la proteína del citoesqueleto dendrítico MAP2 (Cantidad de PrP<sup>C</sup> en axones vs cantidad en dendritas= 9,1; ver materiales y métodos, apartado 3.4.7, pág. 35 y 36)(**Fig. 10Aa y b**, N=3 cultivos independientes, 70 a 80 dendritas y entre 50 y 60 axones de neuronas maduras en estadio 5 se analizaron para cada condición experimental, \*\*\* $p < 0,001$ ). Para confirmar la distribución específicamente axonal de PrP<sup>C</sup> en neuronas maduras, realizamos inmunofluorescencias de triple marcación usando anticuerpos contra PrP<sup>C</sup>, MAP2 y la proteína del citoesqueleto axonal Tau con la que PrP<sup>C</sup> colocaliza (Colocalización de PrP<sup>C</sup> con Tau=  $88 \pm 9\%$ ; ver materiales y métodos, apartado 3.4.7, pág. 35 y 36)(**Fig. 10B**, N=3 cultivos independientes, donde 70 a 80 dendritas y entre 50 y 60 axones de neuronas maduras en estadio 5 se analizaron para cada condición experimental,  $p > 0,05$ ).



**FIGURA 10. Polarización axonal de PrP<sup>C</sup> en neuronas en estadio 5 del desarrollo. (Aa y b)** Imágenes de contraste de fase e inmunofluorescencia de neuronas maduras permeabilizadas incubadas con anticuerpos anti-PrP<sup>C</sup> (verde) y MAP2 (rojo) mostrando la ausencia de PrP<sup>C</sup> en las dendritas marcadas con MAP2 y la presencia en procesos más delgados correspondientes a los axones. **(B)** Contraste de fase e inmunofluorescencia de triple marcación usando anticuerpos anti-PrP<sup>C</sup> (verde), MAP2 (azúl, indicado por las puntas de flecha) y la marcación de la proteína del citoesqueleto Tau (en rojo, indicadas por flechas). Para la detección simultanea de los anticuerpos monoclonales anti-PrP<sup>C</sup> y Tau se utilizó el kit comercial Zenon-mouse IgG labeling kit (Molecular probes). Las barras blancas indican 10  $\mu$ m.

Además de utilizar marcadores de citoesqueleto, comparamos la distribución de PrP<sup>C</sup> con proteínas de membrana axonal (Thy-1) y dendrítica (subunidad del receptor de glutamato, GluR1). El análisis cuantitativo reveló que el  $89 \pm 6\%$  de PrP<sup>C</sup> colocalizaba en los axones con Thy-1 (PrPc en axones vs dendritas= 8,2; ver materiales y métodos,

apartado 3.4.7, pág. 35 y 36)(**Fig. 11A**, N=3 cultivos independientes, donde 70 a 80 dendritas y entre 50 y 60 axones de neuronas maduras en estadio 5 se analizaron para cada condición experimental,  $***p<0,001$ ), mientras que no colocalizaba en dendritas con GluR1 (**Fig. 11B**, N=3 cultivos independientes, 70 a 80 dendritas y entre 50 y 60 axones de neuronas maduras en estadio 5 se analizaron para cada condición experimental,  $***p<0,001$ ).

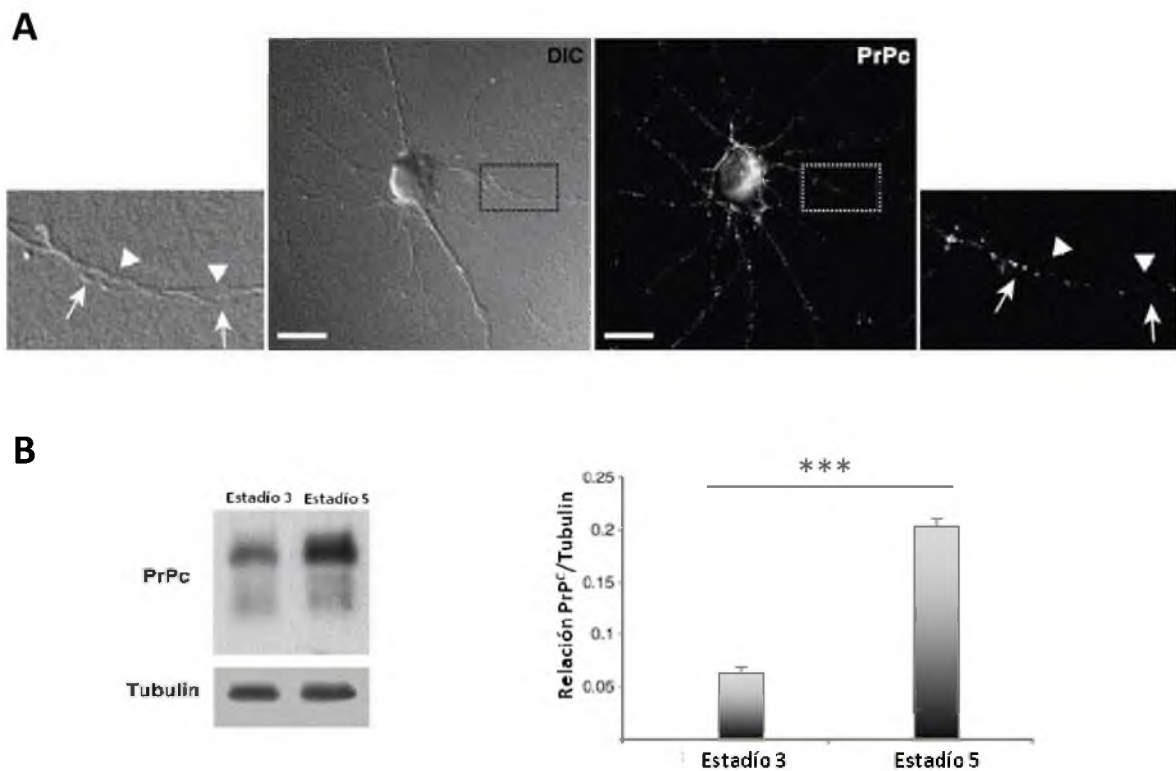


**FIGURA 11. Otras imágenes que confirman la polarización axonal de PrP<sup>C</sup> en neuronas maduras.** (A) Imágenes de contraste de fase e inmunofluorescencia de doble marcación de neuronas maduras permeabilizadas usando anticuerpos contra PrP<sup>C</sup> (verde) y Thy-1 (rojo) y (B) PrP<sup>C</sup> (verde) y receptor de glutamato (rojo). Las imágenes ampliadas de las regiones enmarcadas y enumeradas en los paneles A y B muestran en detalle la presencia de PrP<sup>C</sup> exclusivamente en los axones (también marcados por Thy-1) que se encuentran generalmente rodeando las dendritas (marcadas con el anticuerpo contra el receptor de glutamato). Las barras blancas indican 10  $\mu$ m.

De la misma manera que lo analizado en neuronas en estadio 3, quisimos determinar el marcaje en superficie de PrP<sup>C</sup> en neuronas maduras en estadio 5 no permeabilizadas. En este experimento observamos una intensa marcación a lo largo de los axones (Cantidad de PrP<sup>C</sup> en la superficie axonal vs la superficie dendrítica= 9,5;



ver materiales y métodos, apartado 3.4.7, pág. 35 y 36) (**Fig. 12A**, N=3 cultivos independientes, 70 a 80 dendritas y entre 50 y 60 axones de neuronas maduras en estadio 5 se analizaron para cada condición experimental,  $***p<0,001$ ). Junto con el hecho de que los niveles de expresión de PrP<sup>C</sup> se incrementaban significativamente en neuronas en estadio 5 con respecto a neuronas en estadio 3 (3 veces más, ver cuantificación en la Figura) (**Fig. 12B**, N=3 experimentos independientes, 40 µg de proteínas/100.000 células para cada condición,  $***p<0,001$ ), esta serie de resultados sugiere que PrP<sup>C</sup> está jugando un rol principalmente dependiente de membrana axonal.



**FIGURA. 12.** (A) Neuronas maduras incubadas durante 10 minutos a 12°C antes de ser fijadas con el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup>. Las imágenes ampliadas de las regiones enmarcadas muestran numerosos puntos de señal fluorescente en la superficie de los axones (flechas), pero no de las dendritas (puntas de flecha). Las barras blancas indican 10 µm. (B) Western blot de extractos totales con igual cantidad de proteínas totales (monitoreado con el anticuerpo anti-tubulina) de neuronas en estadio 3 y 5 usando anti-PrP<sup>C</sup>. El gráfico muestra la cuantificación de la cantidad relativa de PrP<sup>C</sup> normalizada frente a tubulina expresado como el valor medio ± e.s.

Para comprobar si la presencia en la MP correspondía a la sinapsis, realizamos dobles inmunofluorescencias con anticuerpos contra PrP<sup>C</sup> y la proteína sináptica, Synaptophysin. La falta de colocalización encontrada sugiere que PrP<sup>C</sup> no está enriquecida en las sinapsis de neuronas hipocámpales maduras (**Fig. 13**, N=3 cultivos independientes, 20 campos por experimento).



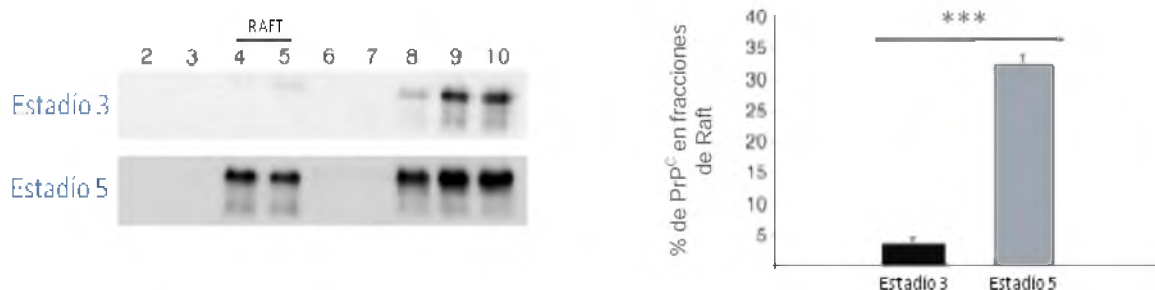
**FIGURA 13. Segregación axonal de PrP<sup>C</sup> y del marcador sináptico (Synaptophysin).** Imágenes de contraste de fase e inmunofluorescencias de doble marcación de neuronas maduras permeabilizadas usando anticuerpos contra PrP<sup>C</sup> (verde) y synaptophysin (rojo). Nótese la falta de colocalización entre los puntos positivos para PrP<sup>C</sup> (verde) con los puntos positivos en el canal rojo para Synaptophysin, sugiriendo que PrP<sup>C</sup> no está enriquecida en las sinapsis de neuronas hipocámpales maduras.

Este conjunto de resultados demuestra que mientras que en neuronas inmaduras en estadio 3 la expresión de PrP<sup>C</sup> presenta niveles bajos, es predominantemente intracelular y no está polarizada, la situación cambia significativamente en neuronas maduras en estadio 5 donde PrP<sup>C</sup> tiene niveles de expresión más altos y una distribución axonal enriquecida en membranas no sinápticas.

#### 4.1.2 Asociación de PrP<sup>C</sup> a rafts en neuronas hipocampales.

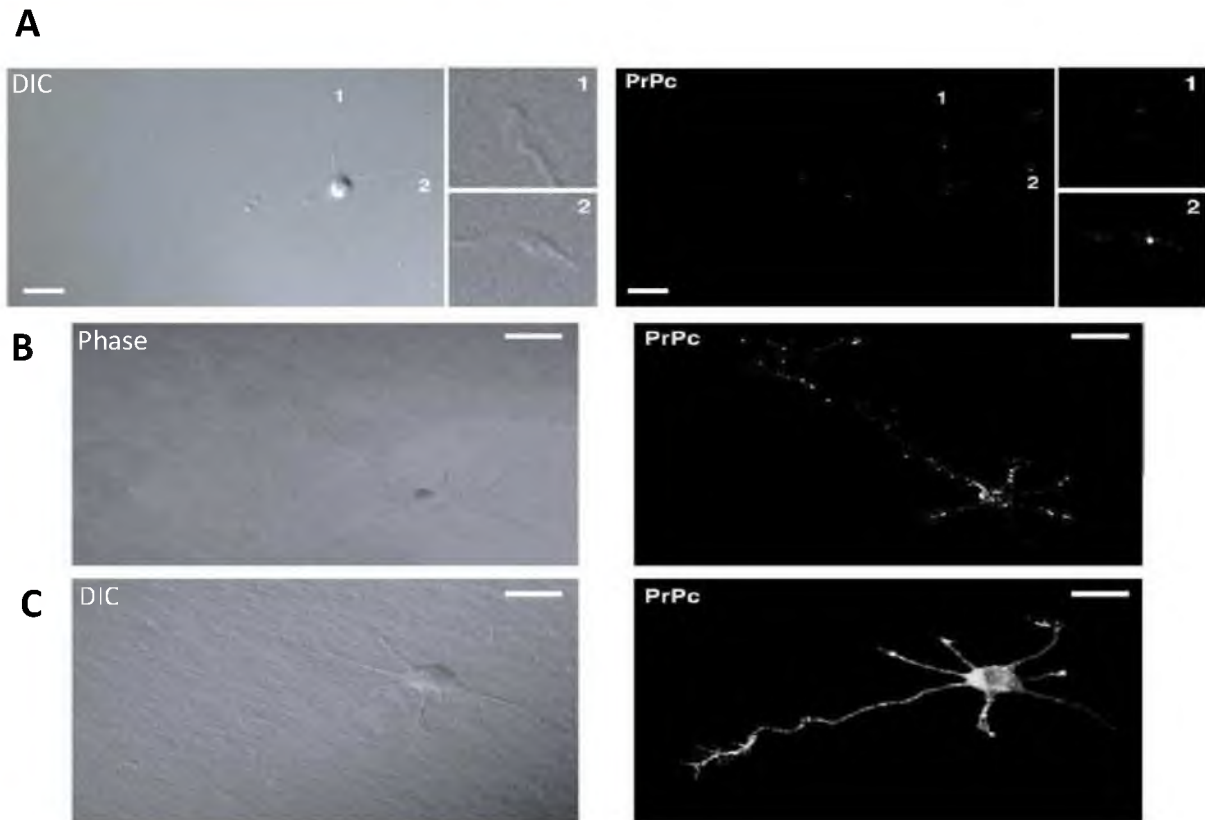
La presencia de PrP<sup>C</sup> en rafts se ha demostrado en distintos tipos celulares como fibroblastos (Priola & Chesebro, 1998) y células de neuroblastoma (Taraboulos y col., 1995; Gorodinsky & Harris, 1995; Naslavsky y col., 1999). Estas observaciones junto con el papel de los rafts en la distribución polarizada de ciertas proteínas (Parton & Hancock, 2004), nos llevó a investigar si el enriquecimiento axonal de PrP<sup>C</sup> observado en neuronas hipocampales maduras dependía de estos dominios lipídicos.

Con este objetivo analizamos la presencia de PrP<sup>C</sup> en rafts a lo largo del desarrollo neuronal por métodos bioquímicos y por microscopía. El análisis bioquímico en gradientes de densidad (ver materiales y métodos, apartado 3.4.1, pág.31) en neuronas inmaduras (estadio 3), donde PrP<sup>C</sup> aún no está polarizado, reveló que sólo una pequeña cantidad del PrP<sup>C</sup> total ( $3,4 \pm 1\%$ ) se encontraba asociada a las fracciones ligeras del gradiente con membranas insolubles en detergente no iónico correspondientes a rafts. Sin embargo, la cantidad de PrP<sup>C</sup> asociada a rafts se incrementaba significativamente ( $32 \pm 1,7\%$ ) en neuronas maduras en estadio 5 (**Fig. 14**, N=3 cultivos independientes, 200 µg de proteínas/100.000 células de cada cultivo para cada estadio,  $***p < 0,001$ ).



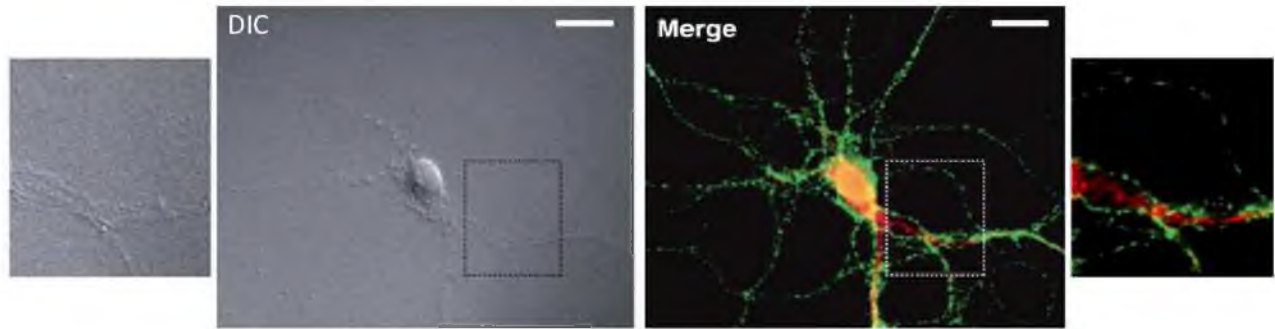
**FIGURA 14. Presencia de PrP<sup>C</sup> en rafts a lo largo del desarrollo neuronal.** Análisis de Western blot usando un anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup> sobre gradientes de sacarosa provenientes de extractos totales de neuronas en estadio 3 y 5 luego de haber sido extraídas con 1% Triton X-100 a 4°C. La cuantificación del porcentaje de PrP<sup>C</sup> presente en rafts (fracciones 4 y 5 del gradiente) de los tres cultivos independientes se muestra en el gráfico.

Para determinar específicamente la presencia de PrP<sup>C</sup> en rafts de la MP, analizamos la insolubilidad de PrP<sup>C</sup> por inmunofluorescencia. Las neuronas en cultivo se incubaron con el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup> y se trataron con detergente no iónico a baja temperatura antes de ser fijadas en PFA al 4% P/V (ver materiales y métodos, apartado 3.4.7, pág. 34). Este tipo de análisis permite estudiar *in-situ* la presencia de proteínas en rafts de la superficie neuronal (Ledesma y col., 1998). En este experimento no observamos señal correspondiente a PrP<sup>C</sup> en la superficie celular de neuronas en estadio 3 (**Fig. 15A**). Cuando realizamos una extracción con detergente no iónico a baja temperatura antes de incubar las células con el anticuerpo específico, lo que nos permitía detectar PrP<sup>C</sup> en rafts intracelulares, evidenciamos una marcación muy leve (**Fig. 15B**). El análisis comparativo de este experimento con el de neuronas permeabilizadas, pero no extraídas con detergente no iónico en frío (**Fig. 15C**), reveló que sólo el  $3,5 \pm 0,7\%$  de PrP<sup>C</sup> intracelular estaba en rafts (N=3 cultivos independientes, 25 neuronas de cada cultivo, \*\*\* $p < 0.001$ ). Estos resultados demuestran que la baja cantidad de PrP<sup>C</sup> en rafts en neuronas en estadio 3 proviene de compartimientos intracelulares y no de la superficie celular.



**FIGURA 15. Presencia de PrP<sup>C</sup> en rafts de la MP en neuronas hipocámpales inmaduras (Estadío 3).** Imágenes de contraste de fase e inmunofluorescencia de neuronas en estadio 3 en las siguientes condiciones: **(A)** incubadas con anti-PrP<sup>C</sup> y extraídas por 5 minutos con 1% Triton X-100 a 4°C antes de ser fijadas para detectar rafts de la superficie celular. **(B)** Neuronas extraídas por 5 minutos con 1% Triton X-100 a 4°C antes de incubarlas con el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup> para detectar rafts intracelulares. **(C)** Neuronas permeabilizadas con 0,1% Triton X-100 durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido de una incubación con el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup> para marcar PrP<sup>C</sup> total. Las barras en blanco indican 10 μm.

Por el contrario, en neuronas en estadio 5 la tinción de PrP<sup>C</sup> era evidente en la superficie de los axones de neuronas extraídas con detergente a 4°C representando el  $89 \pm 7\%$  del total observado en neuronas no extraídas (**Fig. 16**, N=3 cultivos independientes, 25 neuronas de cada cultivo,  $***p < 0,001$ ). Estos resultados mostraron que, al contrario que en neuronas en estadio 3, la mayor parte de PrP<sup>C</sup> en neuronas en estadio 5 está en rafts de la MP axonal. Los resultados indicaban además que la polarización y la partición en rafts de PrP<sup>C</sup> se adquirirían en paralelo a lo largo del desarrollo neuronal.

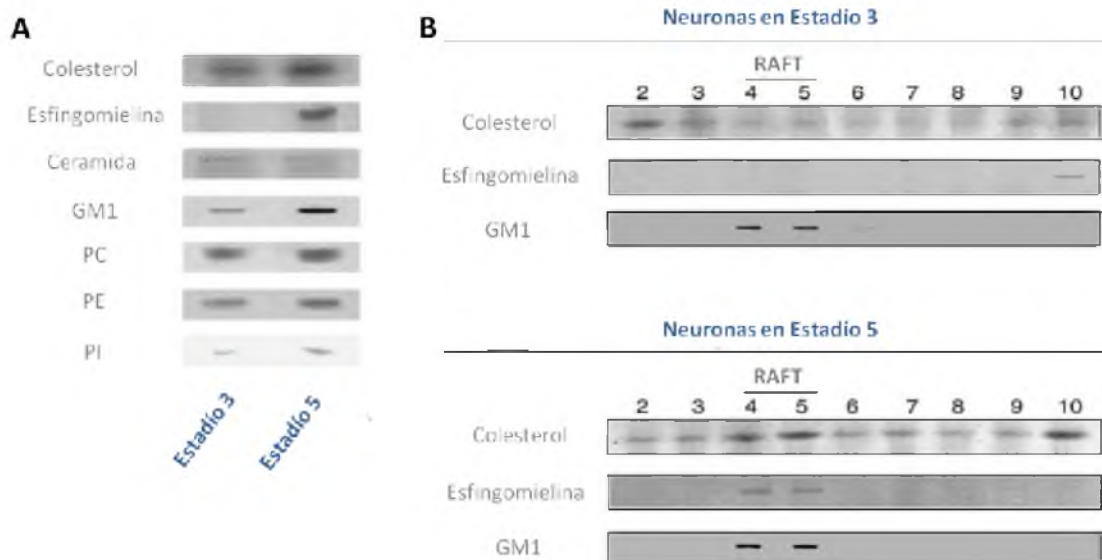


**FIGURA 16. Presencia de PrP<sup>C</sup> en rafts de la MP en neuronas hipocámpales maduras (Estadío 5).** Contraste de fase e inmunofluorescencia de neuronas en estadio 5 incubadas con anti-PrP<sup>C</sup> y extraídas con 1% Triton X-100 durante 5 minutos a 4°C antes de ser fijadas. Marcación de MAP2 con un anticuerpo específico (en rojo) fue utilizado para diferenciar las dendritas. La imagen ampliada de la región enmarcada muestra en detalle la presencia de PrP<sup>C</sup> en rafts de la superficie axonal que se encuentran generalmente rodeado las dendritas marcadas con el anticuerpo contra MAP2 en rojo. Las barras en blanco indican 10 μm.

Frente a la evidencia de una ausencia casi total de PrP<sup>C</sup> en rafts de neuronas en estadio 3, nos planteamos investigar si esto se debía a una escasez de estos dominios lipídicos o a que la proteína era incapaz de incorporarse a ellos. Los bajos niveles de SM detectados en extractos totales de neuronas en estadio 3 en comparación con neuronas en estadio 5 (Ledesma y col., 1999; ver también **Fig. 17A**) apoyaban la primera opción. Con el fin de resolver este planteamiento, comparamos por TLC y slot blot la cantidad de lípidos constitutivos de rafts: colesterol, SM, GM1 y ceramida, en extractos totales y en rafts en ambos estadios del desarrollo neuronal. El análisis lipídico de extractos totales, normalizados por la misma cantidad de proteína, reveló una menor cantidad de GM1 (1,7 veces menos) y de SM (2,3 veces menos) en neuronas inmaduras respecto a las maduras (**Fig. 17A**), mientras que los niveles de colesterol y ceramida no mostraron diferencias significativas. El contenido de los fosfolípidos PC, PE y PI tampoco mostró cambios (ver materiales y métodos, apartado 3.4.6, pág. 33 y 34)

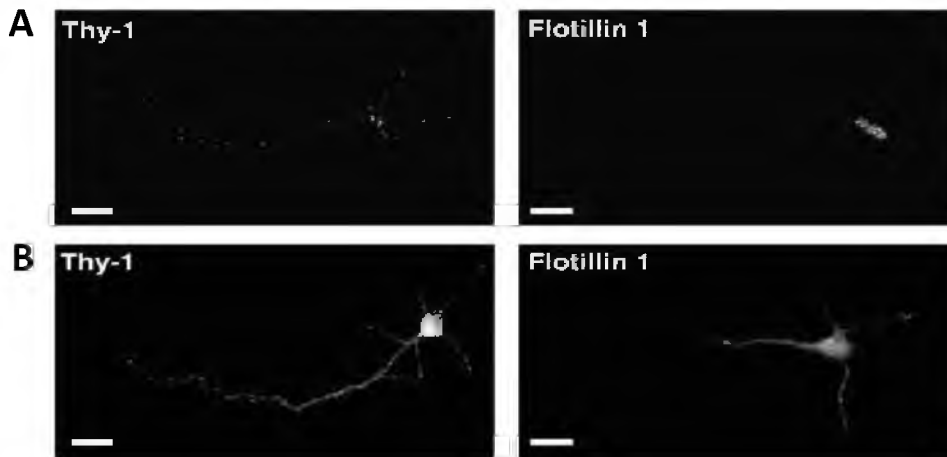
(Fig. 17A, N=3 cultivos independientes, 40 µg de proteínas/100.000 células de cada cultivo para ambos estadíos, \*\*\*p<0,001).

El análisis del contenido lipídico de rafts por TLC de fracciones del gradiente después de extracción con detergente reveló una cantidad muy pequeña de colesterol y SM en neuronas en estadio 3 comparado con estadio 5 (Fig. 17B N=3 cultivos independientes, 200 µg de proteínas/100.000 células de cada cultivo para ambos estadíos, \*\*\*p<0,001).



**FIGURA 17. Imágenes de TLC y slot blots de extractos totales y gradientes de densidad.** Análisis lipídico por TLC o slot blot en extractos totales (A) y gradientes de sacarosa (B) de neuronas en estadio 3 y 5 extraídas con detergente frío. La misma cantidad de proteínas totales (40 µg para extractos totales y 200 µg para gradientes) fueron usadas como punto de partida en ambos estadíos. La falta de incorporación de PrP<sup>C</sup> dentro de los rafts en neuronas en estadio 3 se correlacionaría con la pobre habilidad que poseen estas células de ensamblar estos microdominios de membrana.

Más aun, ensayos de inmunofluorescencia sobre neuronas en estadio 3 permeabilizadas, tratadas (**Fig. 18A**) o sin tratar con detergente no iónico a 4°C (**Fig. 18B**), usando anticuerpos contra proteínas marcadoras de rafts como Thy-1 y Flotillin1, mostraron que su presencia en estos dominios lipídicos también era muy baja.

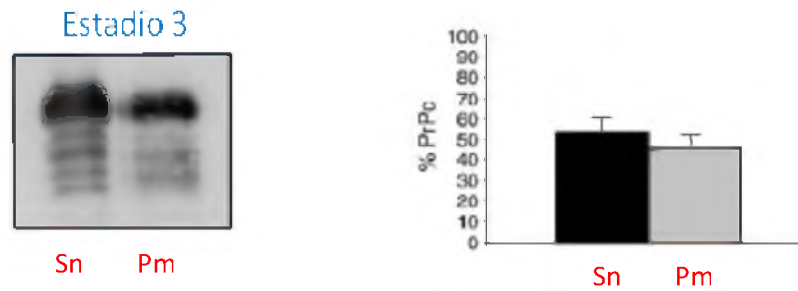


**FIGURA 18. Ensayos de inmunofluorescencias que muestran la falta de incorporación de Thy-1 en rafts de neuronas en estadio 3.** Inmunofluorescencias de neuronas en estadio 3 extraídas con detergente frío (**A**) y no extraídas pero sí permeabilizadas (**B**) usando anticuerpos anti-Thy-1 y Flotillin1. Las barras blancas indican 10 μm.

Aunque estos resultados apuntaban a una formación de rafts deficiente en neuronas inmaduras como causa de la falta de incorporación de PrP<sup>C</sup> a estos dominios, investigamos si la unión a membrana y por lo tanto el procesamiento de PrP<sup>C</sup> estaba alterado. Experimentos de centrifugación a alta velocidad (ver leyenda de la Fig. 19), revelaron que aproximadamente la mitad del contenido total de PrP<sup>C</sup> ( $46,5\% \pm 5$ ) se encontraba unido a membranas, indicando que el anclaje a través del grupo GPI, una de las señales de orientación a rafts, se adquiere con normalidad en



neuronas inmaduras (**Fig. 19**, N=3 cultivos independientes, 40  $\mu$ g de proteínas/100.000 células de cada cultivo,  $p>0,05$ ).

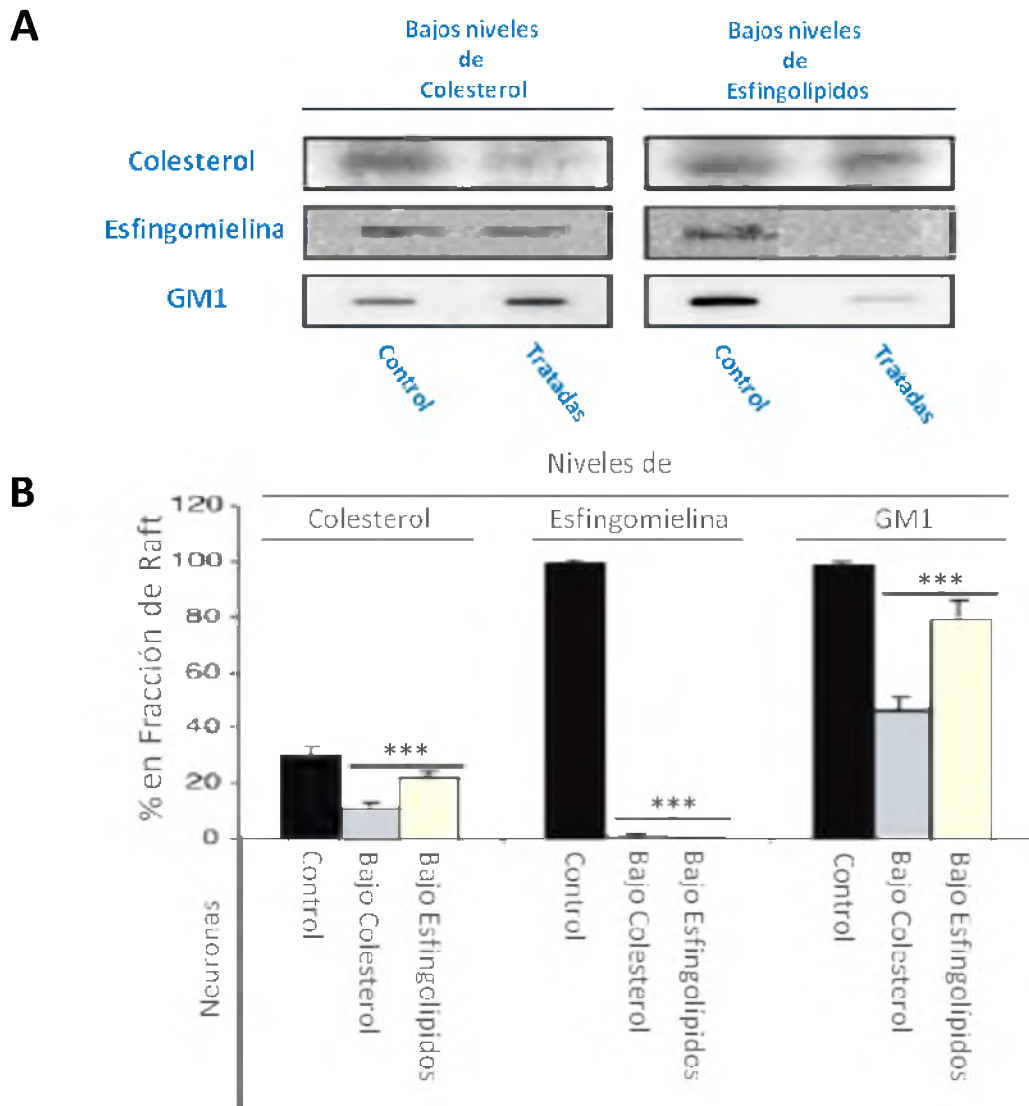


**FIGURA 19. Imagen de Western blot y cuantificación de la unión a membrana de PrP<sup>C</sup> en neuronas en estadio 3.** Análisis de Western blot, usando el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup>, del sobrenadante (Sn) y del pellet de membranas (Pm) obtenido luego de centrifugar a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C el extracto total de neuronas en estadio 3. El gráfico de la derecha muestra la cuantificación del porcentaje de PrP<sup>C</sup> presente en el sobrenadante y en el pellet de membranas.

Estos resultados permiten concluir que la ausencia casi total de PrP<sup>C</sup> en rafts de neuronas en estadio 3 se debe a la pobre capacidad que tienen estas neuronas para ensamblar rafts debido a los bajos niveles de algunos de sus componentes lipídicos y no a una deficiencia en el procesamiento de PrP<sup>C</sup>.

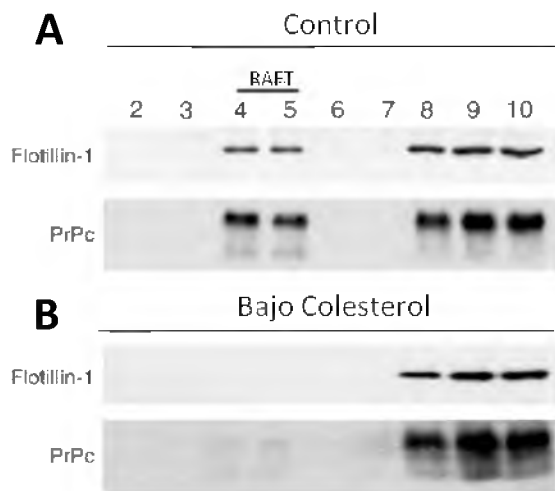
#### 4.1.3 Importancia de los rafts en la distribución axonal de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocampales maduras: efecto de la modulación del colesterol.

Con el objetivo de comprender el rol que juegan los rafts en la distribución polarizada de PrP<sup>C</sup> en neuronas en estadio 5 decidimos analizar, tanto por bioquímica como por microscopía, el efecto de la reducción de los niveles de sus principales componentes lipídicos en este evento celular. Para reducir el colesterol las neuronas hipocampales en cultivo se trataron durante varios días con dosis bajas (ver materiales y métodos, apartado 3.4.3, pág. 32) de un inhibidor de la síntesis de este lípido, la mevilonina (James y col., 1959; Soma y col., 1992), y con una droga que lo secuestra de la membrana, la metil- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) (Ohvo & Slotte, 1996; Yancey y col., 1996; Atger y col., 1997; Ohvo y col., 2000). Este tratamiento induce una moderada pero significativa reducción del colesterol de membrana ( $28 \pm 4\%$ ), sin afectar ninguno de los siguientes parámetros: i) morfología celular, ii) supervivencia celular (niveles de apoptosis:  $8 \pm 2\%$ , comparado con los niveles en neuronas control:  $10 \pm 2,6\%$ , ver materiales y métodos, apartado 3.4.5, pág 33), iii) cantidad de proteínas totales de membrana ( $40 \pm 9 \mu\text{g}$  de proteína/100.000 células), y iv) distribución de proteínas del citoesqueleto y sinápticas (Ledesma y col., 2003). Comprobamos además la especificidad de este tratamiento sobre el colesterol ya que no alteraba los niveles totales de SM ni de GM1 (**Fig. 20A**). Sin embargo, esta aproximación experimental llevó a la disrupción de rafts que sólo retuvieron el  $11 \pm 2\%$  y  $46 \pm 5\%$  del total de colesterol y GM1, respectivamente, mientras que la SM no era ni siquiera detectable. En neuronas no tratadas estos porcentajes fueron de  $30 \pm 3\%$ ,  $99 \pm 1\%$  y  $99 \pm 4\%$ , respectivamente (ver materiales y métodos, apartado 3.4.6, pág. 33)(**Fig. 20B**, N=3 cultivos independientes,  $200 \mu\text{g}$  de proteínas/100.000 células de cada cultivo para ambos estadios,  $***p<0,001$ ).



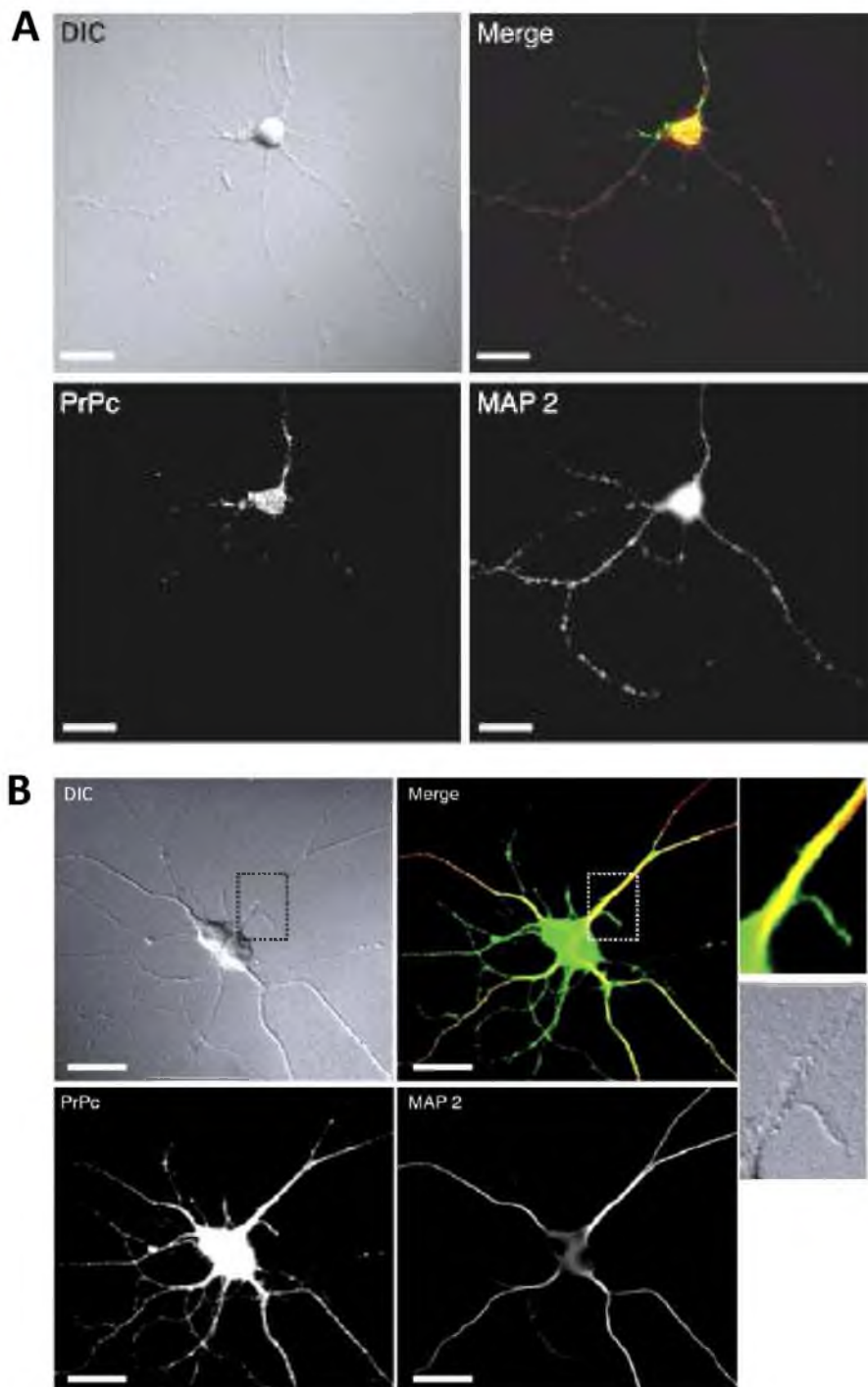
**FIGURA 20. Modulación de los niveles de los principales componentes lipídicos de rafts en neuronas hipocampales maduras.** (A) Análisis de TLC mostrando la cantidad de colesterol y SM, o slot blot mostrando la cantidad de GM1, en extractos totales de neuronas en estadio 5 no tratadas (control) o tratadas con mevilonina y MCD (bajos niveles de colesterol) o con Fumonisina B1 (bajos niveles de esfingolípidos). (B) Gráficos mostrando el porcentaje de colesterol, SM y GM1 en las fracciones de rafts de neuronas en estadio 5 no tratadas (control) o tratadas con mevilonina y MCD (bajo colesterol) o con Fumonisina B1 (bajo esfingolípidos).

La desorganización de los rafts después del tratamiento reductor de colesterol también fue evidenciada por el desplazamiento de los marcadores proteicos, Flotillin1 y PrP<sup>C</sup>, hacia las fracciones solubles en detergentes de los gradientes de densidad (Figs. 21A y B).



**FIGURA 21. Western blots mostrando la desorganización de rafts por el uso de drogas reductoras de colesterol.** Western blots usando anticuerpos anti-Flotillin1 y anti-PrP<sup>C</sup> en gradientes de sacarosa de neuronas en estadio 5 no tratadas (A, control) o tratadas con mevilonina y MCD (B, bajo colesterol).

El desplazamiento de PrP<sup>C</sup> de los dominios insolubles fue confirmado *in-situ* por la falta de detección de este marcador en la MP de neuronas con bajos niveles de colesterol expuestas a Triton X-100 a baja temperatura (Fig. 22A). De acuerdo con la hipótesis de que PrP<sup>C</sup> necesita de los rafts para polarizarse al axón en neuronas hipocampales maduras observamos que la reducción de los niveles de colesterol daba lugar a una distribución no polarizada de PrP<sup>C</sup> que aparece tanto en axones como en dendritas (PrP<sup>C</sup> en Axones vs Dendritas= 1,03), en contraste con la localización exclusivamente axonal en neuronas no tratadas (Fig. 22B, N=3 cultivos independientes, 25 neuronas tratadas,  $p > 0,05$ ).



**FIGURA 22. Imágenes mostrando como la disminución de los niveles de colesterol causa alteraciones de los rafts y una errónea distribución dendrítica de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocámpales maduras. (A)** Inmunofluorescencia de neuronas en estadio 5 con bajo contenido de colesterol incubadas con anti-PrP<sup>C</sup> seguido de extracción con 1% Triton X-100 durante 5 minutos a 4°C. **(B)** Contraste de fase e inmunofluorescencia de doble marcación usando anticuerpos anti-PrP<sup>C</sup> (verde) y anti-MAP2 (rojo) de neuronas en estadio 5 con bajo contenido de colesterol. PrP<sup>C</sup> está presente no sólo en los axones sino que también aparece en las dendritas colocalizando con MAP2 (ver imágenes aumentadas y **Fig. 10A y B**, para comparar con la situación control). Las barras blancas indican 10 µm.

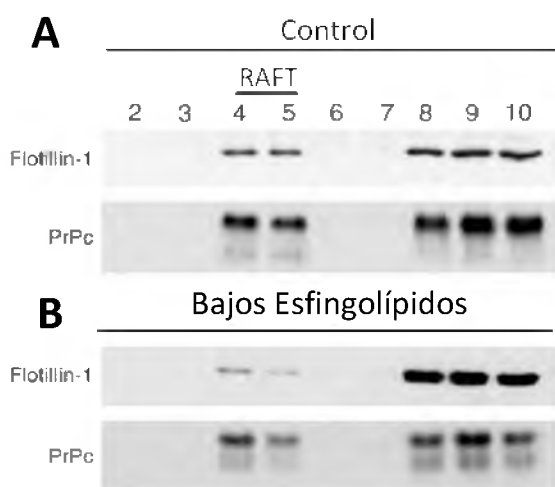
En conjunto, estos resultados demuestran que la distribución axonal de PrP<sup>C</sup> y su asociación a rafts dependen de los niveles de colesterol de membrana.

#### 4.1.4 Importancia de los rafts en la distribución axonal de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocampales maduras: efecto de la modulación de los esfingolípidos.

Entre las cuestiones planteadas en esta tesis, cuya respuesta ayudaría a entender los mecanismos moleculares por los que los rafts determinan la polaridad de ciertas proteínas, está la de analizar específicamente la contribución de los distintos lípidos que componen estos microdominios. Junto al colesterol, los SLs y particularmente la SM son los componentes lipídicos mayoritarios de los rafts (Hanada y col., 1995; London & Brown, 2000). Por ello, decidimos investigar la contribución de los SLs en la polarización de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocampales. Además, pretendimos aclarar la relación de estos lípidos con la insolubilidad de dicha proteína en neuronas ya que existían evidencias contradictorias en otros tipos celulares. Así, mientras estudios en células de neuroblastoma revelaron que la partición de PrP<sup>C</sup> en rafts dependía sólo de colesterol y no de los SLs (Taraboulos y col., 1995; Naslavsky y col., 1999), análisis en células epiteliales demostraron que la disminución de los niveles de SLs sí afectaba a la insolubilidad de PrP<sup>C</sup> (Sarnataro y col., 2004).

En nuestros experimentos llevamos a cabo tratamientos a largo plazo (ver materiales y métodos, apartado 3.4.4, pág. 32) de neuronas hipocampales con el inhibidor de la síntesis de SLs, Fumonisin B1 (FB1) (Ramamamv y col., 1995). Comprobamos que dicho tratamiento no afectaba la viabilidad celular (niveles de apoptosis:  $12 \pm 3,1\%$ , comparado con los niveles en neuronas control:  $10 \pm 2,6\%$ , ver materiales y métodos, apartado 3.4.5, pág. 33), ni los niveles de colesterol total pero sí reducía los niveles de SLs (SM y GM1) en extractos totales de neuronas (**Fig. 20A**). Así, mientras el  $22 \pm 2\%$ ,  $0\%$  y  $79 \pm 7\%$  del total de colesterol, SM y GM1, respectivamente, estaban en rafts de neuronas tratadas con FB1 (ver materiales y métodos, apartado 3.4.6, pág. 33), estos porcentajes se incrementaban a  $30 \pm 3\%$ ,  $99,5 \pm 1\%$  y  $99 \pm 1\%$  en células no tratadas (**Fig. 20B**, N=3 cultivos independientes, 200  $\mu$ g de proteínas/100.000

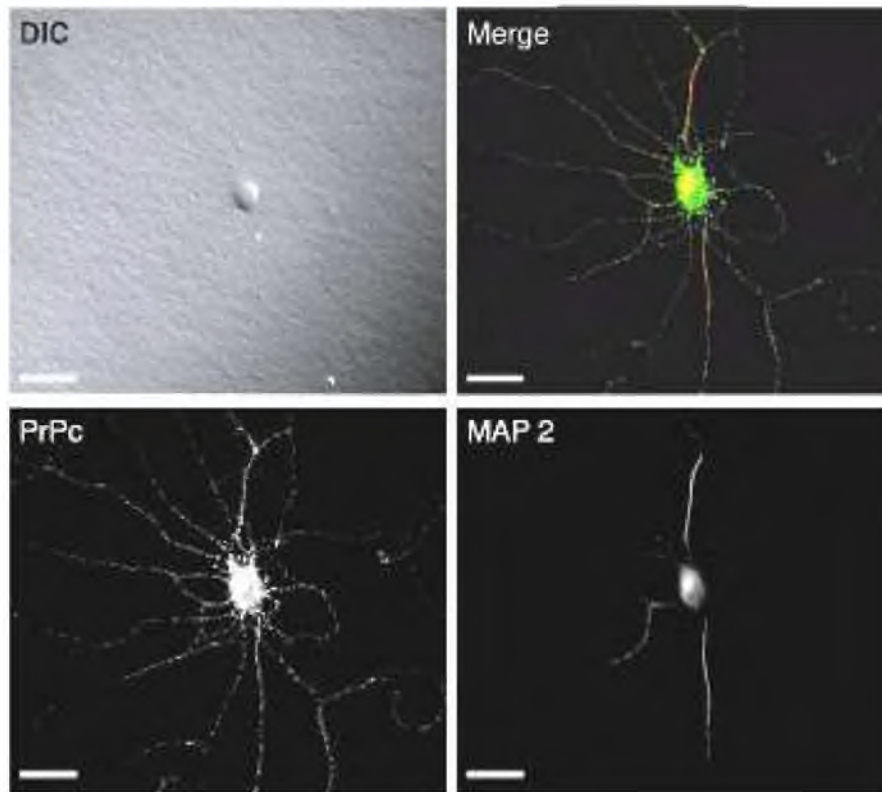
células de cada cultivo para ambos estadíos,  $***p < 0,001$ ). A pesar de estos cambios en la composición lipídica, que evidenciaban la disrupción de los rafts, la incubación con FB1 no alteró significativamente la insolubilidad de PrP<sup>C</sup> de neuronas hipocampales maduras luego de la extracción con Triton X-100 en frío. Mientras que sólo el  $1,8 \pm 0,5\%$  de Flotillin1 permanecía en rafts (ver materiales y métodos, apartado 3.4.8, pág. 36), siendo esto indicativo de la alteración en la composición proteica de estos microdominios post tratamiento, un  $30,5 \pm 1,5\%$  de PrP<sup>C</sup> (porcentaje similar al de neuronas no tratadas) se encontró presente en estos dominios (Figs. 23A y B, N=3 cultivos independientes, 200 µg de proteínas/100.000 células de cada cultivo tanto para la condición control como tratadas,  $**p < 0,01$ ).



**FIGURA 23. Western blots mostrando la desorganización de rafts por el uso de drogas reductoras de esfingolípidos.** Western blots usando anticuerpos anti-Flotillin1 y anti-PrP<sup>C</sup> en gradientes de sacarosa de neuronas en estadio 5 no tratadas (A, control) o tratadas con Fumonisin B1 (B, bajos esfingolípidos).

De acuerdo con esto, ensayos de inmunofluorescencias realizados sobre neuronas extraídas con Triton X-100 en frío después de la incubación con FB1, no revelaron cambios en el nivel de PrP<sup>C</sup> en la superficie axonal con respecto a neuronas no tratadas (Cantidad de PrP<sup>C</sup> en rafts de la superficie axonal de neuronas tratadas:  $80 \pm$

4% del total observado en neuronas tratadas pero sin extraer, ver materiales y métodos, apartado 3.4.7, pág. 35 y 36)(**Fig. 24**, N=3 cultivos independientes, 25 neuronas de cada cultivo, tanto en condición control como tratadas,  $p>0,05$ ).

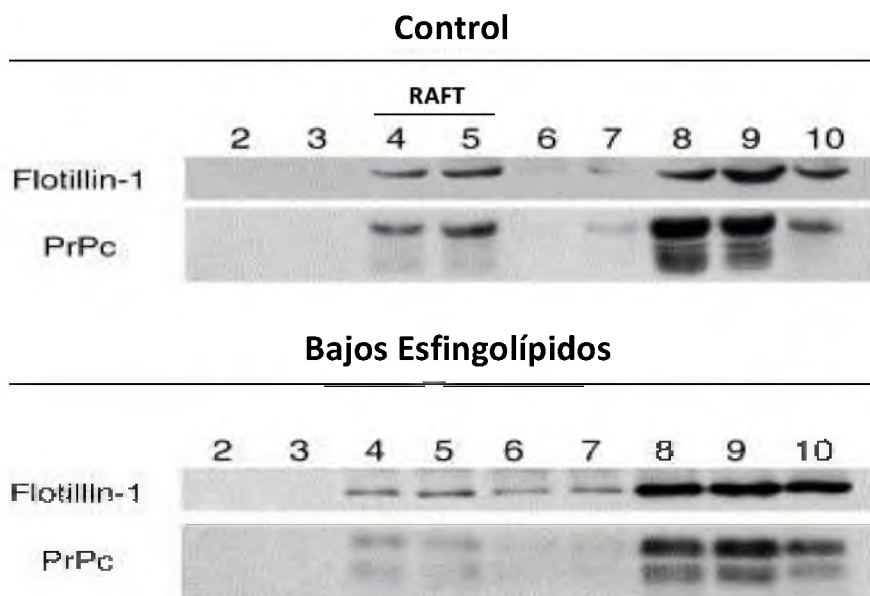


**FIGURA 24. Inmunofluorescencias de neuronas en estadio 5 con bajo contenido de SLs.** Neuronas incubadas con anti-PrP<sup>C</sup> seguido de extracción con 1% Triton X-100 durante 5 minutos a 4°C. Las barras blancas indican 10  $\mu$ m.

Los resultados anteriores indican que si bien los SLs parecen no ser esenciales para la insolubilidad de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocámpales, sí son necesarios para una correcta organización y composición de los rafts. Esto último, se confirmó aislando rafts mediante un método independiente de la extracción con detergente no iónico basado en la sonicación (Smart y col., 1995 y materiales y métodos, apartado 3.4.2, pág. 32)(**Fig. 25**). Este experimento reveló el desplazamiento de ambos marcadores de



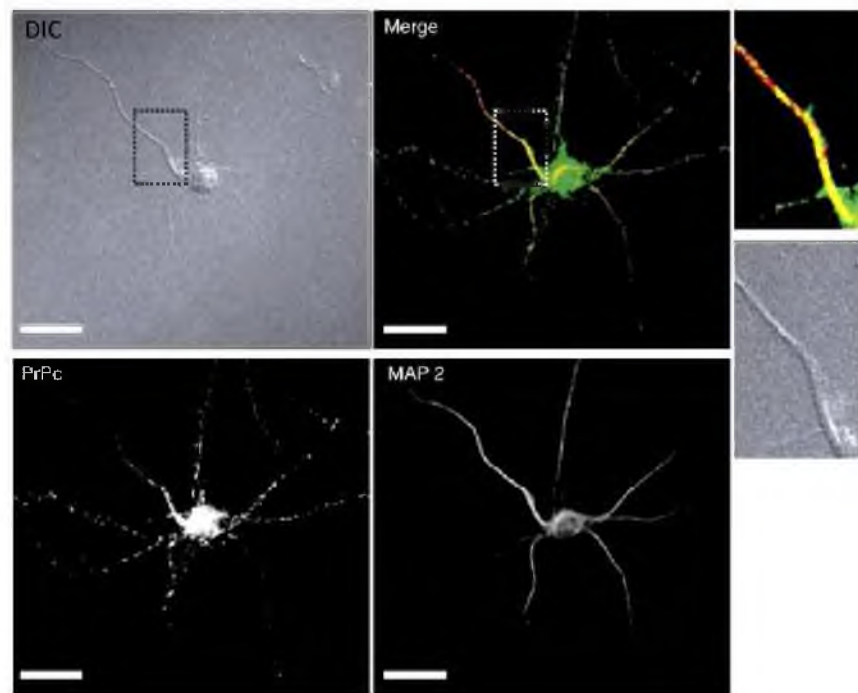
rafts, Flotillin1 y PrP<sup>C</sup>, desde las fracciones livianas del gradiente hacia las fracciones solubles más pesadas luego del tratamiento con FB1 ( $18 \pm 4\%$  y  $15 \pm 3\%$ , respectivamente, con respecto a la situación control, N=3 cultivos independientes, 200  $\mu\text{g}$  de proteínas/100.000 células de cada cultivo para cada condición,  $*p < 0,05$ ), indicativo de una desorganización de rafts.



**FIGURA 25. Western blots de los ensayos de flotación usando anticuerpos anti-PrP<sup>C</sup> y anti-Flotillin1 en neuronas hipocampales control y tratadas con reductores de SLs luego de haber sido sometidas a sonicación.** Mientras en la situación control ambas proteínas flotan en la fracción 4 y 5 del gradiente de densidad, coincidiendo con las fracciones de flotación de los rafts, en la situación de tratamiento para reducir los niveles de SLs se observa una significativa reducción de la cantidad de Flotillin1 y PrP<sup>C</sup> en las fracciones anteriormente mencionadas.

Ante estas observaciones decidimos determinar si los niveles de SLs eran necesarios para el enriquecimiento axonal de PrP<sup>C</sup>. En efecto, el análisis de inmunofluorescencia de neuronas tratadas con FB1 reveló la presencia similar de PrP<sup>C</sup> en axones y dendritas (Cantidad de PrP<sup>C</sup> en axones vs dendritas= 1,04, ver

materiales y métodos, apartado 3.4.7, pág. 35 y 36) en contraste con el enriquecimiento axonal mostrado en neuronas no tratadas con FB1 (**Fig. 26**, N=3 cultivos independientes, 70 a 80 dendritas y entre 50 y 60 axones de neuronas se analizaron para cada condición experimental,  $***p<0,001$ ).

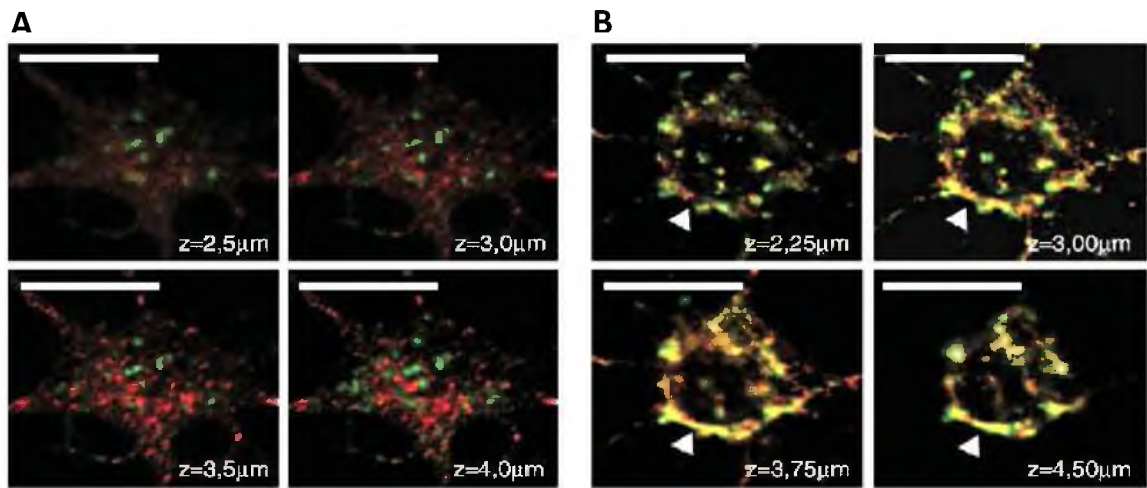


**IMAGEN 26.** Imágenes mostrando como la disminución de los niveles de SLs causa una errónea distribución dendrítica de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocámpales maduras. Contraste de fase e inmunofluorescencia de doble marcación usando anticuerpos anti-PrP<sup>C</sup> (verde) y anti-MAP2 (rojo) de neuronas en estadio 5 con bajo contenido de SLs. PrP<sup>C</sup> está presente no sólo en los axones sino que también aparece en las dendritas colocalizando con MAP2 (ver imágenes aumentadas y **Fig. 10A y B** para comparar con la situación control). Las barras blancas indican 10  $\mu$ m.

Estos resultados indican que los niveles de SLs son importantes para la correcta distribución axonal de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocámpales maduras pero no para su insolubilidad en detergente no iónico a baja temperatura.

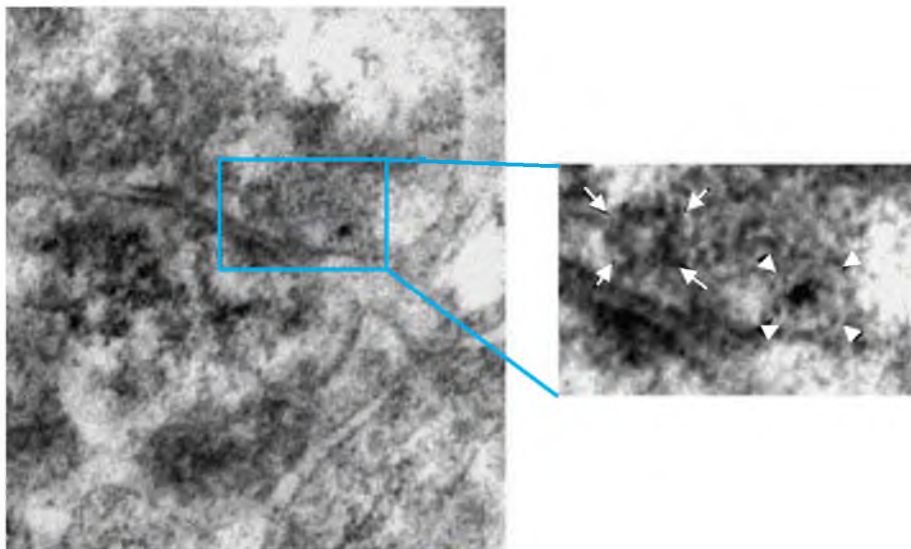
#### 4.1.5 Papel crítico de los rafts en la endocitosis de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocampales maduras.

Uno de los mecanismos propuestos para la distribución polarizada de proteínas ancladas a MP a través del grupo GPI depende de eventos de endocitosis seguidos de transcitosis más que de un tráfico exocítico directo desde el TGN hacia la membrana de la superficie celular como destino final (Polishchuk y col., 2004). Por lo tanto, decidimos investigar si los rafts y sus principales componentes lipídicos, colesterol y SLs, participaban en la endocitosis de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocampales. Para ello incubamos neuronas maduras vivas con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica marcada con fluoresceína que tiene gran afinidad por el gangliósido enriquecido en rafts, GM1 (Fishman y col., 1993). Esta subunidad se ha utilizado para distinguir eventos de endocitosis que requieren rafts de aquellos que se llevan a cabo mediante vesículas cubiertas de clatrina (Orlandi & Fishman, 1998; Nichols, 2003). Por microscopía confocal comprobamos que esto también era cierto en neuronas hipocampales donde la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica no colocalizaba con un marcador canónico de endocitosis mediado por vesículas cubiertas de clatrina, el receptor de transferrina (TfRc) (0% de colocalización total y 1,4% de colocalización parcial, ver materiales y métodos, apartado 3.4.9, pág. 37 y 38) (**Fig. 27A**). Sin embargo, cuando incubamos simultáneamente neuronas vivas con la toxina colérica marcada y con el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup>, observamos que el 82% y 8,8% de las estructuras endocíticas cargadas de PrP<sup>C</sup> colocalizaban completa o parcialmente, respectivamente, con aquellas cargadas de GM1 (**Fig. 27B**).



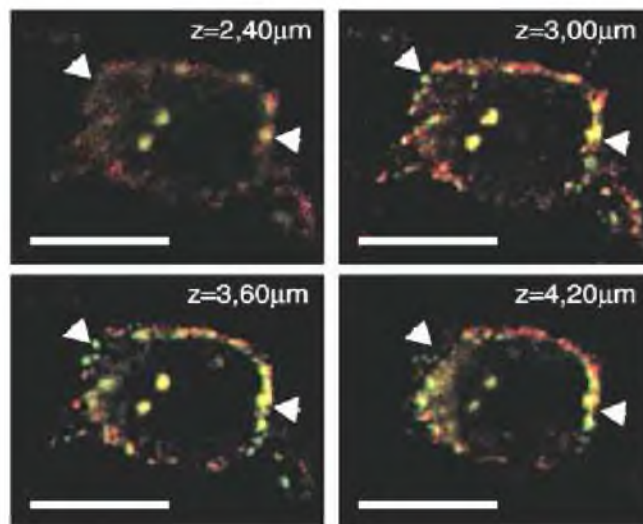
**FIGURA 27. Imágenes representativas mostrando que la endocitosis de PrP<sup>C</sup> está mediada por rafts en neuronas hipocámpales maduras.** (A) Imágenes confocales de los cuerpos celulares de neuronas maduras luego de una incubación de 10 minutos con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica (verde) para permitir su internalización, y con un anticuerpo anti-TfRc (rojo) o (B) subunidad  $\beta$  de la toxina colérica (verde) y anti-PrP<sup>C</sup> (rojo). Z indica la profundidad de los planos en cada imagen. Las puntas de flecha muestran la superficie de los cuerpos celulares. Las barras blancas indican 10  $\mu\text{m}$ .

Por otro lado, para confirmar que PrP<sup>C</sup> estaba ausente de estructuras endocíticas cubiertas por clatrina realizamos ensayos de microscopía electrónica en cortes de tejido hipocámpal de ratones wt (ver materiales y métodos, apartado 3.4.10, pág. 38), donde detectamos PrP<sup>C</sup> en invaginaciones de la MP libres de clatrina (**Fig. 28**).



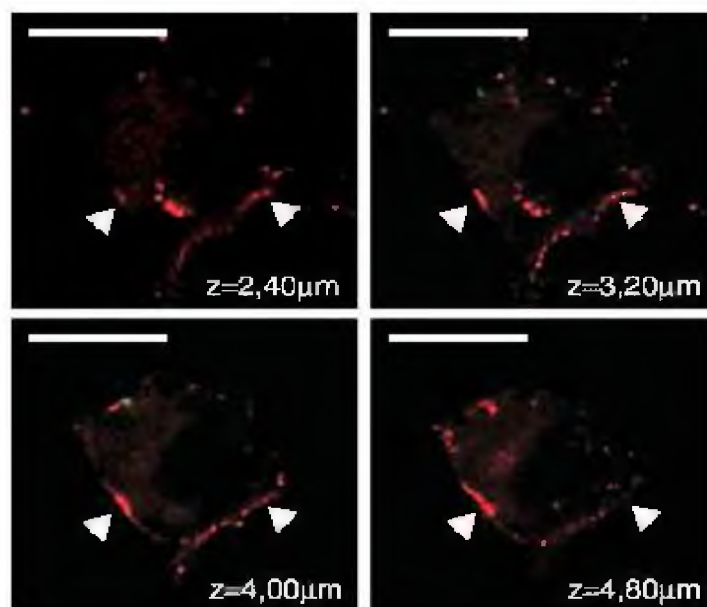
**FIGURA 28. Imagen de microscopía inmunoeléctronica en cortes de tejido hipocámpal.** Usando un anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup>, este análisis reveló la presencia de dicha proteína (marcada con partículas de oro coloidal de 10nm) en invaginaciones de membrana (indicadas por puntas de flecha en las imágenes ampliadas) y su ausencia en vesículas cubiertas por clatrina (indicadas por flechas en las imágenes ampliadas).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos sobre la relevancia de rafts en la distribución polarizada de PrP<sup>C</sup> decidimos analizar si la endocitosis de la proteína dependía de estos microdominios. Para ello, llevamos a cabo ensayos de endocitosis en condiciones de reducción de colesterol por tratamiento con mevilonina y MCD como se describió anteriormente (Pág. 69; **Fig. 20A**). El estudio por microscopía confocal mostró que a nivel de MP había una disminución en la colocalización de GM1 y PrP<sup>C</sup> y una drástica disminución en el número de estructuras endocíticas intracelulares positivas para GM1 o PrP<sup>C</sup> (78% y 85% de reducción, respectivamente) en las neuronas tratadas (**Fig. 29**, comparar con **Fig. 27B**, que representa la condición control de neuronas no tratadas).



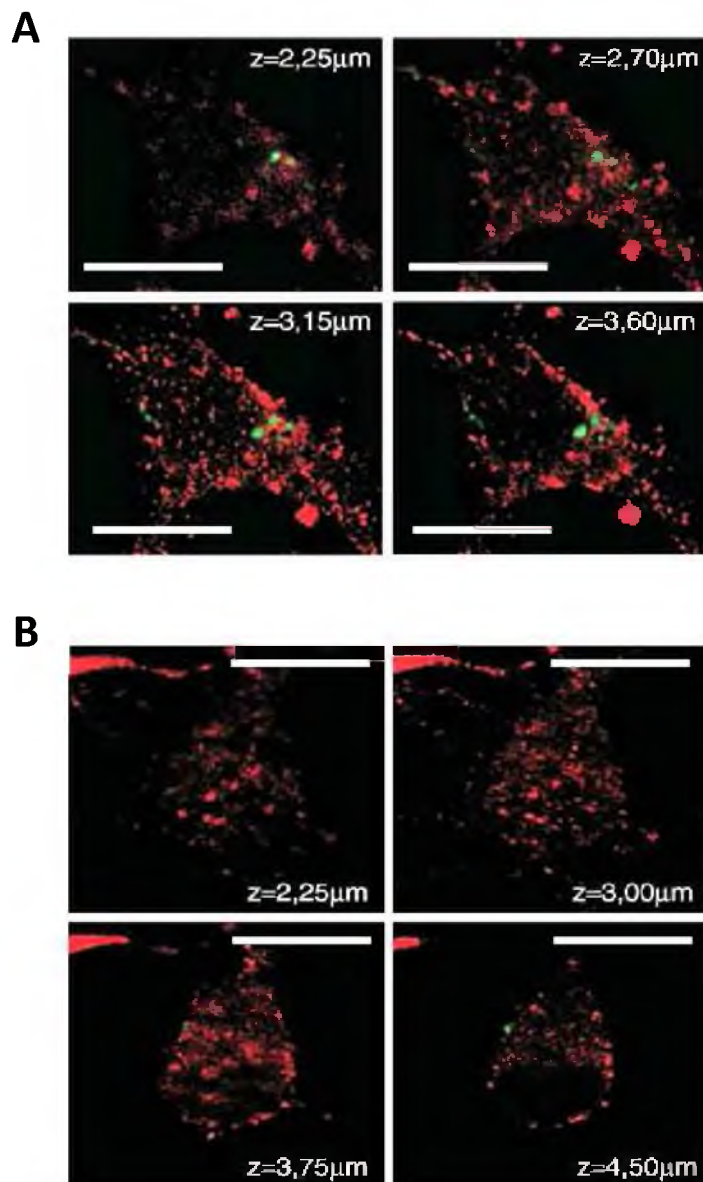
**FIGURA 29. Imágen representativa que muestra la disminución del número de estructuras endocíticas mediadas por rafts en neuronas hipocámpales maduras tratadas con reductores del colesterol.** Imágenes confocales de los cuerpos celulares de neuronas maduras tratadas con Mevilonina y MCD, luego de una incubación de 10 minutos con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica (verde) y anti-PrP<sup>C</sup> (rojo), para permitir su internalización. Z indica la profundidad de los planos en cada imagen. Las puntas de flecha muestran la superficie de los cuerpos celulares (comparar con **Fig. 27B**). Las barras blancas indican 10  $\mu$ m.

Estos datos, junto al análisis bioquímico de flotación de PrP<sup>C</sup> y GM1 donde observamos el desplazamiento de estas moléculas de los rafts de neuronas tratadas con drogas reductoras de colesterol (**Fig. 20B y Fig. 21A y B**), apoyan a la hipótesis de la contribución de estos microdominios en la endocitosis de PrP<sup>C</sup>. Con la intención de analizar cual es el aporte de los diferentes componentes lipídicos de los rafts en dicho evento celular, decidimos realizar el mismo tipo de ensayo de endocitosis en neuronas maduras tratadas con el inhibidor de la síntesis de SLs, FB1. Este tratamiento disminuyó los niveles de GM1 y provocó su desplazamiento de los rafts (**Fig. 30 y Fig. 23**, respectivamente). Así mismo redujo significativamente la endocitosis de PrP<sup>C</sup> (82% de reducción de estructuras endocíticas cargadas de PrP<sup>C</sup> en comparación con neuronas no tratadas)(**Fig. 30**, comparar con **Fig. 27B**).



**FIGURA 30.** *Imágen representativa que muestra la disminución del número de estructuras endocíticas mediadas por rafts en neuronas hipocámpales maduras tratadas con reductores de Esfingolípidos.* Imágenes confocales de los cuerpos celulares de neuronas maduras tratadas con FB1, luego de una incubación de 10 minutos con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica (verde) y anti-PrP<sup>C</sup> (rojo) para permitir su internalización. Z indica la profundidad de los planos en cada imagen. Las puntas de flecha muestran la superficie de los cuerpos celulares (comparar con **Fig. 27B**). Las barras blancas indican 10  $\mu$ m.

Para determinar la especificidad del efecto de la modulación de colesterol y SLs en la endocitosis de moléculas asociadas a rafts analizamos el efecto de los tratamientos en la endocitosis del TfRc, proteína que no está en rafts. En este caso no observamos diferencias en el número de estructuras endocíticas cargadas con TfRc entre neuronas tratadas (**Figs. 31A y B**) y no tratadas (**Fig. 27B**).



**FIGURA 31. Imágenes representativas mostrando el efecto de los tratamientos moduladores de colesterol y SLs en la endocitosis de TfRc.** (A) Imágenes confocales de los cuerpos celulares de neuronas maduras tratadas con Mevilonina y MCD, luego de una incubación de 10 minutos con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica (verde) y un anticuerpo anti-TfRc (rojo) para permitir su internalización. (B) Imágenes confocales de los cuerpos celulares de neuronas maduras tratadas con FB1 luego de una incubación de 10 minutos con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica (verde) y un anticuerpo anti-TfRc (rojo), para permitir su internalización. Z indica la profundidad de los planos en cada imagen. (comparar con **Fig. 27B**). Las barras blancas indican 10  $\mu$ m.

En conjunto, nuestro análisis identifica a PrP<sup>C</sup> como componente de rafts que necesita de estos microdominios para su endocitosis y correcta polarización al axón en neuronas hipocampales maduras.

Además de su relevancia en la fisiología de PrP<sup>C</sup>, estos resultados indicaron que esta proteína es una herramienta útil para analizar los mecanismos moleculares de distribución neuronal polarizada a través de rafts y las consecuencias de sus alteraciones en patologías neurológicas.



## 4.2 CAPÍTULO II: ALTERACIONES DE LA POLARIDAD NEURONAL EN LA ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK TIPO A: RELEVANCIA DE LOS RAFTS.

Como se mencionó en la introducción, la enfermedad NPA, que causa retraso mental y neurodegeneración, se debe a mutaciones en el gen que codifica a la ASM. Esta enzima se encarga de la degradación de uno de los lípidos mayoritarios de rafts, la SM. Por ello, hipotetizamos que los rafts podrían estar alterados en esta enfermedad teniendo como consecuencia una deficiente polarización neuronal. Para demostrar esta hipótesis utilizamos el modelo murino para NPA: un ratón que carece de la ASM (ASMko).

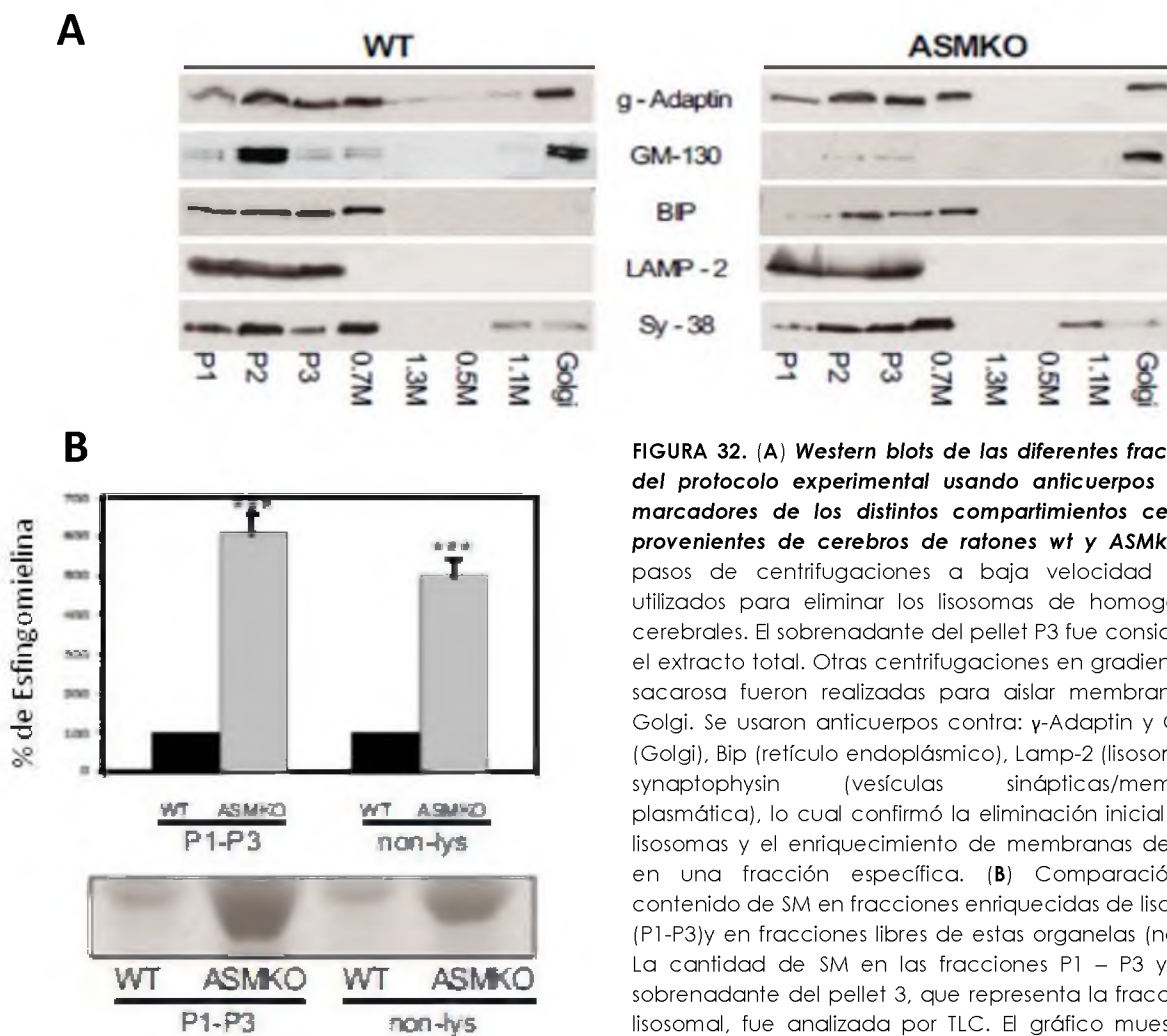
### **4.2.1 ALTERACIONES EN LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LOS RAFTS NEURONALES EN AUSENCIA DE ASM.**

Para el abordaje de este análisis, la composición lipídica se comparó en rafts purificados de extractos totales de cerebros y de membranas de distintos compartimentos neuronales en ratones wt y ASMko.

#### **4.2.1.1 Análisis lipídico de rafts provenientes de membranas totales de cerebros y de cultivos primarios neuronales de ratones wt y ASMko.**

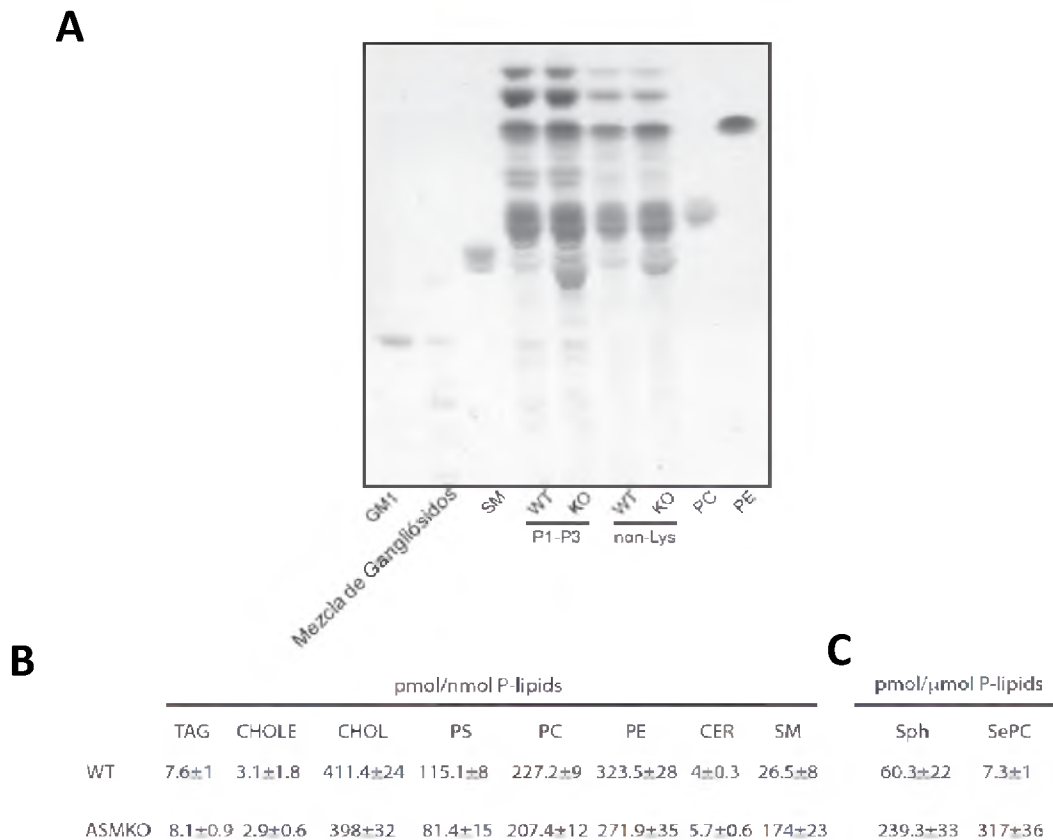
Los niveles de los principales componentes lipídicos de rafts: SM, colesterol y GM1 se cuantificaron en extractos totales y en rafts de cerebros de ratones wt y ASMko. Dada la acumulación de SM descrita en lisosomas de todos los tejidos, incluido el cerebro, usando ratones ASMko pusimos a punto un protocolo para eliminar estas organelas y

así evitar la contribución proveniente de membranas lisosomales. Mediante centrifugaciones cortas a baja velocidad (ver materiales y métodos, apartado 3.5.1, pág. 39), conseguimos separar una fracción enriquecida en lisosomas del resto de las membranas (**Fig. 32A**). Esta aproximación experimental reveló que si bien el contenido de SM en membranas totales ASMko era 6,1 veces mayor que en las wt, las membranas libres de lisosomas también presentaban un aumento significativo de este esfingolípido, 4,8 veces más en la condición ASMko (**Fig. 32B**, N=3 experimentos independientes, utilizando 3 cerebros wt y 3 cerebros ASMko para cada experimento, empleando 100 µg de extracto proteico para cada caso, \*\*\* $p < 0,001$ ).



**FIGURA 32.** (A) *Western blots de las diferentes fracciones del protocolo experimental usando anticuerpos contra marcadores de los distintos compartimientos celulares provenientes de cerebros de ratones wt y ASMko.* Tres pasos de centrifugaciones a baja velocidad fueron utilizados para eliminar los lisosomas de homogenatos cerebrales. El sobrenadante del pellet P3 fue considerado el extracto total. Otras centrifugaciones en gradientes de sacarosa fueron realizadas para aislar membranas de Golgi. Se usaron anticuerpos contra:  $\gamma$ -Adaptin y GM130 (Golgi), Bip (retículo endoplásmico), Lamp-2 (lisosomas), y synaptophysin (vesículas sinápticas/membrana plasmática), lo cual confirmó la eliminación inicial de los lisosomas y el enriquecimiento de membranas de Golgi en una fracción específica. (B) *Comparación del contenido de SM en fracciones enriquecidas de lisosomas (P1-P3) y en fracciones libres de estas organelas (non-lys).* La cantidad de SM en las fracciones P1 – P3 y en el sobrenadante del pellet 3, que representa la fracción no lisosomal, fue analizada por TLC. El gráfico muestra los valores medios  $\pm$  e.s. de los datos correspondientes a tres cerebros ASMko y tres wt expresados como porcentajes sobre el valor wt que fue considerado como 100%.

Hay que remarcar que los niveles de otros lípidos como triglicéridos, fosfolípidos, gangliósidos y colesterol (analizados por TLC (**Fig. 33A**) y una serie de ensayos bioquímicos, ver materiales y métodos, apartado 3.5.7, pág. 45 y 46) no mostraron diferencias significativas en membranas lisosomales, membranas libres de lisosomas, ni en preparados totales de cerebros provenientes de ratones wt y ASMko. Sólo encontramos un pequeño aumento en el contenido de ceramida y una pequeña disminución en los niveles de fosfatidilserina en cerebros ASMko que no fueron significativos (**Fig. 33B**, N=3 experimentos independientes, 3 cerebros wt y 3 cerebros ASMko para cada experimento,  $p>0,05$ ). Por otro lado, el análisis de derivados N-deacilados de la SM (Esfingosilfosforilcolina y Esfingosina) sí reveló un aumento de los mismos (45 veces más, y 4 veces más, respectivamente) con respecto a la condición wt (**Fig. 33C**, N=3 experimentos independientes, 3 cerebros wt y 3 cerebros ASMko para cada experimento,  $***p<0,001$ ).

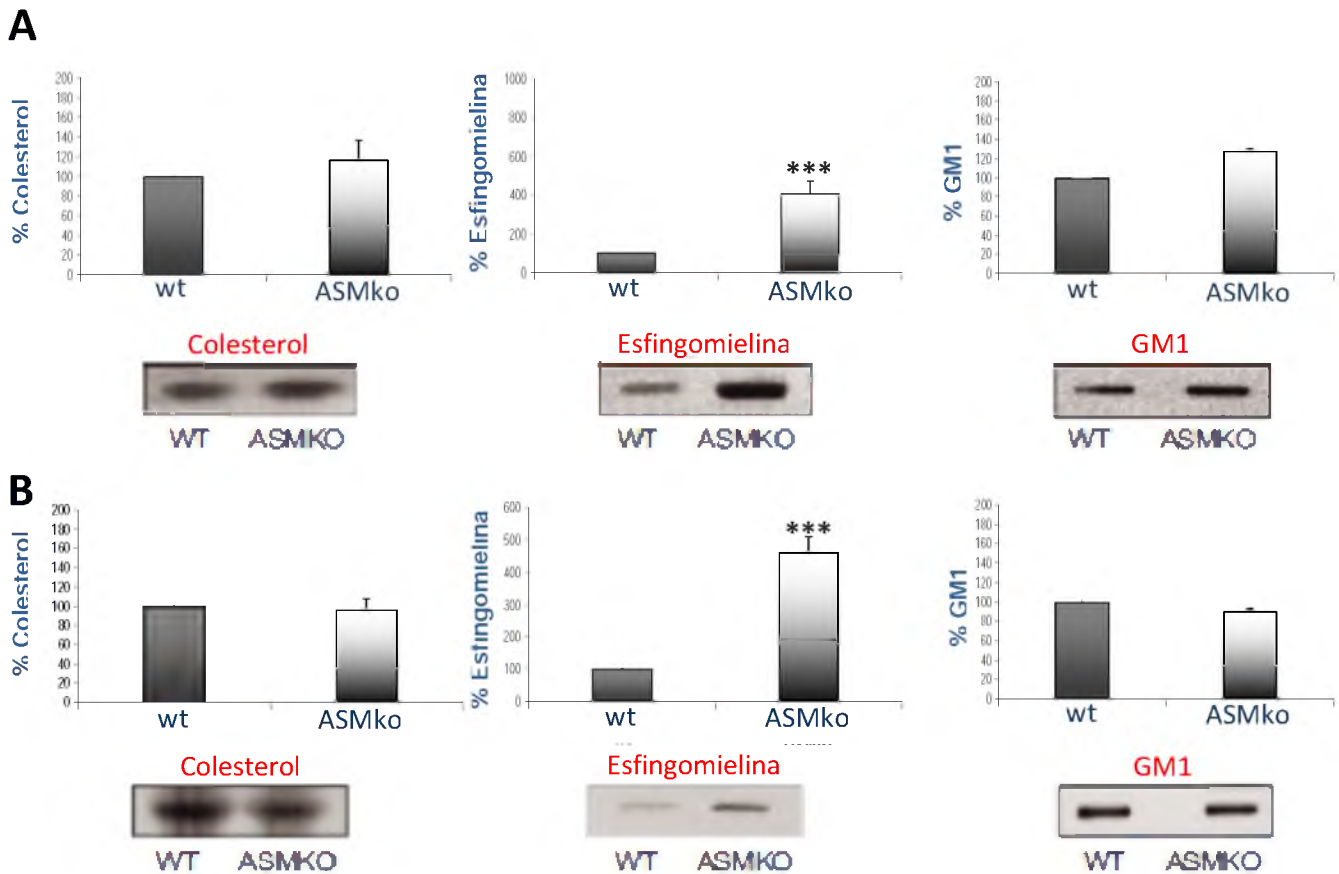


**FIGURA 33. (A) Imagen representativa de TLC de membranas totales intactas conteniendo lisosomas (P1-P3) o no (non-lys) provenientes de cerebros de ratones wt y ASMko.** La cantidad de muestra cargada en cada línea fue normalizada en función de la concentración de proteínas totales. Estándares de GM1, una mezcla de gangliósidos (incluyendo GM1, GD1a, GD1b y GT1b), SM y los fosfolípidos PC y PE fueron utilizados para identificar específicamente estos lípidos en las muestras analizadas. **(B)** Valores absolutos de lípidos obtenidos usando una combinación de ensayos bioquímicos en cerebros de ratones wt y ASMko. Las cantidades de triglicéridos (TAG), colesterol ésteres (CHOLE), colesterol (CHOL), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), ceramida (CER) y esfingomielina (SM) están expresados como pmol/nmol de fosfolípidos (P-lipids), **(C)** mientras que la esfingosina (Sph) y la esfingosilfosforilcolina (SePC) están expresados como pmol/ $\mu$ mol de fosfolípidos.

Estos resultados mostraron la especificidad del efecto de la carencia de ASM sobre los niveles de SM y sus derivados. Además, revelaron que el aumento de SM afecta de manera similar a los lisosomas y a las membranas no lisosomales.

A los fines de evaluar si el aumento de SM encontrado en membranas totales de cerebro ASMko afectaba también al contenido de este esfingolípido en los rafts, se extrajeron membranas libres de lisosomas de extractos totales de cerebro con Triton X-100 a 4°C y se fraccionaron en gradientes de sacarosa. Los rafts se obtuvieron en las fracciones 4 y 5 del gradiente de acuerdo a lo indicado por la acumulación de proteínas enriquecidas en estos microdominios de membrana como son Flotillin1 y PrP<sup>C</sup> (Galván y col., 2005) (ver **Fig. 35**). El análisis lipídico por TLC y slot blot de estas fracciones mostró niveles similares de colesterol y GM1 ( $116 \pm 20$  y  $127 \pm 3,1\%$ , respectivamente) en microdominios de membrana ASMko con respecto a los valores wt, consideradas como el 100% (**Fig. 34A**, N=3 experimentos independientes, usando 5 cerebros wt y 5 ASMko para cada experimento,  $p>0,05$ ). En contraste, se observó un fuerte incremento en los niveles de SM (4,1 veces más) en los rafts de cerebros de ratones ASMko (**Fig. 34A**, N=3 experimentos independientes, usando 5 cerebros wt y 5 ASMko para cada experimento,  $***p<0,001$ ).

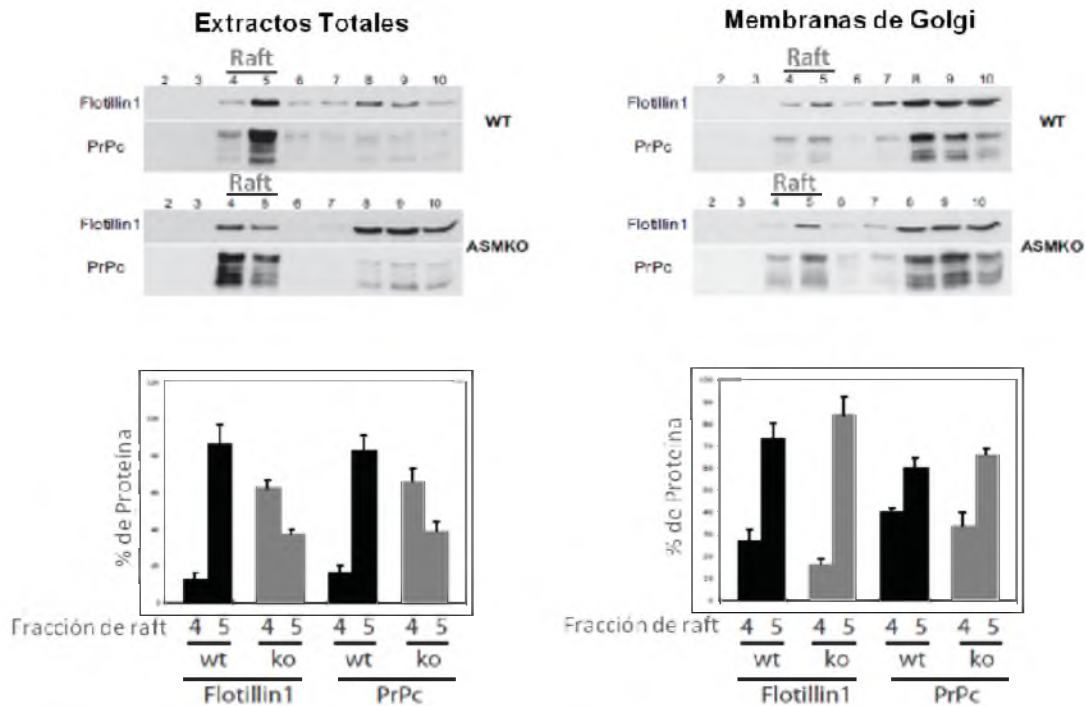
A la luz de estos resultados nos propusimos investigar en qué medida el aumento de SM en membranas totales de cerebro reflejaba el de membranas neuronales. Para ello purificamos membranas de neuronas hipocampales maduras de cultivos primarios de ratones wt y ASMko. Estos cultivos contienen menos de 5% de contaminación glial (Goslin & Banker, 1991). El análisis lipídico reveló que los rafts de neuronas hipocampales ASMko presentaban niveles similares de colesterol y GM1 ( $95,5 \pm 12$  y  $90 \pm 3,3\%$ , respectivamente, con valores wt considerados como el 100%; **Fig. 34B**, N=3 cultivos independientes, 200 µg de proteínas/100.000 células de cada cultivo para cada condición,  $p>0,05$ ) y un significativo incremento en los niveles de SM ( $460 \pm 50\%$ ; **Fig. 34B**, N=3 cultivos independientes, 200 µg de proteínas/100.000 células de cada cultivo para cada condición,  $***p<0,001$ ).



**FIGURA 34.** Gráficos mostrando los niveles incrementados de SM en rafts de membranas provenientes de extractos totales cerebrales y de neuronas ASMko. Análisis cuantitativo de lípidos de rafts de membranas totales provenientes de cerebros de ratones wt y ASMko (**A**) y de membranas provenientes de neuronas hipocámpales en cultivo (**B**), expresados como porcentajes sobre el valor wt considerado como el 100%. Los paneles debajo de cada gráfica muestran imágenes representativas de TLC para colesterol y SM o slot blot para GM1.

Los cambios en la composición lipídica de los rafts también se reflejaron en la densidad de las fracciones en las que aparecían las proteínas marcadoras de estos microdominios. Mientras Flotillin1 y PrP<sup>C</sup> estaban predominantemente concentradas en la fracción 5 del gradiente en membranas totales de cerebros wt (6,6 y 4,8 veces más que en fracción 4, respectivamente), en membranas ASMko se encontraban enriquecidas en la fracción 4 (1,7 y 1,9 veces más que en la fracción 5,

respectivamente; **Fig. 35**). Esto refleja una menor densidad de los rafts ASMko que podría explicarse por el aumento de SM y sus derivados.



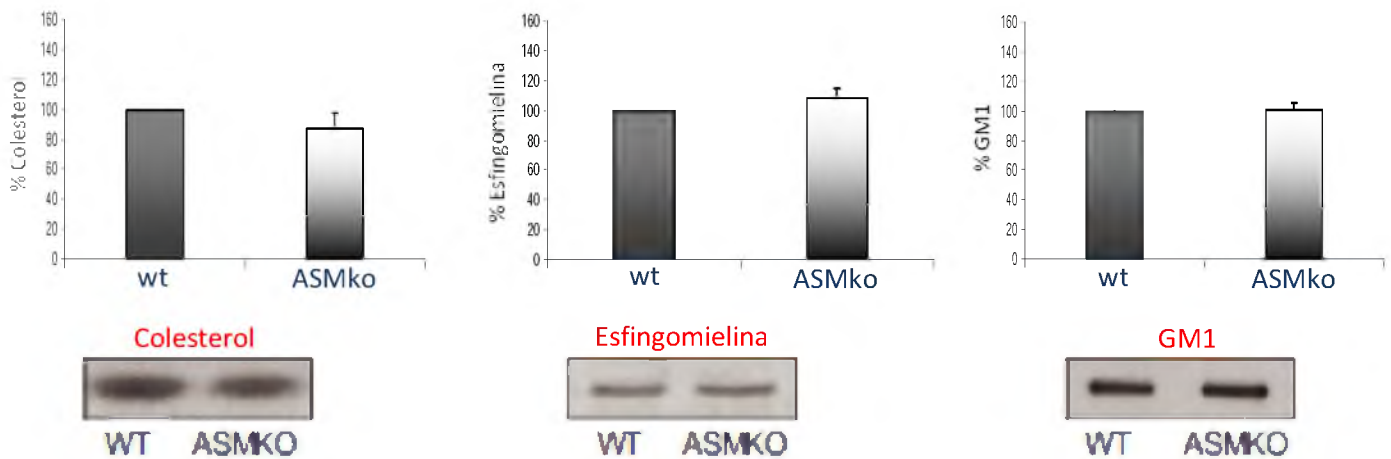
**FIGURA 35. Western blots mostrando el patrón proteico de rafts provenientes de membranas totales y membranas de Golgi de cerebros de ratones wt y ASMko.** Análisis de Western blot usando anticuerpos contra Flotillin 1 y PrP<sup>C</sup> de gradientes de sacarosa después de extracción con Triton X-100 de extractos totales o membranas enriquecidas en Golgi provenientes de cerebros de ratones wt y ASMko. Las fracciones de los gradientes están enumeradas de 2 a 10 desde las fracciones más livianas a las más pesadas. Los rafts se encuentran en las fracciones 4 y 5 del gradiente. Los gráficos muestran la cuantificación de la distribución de Flotillin 1 y PrP<sup>C</sup> en las fracciones 4 y 5, considerando la cantidad total de cada una de estas proteínas en estas dos fracciones como el 100%. Los datos corresponden al valor medio  $\pm$  e.s. de tres experimentos diferentes.

Estos resultados nos permiten concluir que en ausencia de ASM los rafts de membranas totales de cerebro y de neuronas hipocámpales presentan un incremento en los niveles de SM que les confiere una menor densidad.

#### 4.2.1.2 Análisis lipídico de rafts provenientes de membranas de Golgi.

El ensamblaje de rafts se produce en la región *trans* del aparato de Golgi (TGN) siendo el paso limitante la producción de SM (Brown, 1998; Ostermeyer y col., 1999). Ésta puede sintetizarse *de novo* o a partir de la ceramida que se recicla al Golgi después de la hidrólisis de la SM en distintos sitios celulares como los lisosomas o la MP (Grassme y col., 2001). Con el objetivo de comprobar si la deficiencia de la ASM afectaba la formación de rafts a nivel del aparato de Golgi, medimos los niveles de colesterol, SM y GM1 en rafts purificados de membranas de esta organela (ver materiales y métodos, apartado 3.5.5, pág. 44 y **Fig. 32A**) provenientes de cerebros de ratones wt y ASMko. Ensayos de TLC y slot blot revelaron que el contenido de colesterol, GM1 y SM eran similares en ambas condiciones, ASMko y wt ( $87 \pm 11$ ;  $101 \pm 4,2$  y  $108 \pm 7,2\%$ , respectivamente, con valores wt considerados como el 100%)(**Fig. 36**, N=3 experimentos independientes, usando 5 cerebros wt y 5 ASMko para cada experimento y de cada condición,  $p>0,05$ ). Cuando realizamos ensayos de extracción con detergentes y gradientes de densidad, observamos que los rafts provenientes de membranas de Golgi no mostraban un cambio significativo en el patrón de flotación de proteínas marcadoras como Flotillin1 o PrP<sup>C</sup> que aparecían enriquecidas en la fracción 5 en ambas condiciones (**Fig. 35**).





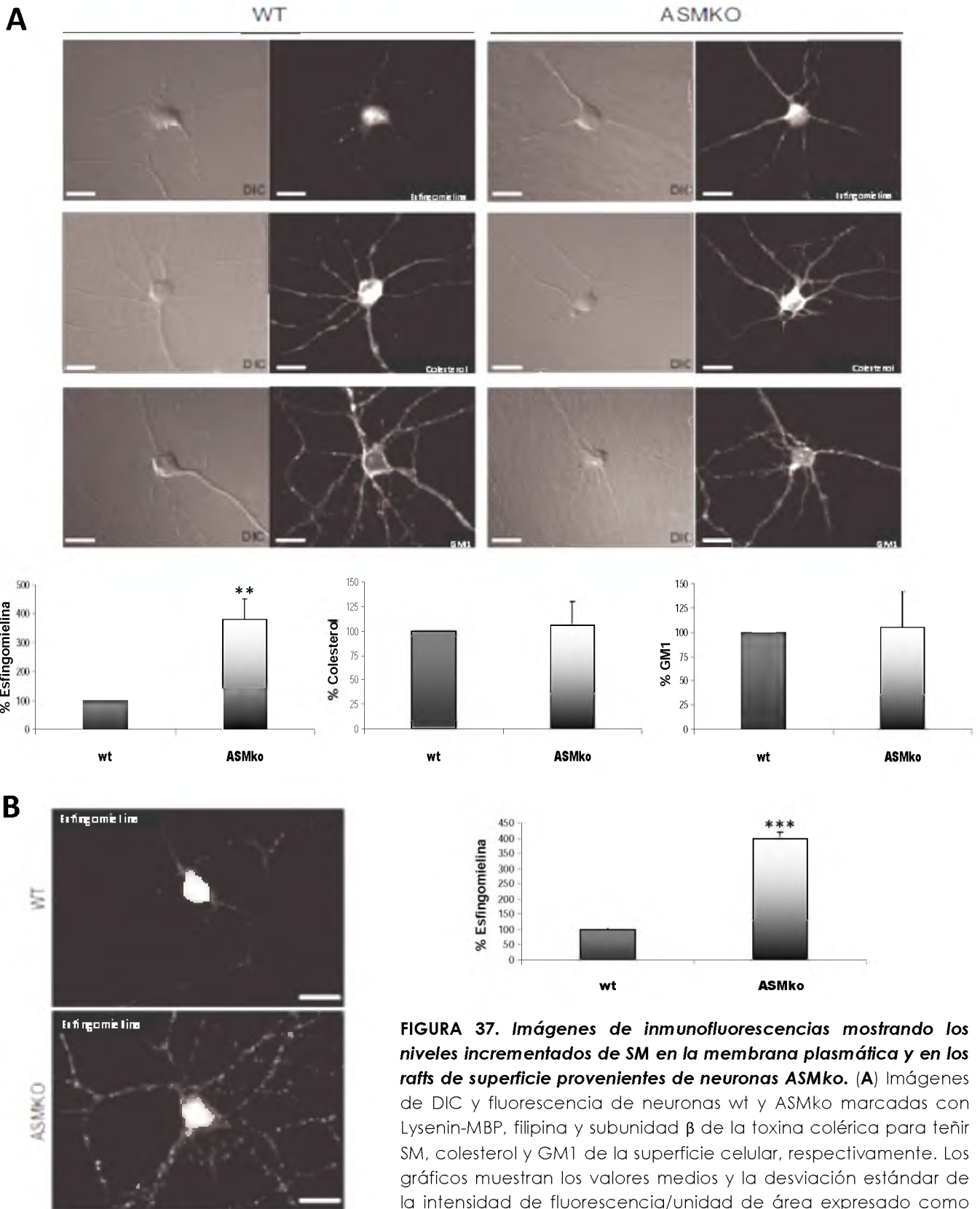
**FIGURA 36. Análisis lipídico de rafts de membranas de Golgi provenientes de cerebros de ratones wt y ASMko.**

Los niveles de SM en rafts obtenidos de membranas de Golgi provenientes de cerebros ASMko son similares a los de cerebros wt. Los paneles que se encuentran debajo de cada gráfico muestran imágenes representativas de TLC para colesterol y SM o slot blot para GM1. Los gráficos en el panel superior muestran valores medios  $\pm$  e.s. de cinco cerebros wt y cinco ASMko expresados como porcentajes sobre el valor wt considerado como el 100%.

Estos resultados demuestran que la ausencia de ASM no afecta a la formación de rafts en el aparato de Golgi.

#### 4.2.1.3 Análisis lipídico de rafts provenientes de membrana plasmática neuronal.

La evidencia de que existe un pequeño depósito de ASM a nivel de la MP (Grassme y col., 2001), nos llevó a especular que el aumento de SM observado en membranas no lisosomales y no Golgi en la condición ASMko podría deberse a la contribución de la superficie celular. Para comprobar esta hipótesis, analizamos la composición lipídica de la MP por inmunofluorescencia incubando neuronas no permeabilizadas con sondas conjugadas con fluorocromos que reconocen diferentes lípidos: Lysenina-MBP para reconocer SM (Nakai y col., 2000; Shakor y col., 2003; Kiyokawa y col., 2004), filipina para colesterol (Börnig & Geyer, 1974; Behnke y col., 1984) y la sub-unidad  $\beta$  de la toxina colérica para el reconocimiento de GM1 (Fishman y col., 1993; Orlandi y col., 1993). De acuerdo con un incremento de SM a nivel de la MP, la tinción con lisenina fue 3,8 veces más intensa en la superficie de neuronas hipocampales ASMko que en las wt (\*\* $p < 0,01$ ), mientras que las tinciones para colesterol y GM1 no mostraron diferencias significativas ( $106 \pm 24$  y  $105 \pm 37\%$ , respectivamente,  $p > 0,05$ ) (**Fig. 37A**, N=3 cultivos independientes, 20 células de cada cultivo). Mas aún, la intensidad de la tinción con lisenina-MBP, luego del tratamiento de neuronas ASMko con Triton X-100 frío (Ledesma y col., 1998), también fue mayor que en neuronas wt, confirmando así el elevado contenido de este lípido en los rafts de la superficie celular de neuronas ASMko ( $398 \pm 22\%$  con respecto a las neuronas wt) (**Fig. 37B**, N=3 cultivos independientes, 20 células de cada cultivo, \*\*\* $p < 0,001$ ).



**FIGURA 37. Imágenes de inmunofluorescencias mostrando los niveles incrementados de SM en la membrana plasmática y en los rafts de superficie provenientes de neuronas ASMko. (A)** Imágenes de DIC y fluorescencia de neuronas wt y ASMko marcadas con Lysenin-MBP, filipina y subunidad  $\beta$  de la toxina colérica para teñir SM, colesterol y GM1 de la superficie celular, respectivamente. Los gráficos muestran los valores medios y la desviación estándar de la intensidad de fluorescencia/unidad de área expresado como porcentaje sobre el valor wt considerado como el 100%. **(B)** Imágenes representativas de fluorescencia de neuronas wt y ASMko extraídas con Triton X-100 luego de haber sido incubadas con Lysenin-MBP, para teñir específicamente SM de rafts de la superficie celular. El gráfico muestra los valores medios  $\pm$  e.s. de la intensidad de fluorescencia/unidad de área expresado como porcentaje sobre el valor wt considerado como el 100%. Las barras en blanco indican 10  $\mu$ m en todos los paneles.

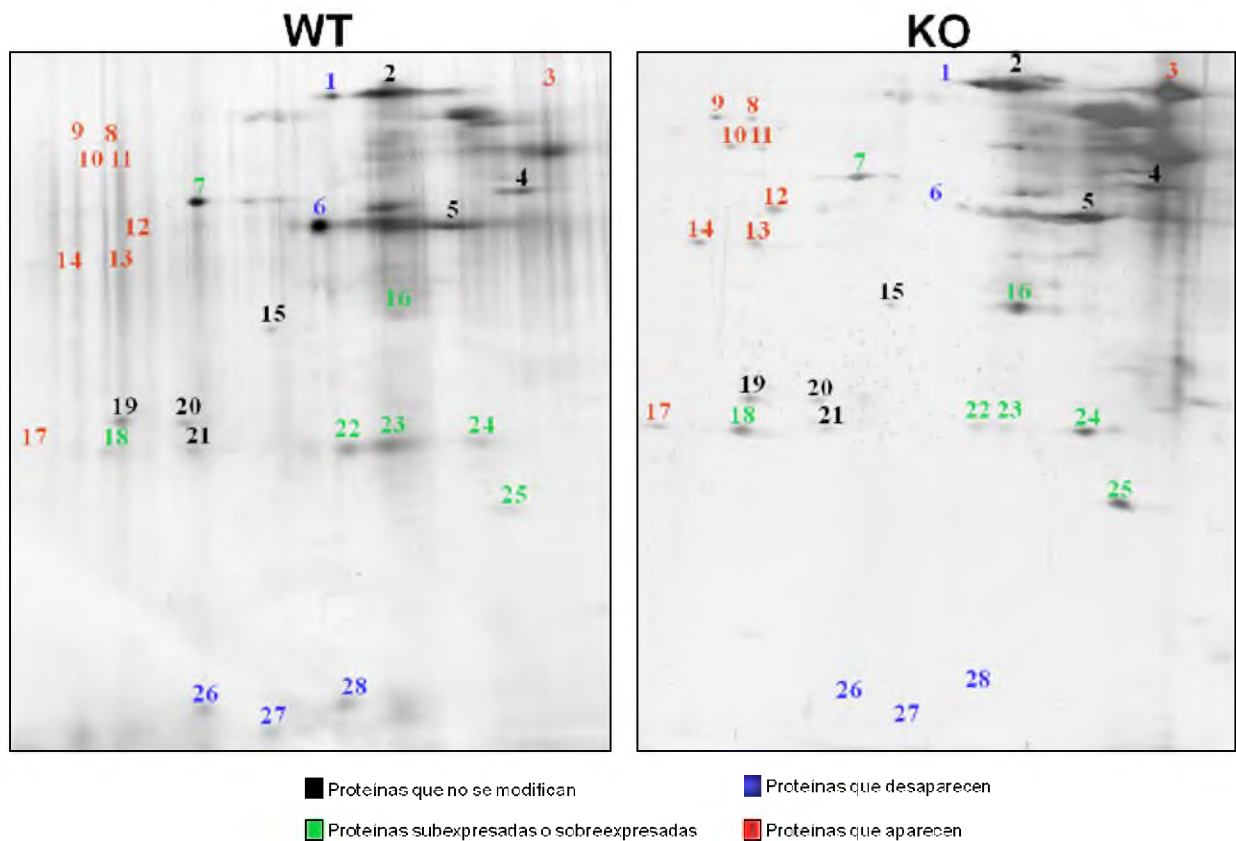
Este conjunto de resultados, obtenidos por microscopía y análisis bioquímico, demuestran que la carencia de ASM produce un incremento en los niveles de SM en los rafts de la MP de neuronas hipocampales.

#### **4.2.2 COMPOSICIÓN PROTEICA DE RAFTS NEURONALES EN AUSENCIA DE ASM.**

Para el abordaje de este análisis, la composición proteica se comparó en rafts purificados de extractos totales de cerebros wt y ASMko y de membranas de neuronas en cultivo proveniente de embriones de ratones wt y ASMko.

##### **4.2.2.1 Análisis proteico de rafts provenientes de membranas totales de cerebro.**

Dadas las alteraciones en la composición lipídica que encontramos en los rafts provenientes de extractos totales y MP de cerebros y neuronas ASMko, nos propusimos investigar si la ausencia de ASM también alteraba la composición proteica de estos microdominios. Para ello, extractos cerebrales libres de membranas lisosomales se extrajeron con Triton X-100 a 4°C y se centrifugaron en gradientes de sacarosa. El perfil proteico general de los rafts obtenidos con este protocolo en las fracciones 4 y 5 del gradiente se resolvió mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE) (ver materiales y métodos, apartado 3.5.3, pág. 41). Este análisis mostró diferencias significativas en los niveles de ciertas proteínas que aumentaban o disminuían en las muestras ASMko respecto a las wt mientras que otras permanecían invariables (**Fig. 38**).

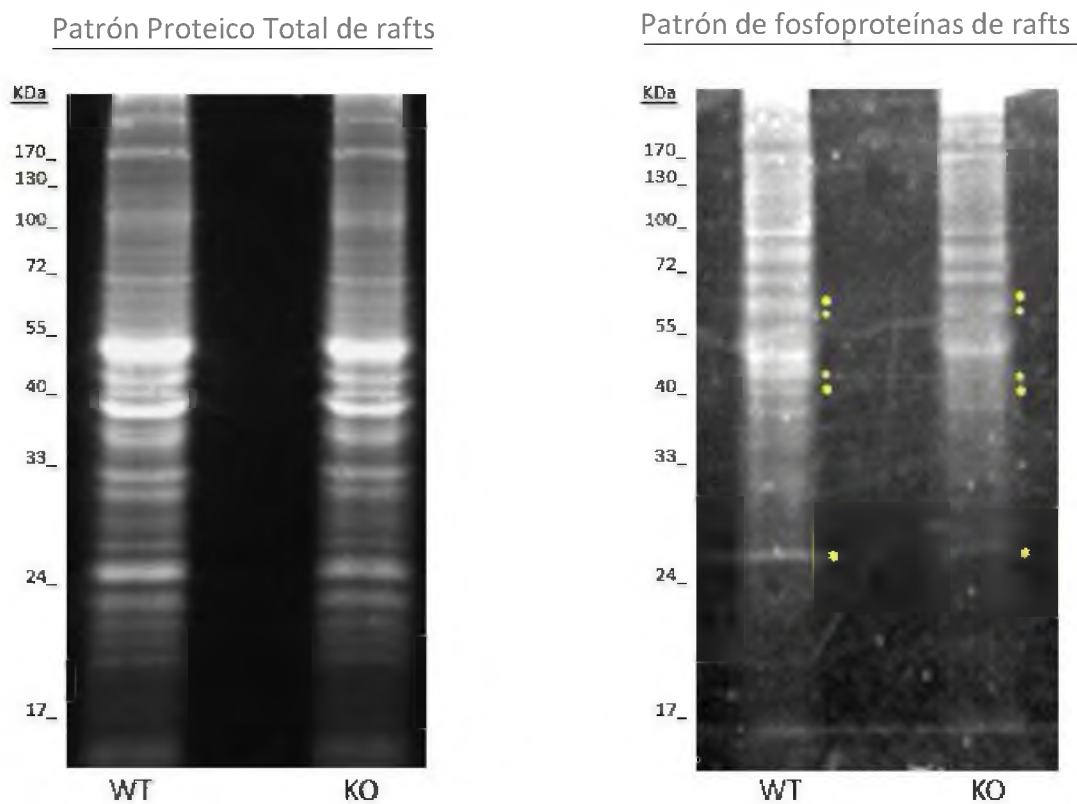


**FIGURA 38. Patrón proteico en geles de dos dimensiones (2D-PAGE) de rafts provenientes de membranas totales de cerebros de ratones wt y ASMko.** Se resolvieron proteínas de las fracciones 4 y 5 de gradientes de sacarosa (fracciones correspondientes a rafts) después de extraerlas con Triton X-100 de preparados de membranas totales de cerebros de ratones wt y ASMko, corriendo geles de poliacrilamida en dos dimensiones. El panel izquierdo muestra el patrón electroforético de la muestra wt, mientras que el panel derecho nos permite ver el patrón ASMko. Los números (de 1 a 28) y los distintos colores, según se indica en la referencia debajo de las imágenes, indican las diferencias más evidentes observadas en el estudio comparativo entre ambos patrones.

Por otro lado, y conociendo la implicancia de estos microdominios de membrana en los eventos de señalización celular (Janes y col., 1999; Vidalain y col., 2000),

decidimos comparar el patrón de fosforilación proteico entre rafts de membranas totales de cerebros de ratones wt y ASMko (ver materiales y métodos, apartado 3.5.4, pág. 43).

Este análisis mostró cambios significativos en el grado de fosforilación de proteínas de rafts provenientes de cerebros ASMko con respecto a aquellos wt (**Fig. 39**), que podrían influir en la señalización mediada por estos dominios.



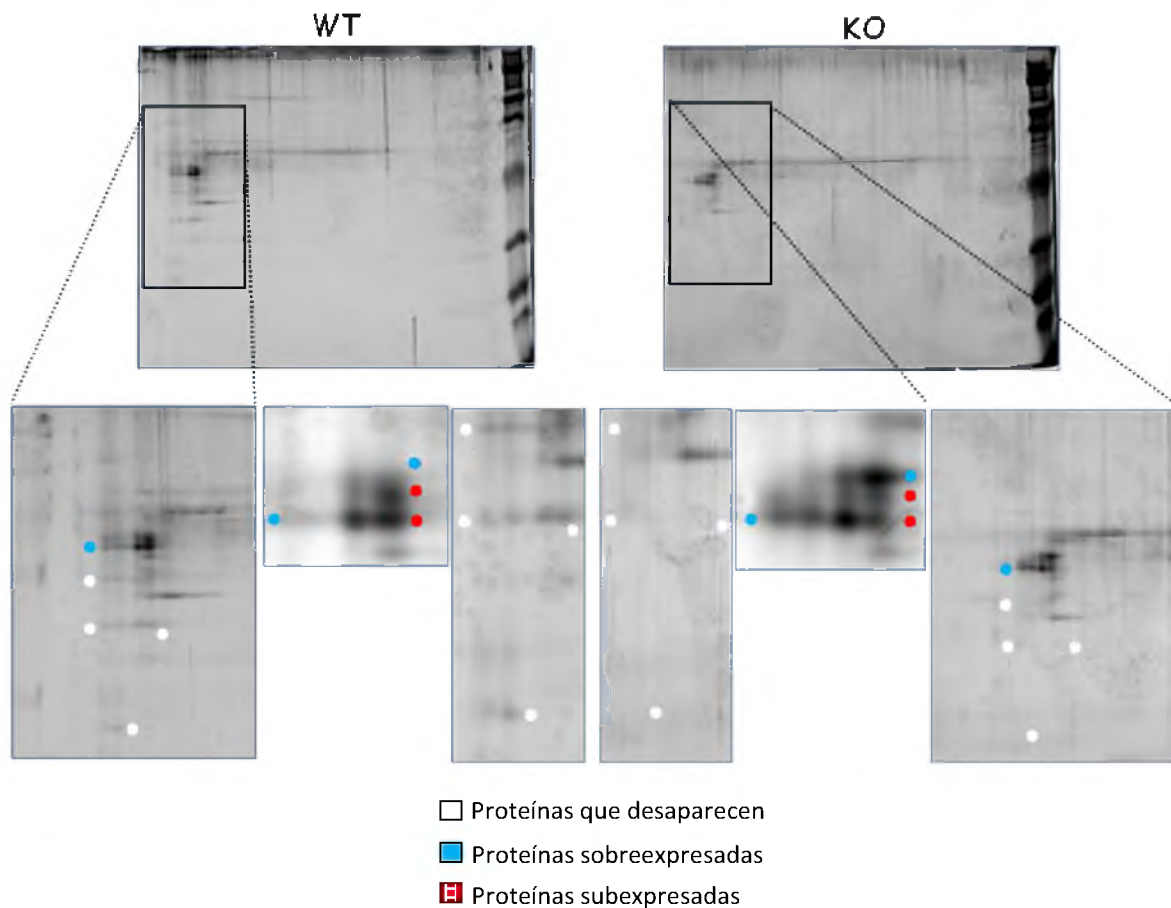
**FIGURA 39. Patrón proteico de fosfoproteínas de rafts provenientes de membranas totales de cerebros de ratones wt y ASMko.** Se resolvieron proteínas de las fracciones 4 y 5 de gradientes de sacarosa (fracciones correspondientes a rafts) después de extraerlas con Triton X-100 de preparados de membranas totales de cerebros de ratones wt y ASMko, corriendo geles SDS-PAGE. Luego los blots fueron analizados usando los kits: SYPRO Ruby protein blot stain, para proteínas totales y el Pro-Q Diamond Phosphoprotein Blot Stain kit, para fosfoproteínas. El panel izquierdo muestra el patrón electroforético de proteínas totales de raft wt y ASMko, mientras que el panel derecho nos permite ver el patrón de fosfoproteínas de raft wt y ASMko. Los asteriscos indican las diferencias más evidentes en la fosforilación de proteínas entre ambas condiciones.

Los resultados obtenidos demuestran que la composición proteica de los rafts provenientes de membranas totales de cerebros ASMko está alterada tanto en los niveles como en la fosforilación de ciertas proteínas.



#### 4.2.2.2 Análisis proteico de rafts provenientes de cultivos primarios neuronales.

De la misma manera que cuando realizamos el análisis lipídico y con el propósito de evaluar en qué medida las diferencias encontradas en la composición proteica de extractos totales de cerebro reflejaban el de membranas neuronales, analizamos el perfil proteico de membranas de neuronas hipocampales maduras en cultivos primarios provenientes de ratones wt y ASMko. Este análisis también reveló alteraciones en los niveles proteicos de rafts en neuronas hipocampales ASMko con respecto a neuronas wt (**Fig 40**).



**FIGURA 40. Patrón proteico en geles de dos dimensiones (2D-PAGE) de rafts provenientes de membranas neuronales de cultivos wt y ASMko.** Se resolvieron proteínas de las fracciones 4 y 5 de gradientes de sacarosa (fracciones correspondientes a rafts) después de extraerlas con Triton X-100 de preparados de membranas totales de neuronas wt y ASMko en cultivo, corriendo geles de poliacrilamida en dos dimensiones. El panel izquierdo muestra el patrón electroforético de la muestra wt, mientras que el panel derecho nos permite ver el patrón ASMko. En los cuadros agrandados se muestran por medio de asteriscos de diferentes colores las diferencias observadas entre ambas condiciones, según las referencias debajo de la imagen de los geles.

Estos resultados confirmaron la existencia de alteraciones en la composición proteica de rafts provenientes de neuronas ASMko.

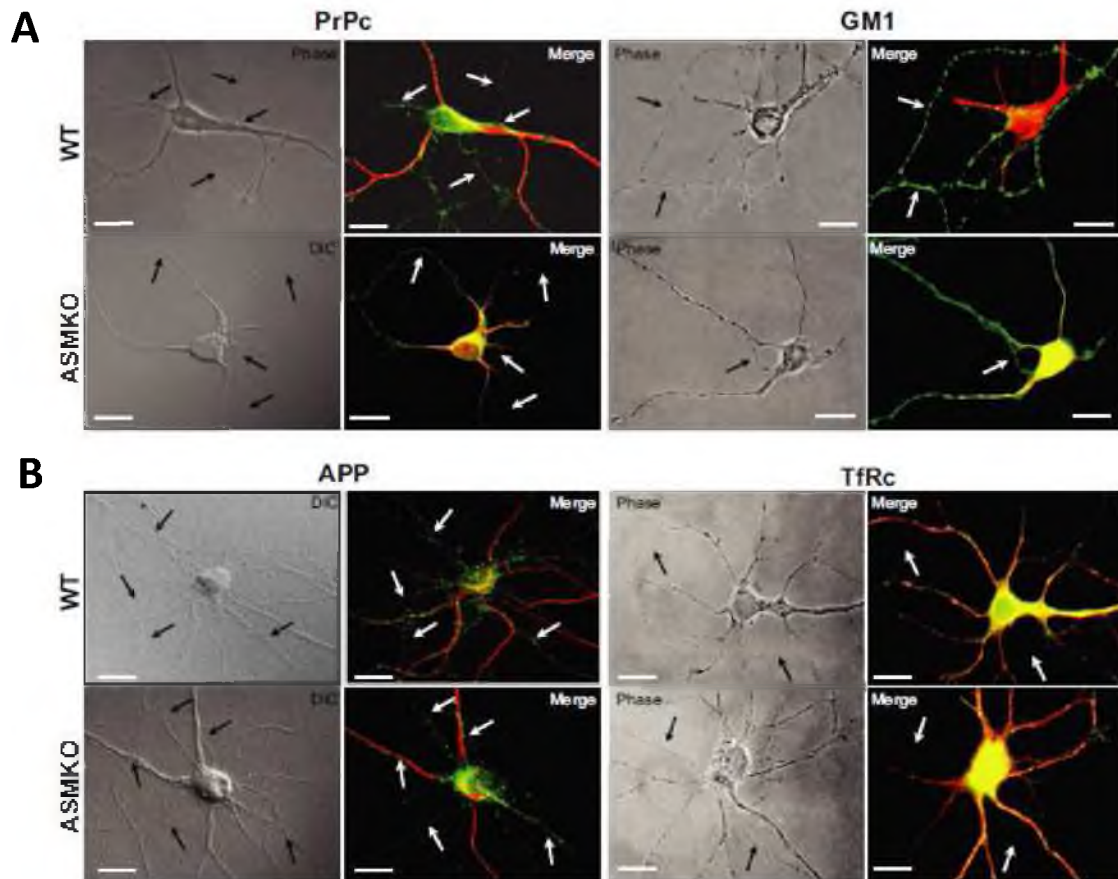
### 4.3 CAPÍTULO III: ALTERACIONES DE LAS FUNCIONES DE RAFTS, PARTICULARMENTE EN LA DISTRIBUCIÓN POLARIZADA DE PROTEÍNAS NEURONALES, EN AUSENCIA DE ASM

Los resultados obtenidos del análisis lipídico y proteico de rafts provenientes de neuronas ASMko, donde observamos un aumento en el contenido de SM y un patrón proteico alterado, nos llevaron a proponer que si bien el ensamblaje de rafts a nivel del aparato de Golgi es correcto, las alteraciones de estos microdominios en la MP podrían comprometer algunas de las funciones en las que los rafts juegan un papel crítico como es el caso de la distribución polarizada de ciertas moléculas.

#### 4.3.1 Análisis de la distribución polarizada de moléculas de rafts en neuronas hipocampales de ratones ASMko.

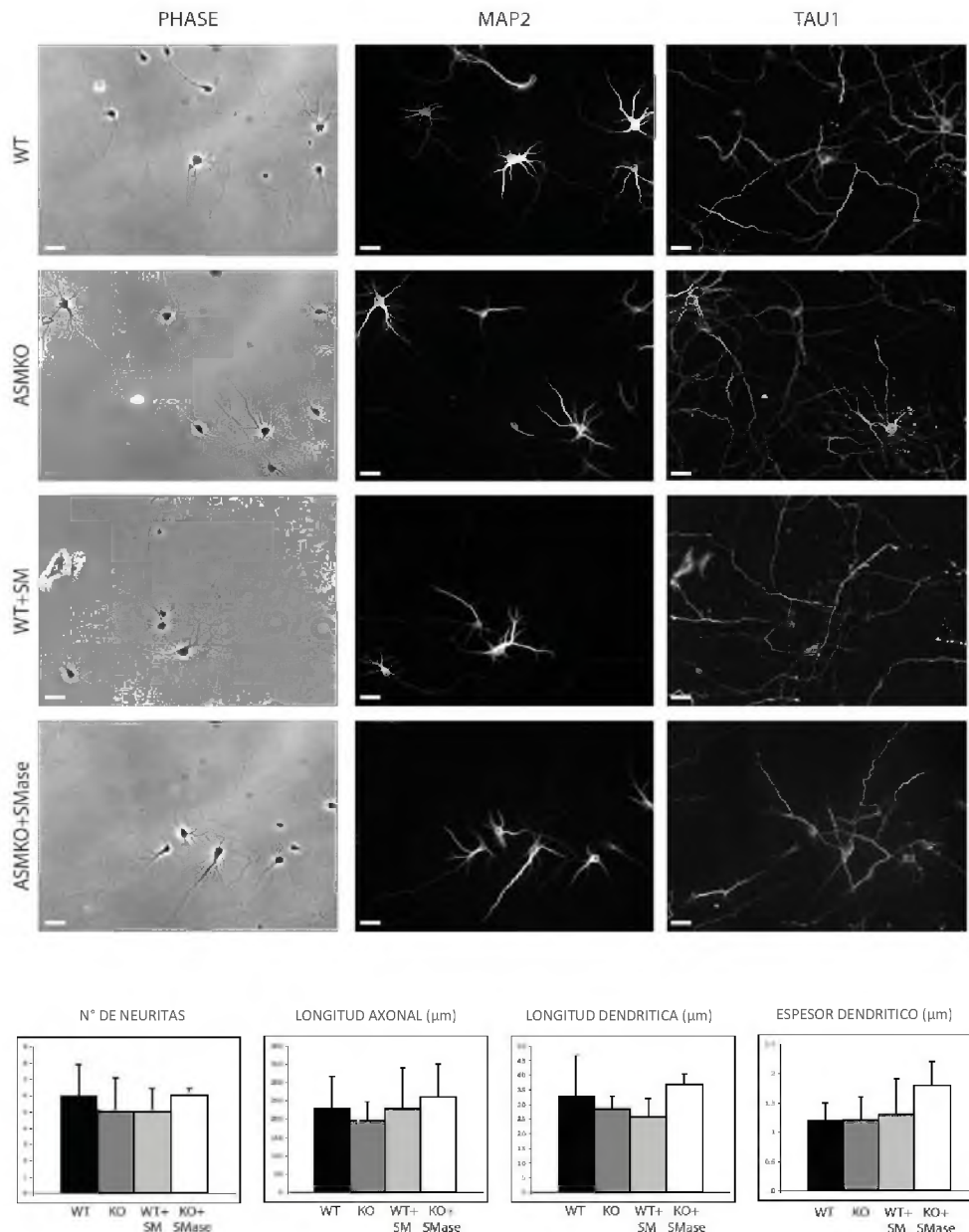
A los fines de evaluar esta hipótesis estudiamos la localización de moléculas enriquecidas en rafts como PrP<sup>C</sup> y GM1 (demostrado en esta tesis) y moléculas no residentes en estos dominios como TfRc y APP (De Strooper y col., 1995; Ledesma y col., 1999; Abad-Rodriguez y col., 2004). Inmunofluorescencias en neuronas hipocampales maduras en cultivos primarios de ratones wt confirmaron la distribución axonal de PrP<sup>C</sup> ( $90 \pm 5,5\%$ ) y de GM1 ( $95 \pm 6\%$ ) observada anteriormente en neuronas provenientes de rata (**Fig. 41A**, N=3 cultivos independientes, 20 células de cada cultivo,  $***p<0,001$ ). Sin embargo, en neuronas de ratones ASMko cantidades significativas de PrP<sup>C</sup> y GM1 se encontraron en dendritas ( $45 \pm 18\%$  y  $51 \pm 4\%$ , respectivamente; **Fig. 41A**, N=3 cultivos independientes, 20 células de cada cultivo,  $p>0,05$ ).

Por otro lado, proteínas no constitutivas de rafts (APP y TfRc), que en neuronas hipocampales en cultivo son marcadores axonales (Yamazaki y col., 1995) y dendríticos (West y col., 1997) respectivamente, presentaron un enriquecimiento axonal y dendrítico similar tanto en neuronas wt como ASMko (**Fig. 41B**).



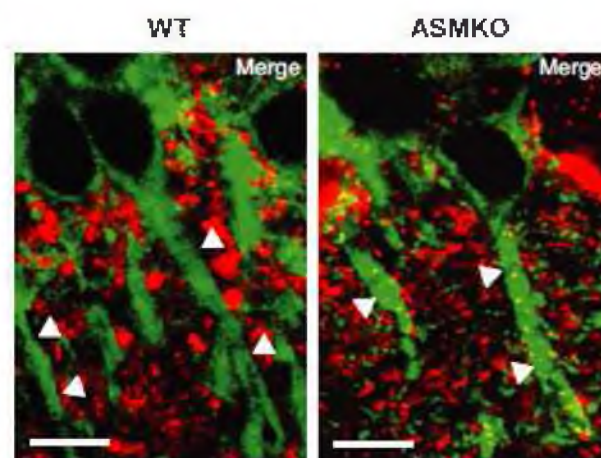
**FIGURA 41. Imágenes representativas mostrando la distribución aberrante de GM1 y PrP<sup>C</sup> en neuronas ASMko *in-vitro*.** (A) Imágenes de contraste de fase o DIC e inmunofluorescencias dobles (merge) de ejemplos representativos de neuronas maduras wt y ASMko incubadas con anti-PrP<sup>C</sup> o la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica para marcar GM1 (marcación en verde). Además, las neuronas fueron incubadas simultáneamente con anti-MAP2 (rojo) para marcar dendritas. (B) Imágenes de contraste de fase o DIC e inmunofluorescencias dobles (merge) de ejemplos representativos de neuronas maduras wt y ASMko incubadas con anti-APP o anti-TfRc (marcación en verde). Aquí también, las neuronas fueron incubadas simultáneamente con anti-MAP2 (rojo) para marcar dendritas. Los axones (MAP2 negativo), en todos los paneles, están indicados por las flechas. Las barras en blanco indican 10  $\mu$ m en todos los paneles.

Con el objetivo de determinar si estas alteraciones moleculares podrían deberse a alteraciones morfológicas, comparamos la morfología general, el número, grosor y longitud de las neuritas en neuronas wt y ASMko. En este caso, no observamos alteraciones significativas en ninguno de estos parámetros (ver **Fig. 42** con datos cuantitativos, N=3 cultivos independientes, 20 células para cada condición,  $p>0,05$ ).



**FIGURA 42. Imágenes de contraste de fase e inmunofluorescencia de neuronas wt, ASMko, wt + SM y Askko + Smase.** La acumulación de SM no altera la morfología celular de las neuronas. Para las inmunofluorescencias se utilizaron anticuerpos anti-MAP2 (marcador dendrítico) y Tau1 (marcador axonal) para la tinción de neuronas de las diferentes condiciones. Las barras blancas indican 10 µm. Los gráficos muestran la cuantificación de diferentes parámetros morfológicos: N° de neuritas, longitud de los axones, longitud de dendritas, y espesor de dendritas medido a 20 µmetros desde el cuerpo celular. Los datos están expresados como el valor medio  $\pm$  e.s. de 20 células analizadas para cada condición.

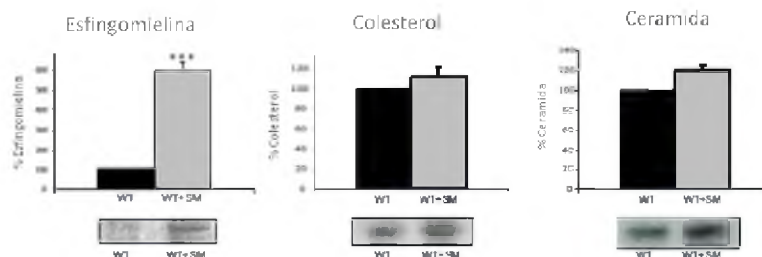
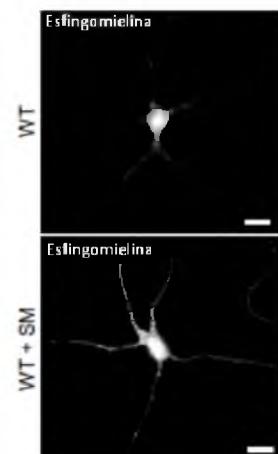
Para determinar la relevancia *in-vivo* de las observaciones hechas en neuronas en cultivo, realizamos un análisis de inmunofluorescencia en el hipocampo de ratones ASMko y wt. Este análisis confirmó la localización no polarizada de PrP<sup>C</sup> en dendritas y axones de cerebros ASMko en contraste con la distribución exclusivamente axonal en cerebros wt (**Fig. 43**).



**FIGURA 43. Imágenes representativas del análisis de inmunohistoquímica mostrando la distribución aberrante de PrP<sup>C</sup> en neuronas ASMko *in-vivo*.** Para el análisis inmunohistoquímico se usaron anticuerpos anti-PrP<sup>C</sup> (rojo) y MAP2 (verde) sobre cortes de tejido hipocampal proveniente de cerebros de ratones wt y ASMko. Las dendritas (MAP2 positivas) están indicadas por puntas de flecha. Las barras blancas indican 10 μm.

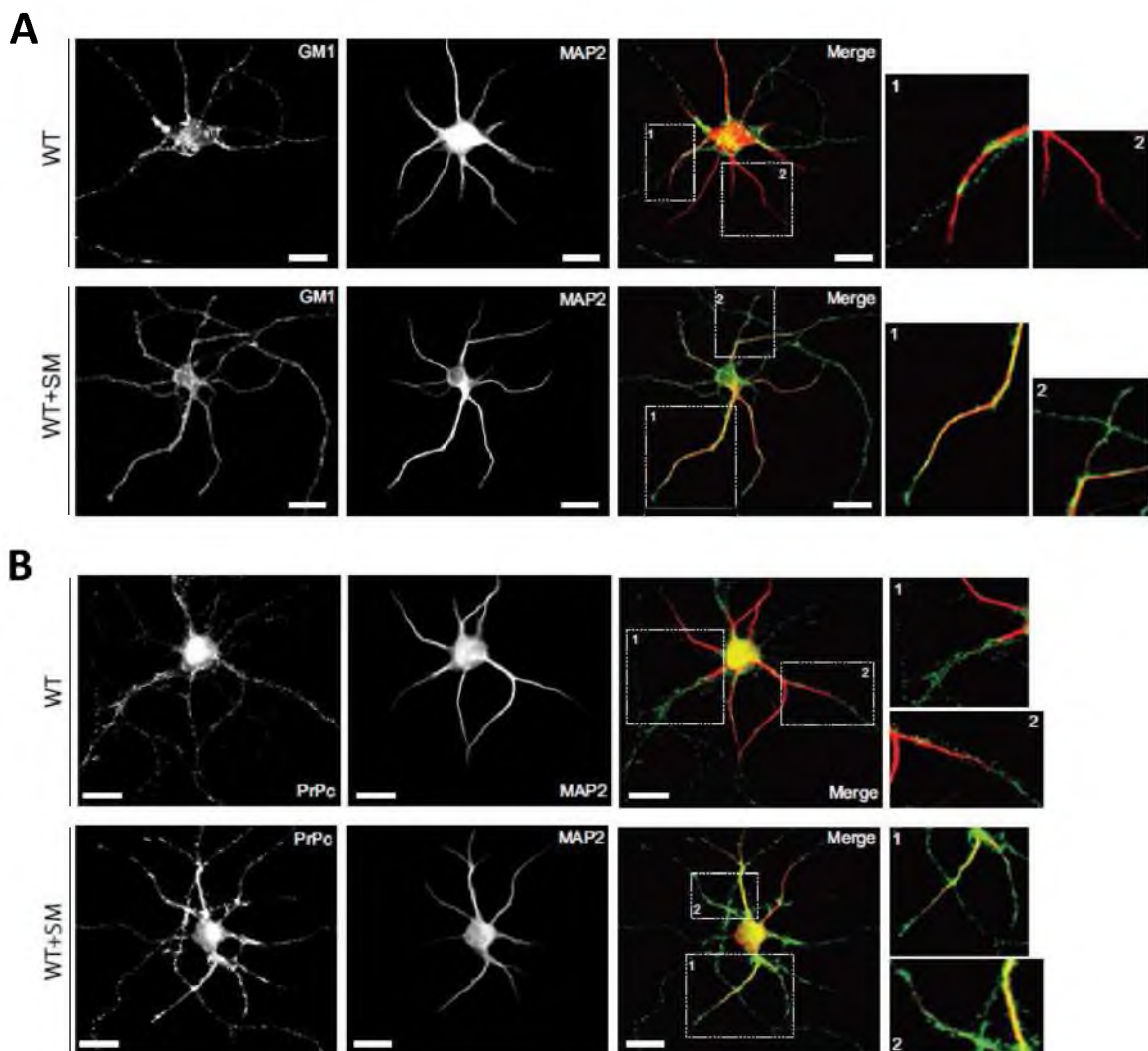
Este conjunto de resultados sugiere que las membranas rafts se ven más afectadas por la falta de actividad de la ASM que las membranas de mayor fluidez en las que se encuentran APP y TfRc. Esto es consistente con el hecho de que la gran mayoría de SM, lípido alterado en condiciones ASMko, está presente en rafts en neuronas maduras (Galván y col., 2005) y que el depósito de ASM a nivel de la MP se encuentra también en este tipo de microdominios (Grassme y col., 2001).

A los fines de investigar si la distribución anormal de PrP<sup>C</sup> y GM1 en neuronas ASMko era consecuencia directa del exceso de SM, este lípido fue experimentalmente aumentado en neuronas hipocampales de ratones wt mediante el agregado de SM exógena (ver materiales y métodos, apartado 3.5.8, pág. 46). La incubación de las neuronas con 40 µg/µL SM en presencia de ion fosfato, un inhibidor de ASM (Testai y col., 2004), durante 48 horas incrementó 5,9 veces los niveles de SM en la MP (N=3 cultivos independientes, 20 células de cada condición, \*\*\* $p < 0,001$ ), pero sin afectar el contenido de colesterol e incrementando sólo levemente (1,2 veces) la cantidad de ceramida ( $p > 0,05$ ) (Fig. 44A y B) y de esfingosina (0,22 y 0,32 pmol/nmol PC en neuronas wt no tratadas y tratadas, respectivamente) (ver materiales y métodos, apartado 3.5.7, pág. 45). Es importante destacar que el incremento de SM obtenido al agregar SM exógena era similar al observado en neuronas de ratones ASMko (ver Fig. 33 y Fig. 34).

**A****B**

**FIGURA 44. Cuantificaciones e imágenes mostrando el aumento de los niveles de SM en neuronas mediante el agregado de SM exógena.** (A) Análisis por TLC de los niveles de SM, colesterol y ceramida en neuronas wt tratadas o no con SM exógena. Los gráficos muestran los datos cuantitativos provenientes de tres cultivos independientes como porcentajes sobre el valor wt considerado como 100%. (B) Imágenes de fluorescencia de neuronas wt no permeabilizadas, tratadas o no con SM exógena e incubadas con Lysenin-MBP con el objetivo de visualizar las SM de la superficie celular. Las barras blancas indican 10 µm.

El análisis por inmunofluorescencia evidenció un aumento en la cantidad de PrP<sup>C</sup> y GM1 en las dendritas de las neuronas tratadas con SM ( $46,5 \pm 2,7\%$  de PrP<sup>C</sup> y  $51 \pm 5\%$  de GM1 aparecieron en dendritas; **Fig. 45A y B**, N=3 cultivos independientes, 20 células de cada condición,  $p > 0,05$ ). Ensayos de viabilidad celular por experimentos de TUNEL (ver materiales y métodos, apartado 3.5.8, pág. 46) descartaron que el tratamiento con el lípido indujera muerte celular ( $2,9 \pm 1,1\%$  y  $3,1 \pm 0,9\%$ , neuronas apoptóticas en cultivos tratados y no tratados, respectivamente). Tampoco se evidenciaron cambios morfológicos en dendritas y axones de las células tratadas con respecto a las no tratadas (ver también **Fig. 42**).



**FIGURA 45. Imágenes representativas mostrando como la acumulación de SM promueve la distribución no polarizada de GM1 y PrP<sup>C</sup>.** Inmunofluorescencias de doble marcación para GM1 (A) o PrP<sup>C</sup> (B) y MAP2 en neuronas wt sin tratar o tratadas con SM exógena. Las regiones enmarcadas, enumeradas y ampliadas a la derecha muestran con mayor claridad la distribución axonal (MAP2 negativo) de las moléculas en las neuronas no tratadas en contraste con su aparición en las dendritas (MAP2 positivo) en las neuronas tratadas. Las barras blancas indican 10 μm.

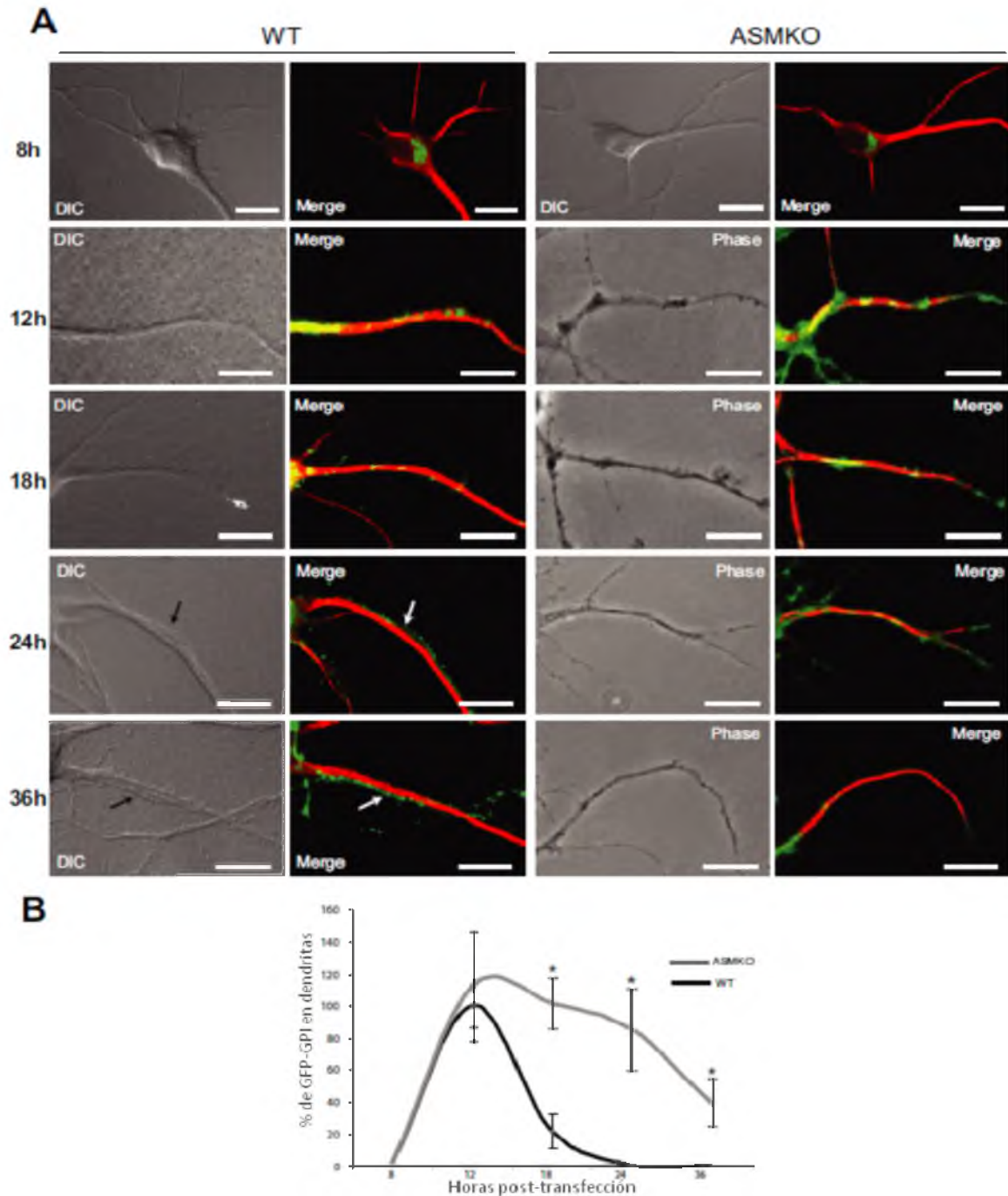


Esta serie de resultados sugiere que la alteración en la distribución axonal de moléculas constitutivas de rafts en neuronas ASMko es una consecuencia directa del aumento de SM que no afecta a la distribución axonal de moléculas que no están presentes en estos microdominios.

#### 4.3.2 Análisis del tráfico exocítico del dominio GPI en neuronas hipocampales de ratones ASMko.

Como se mencionó anteriormente se han descrito dos tipos de mecanismos para la distribución polarizada de proteínas de membrana axonal en neuronas hipocampales: *el transporte selectivo o la retención selectiva* (Sampo y col., 2003). En el primer caso las moléculas son transportadas por un proceso exocítico exclusivamente al dominio axonal después de ser procesadas en el aparato de Golgi. En el segundo caso, las proteínas son transportadas a ambos dominios, axonal y dendrítico, pero aparecen luego sólo en la membrana axonal debido a un rápido proceso endocítico desde las dendritas. Con el objetivo de determinar cuál de estos mecanismos estaba afectado en las neuronas ASMko, causando la distribución no polarizada de proteínas marcadoras de rafts y ancladas a membrana por el grupo GPI como el PrP<sup>C</sup>, decidimos comparar la distribución de los dominios GPI recientemente sintetizados en neuronas hipocampales wt y ASMko. Para ello transfectamos las neuronas con un cDNA de GPI ligado a GFP (Proteína Fluorescente Verde) que reproduce el tráfico intracelular de proteínas ancladas a membrana a través del dominio GPI (Keller y col., 2001)(**Fig. 46**). El análisis de inmunofluorescencia en las células transfectadas determinó que a las 8 horas post-transfección, la señal GFP aparecía en estructuras tubulares restringidas al cuerpo celular y era similar en neuronas wt y ASMko indicando un parecido nivel de expresión. A las 12 horas post-transfección tanto las neuronas wt como las ASMko presentaban similar marcación GFP en sus axones y a nivel de los segmentos iniciales de las dendritas ( $1,1 \pm 0,3$  veces más en neuronas ASMko con respecto a las wt, **Fig. 46**, N=2 cultivos independientes, 30 células transfectadas de cada uno de los dos cultivos,  $p > 0,05$ ). Sin embargo, a 18 y 24 horas post-transfección encontramos una mayor marcación GFP-GPI en las dendritas de neuronas transfectadas ASMko que en las wt (4,7 y 23 veces más, respectivamente; **Fig. 46**, N=2

cultivos independientes, 30 células transfectadas de cada uno de los dos cultivos, \* $p < 0,05$ ).



**FIGURA 46. Imágenes de inmunofluorescencia mostrando como en neuronas ASMko se observa una excitotoxicidad normal pero endocitosis retrasada del dominio GPI. (A)** Imágenes de contraste de fase/DIC y merge de inmunofluorescencias (rojo: MAP2, verde: GFP-GPI) de ejemplos representativos de los cuerpos celulares y/o segmentos iniciales de dendritas provenientes de neuronas wt y ASMko a 8, 12, 18, 24 y 36 horas post-transfección con el cDNA de GFP-GPI. Las flechas indican los axones que corren en paralelo a las dendritas. Las barras blancas indican 10  $\mu$ m. **(B)** El gráfico muestra los valores medios  $\pm$  e.s. de la señal fluorescente asociada a GFP-GPI/unidad de área en los segmentos iniciales de las dendritas post-transfección de neuronas wt y ASMko.

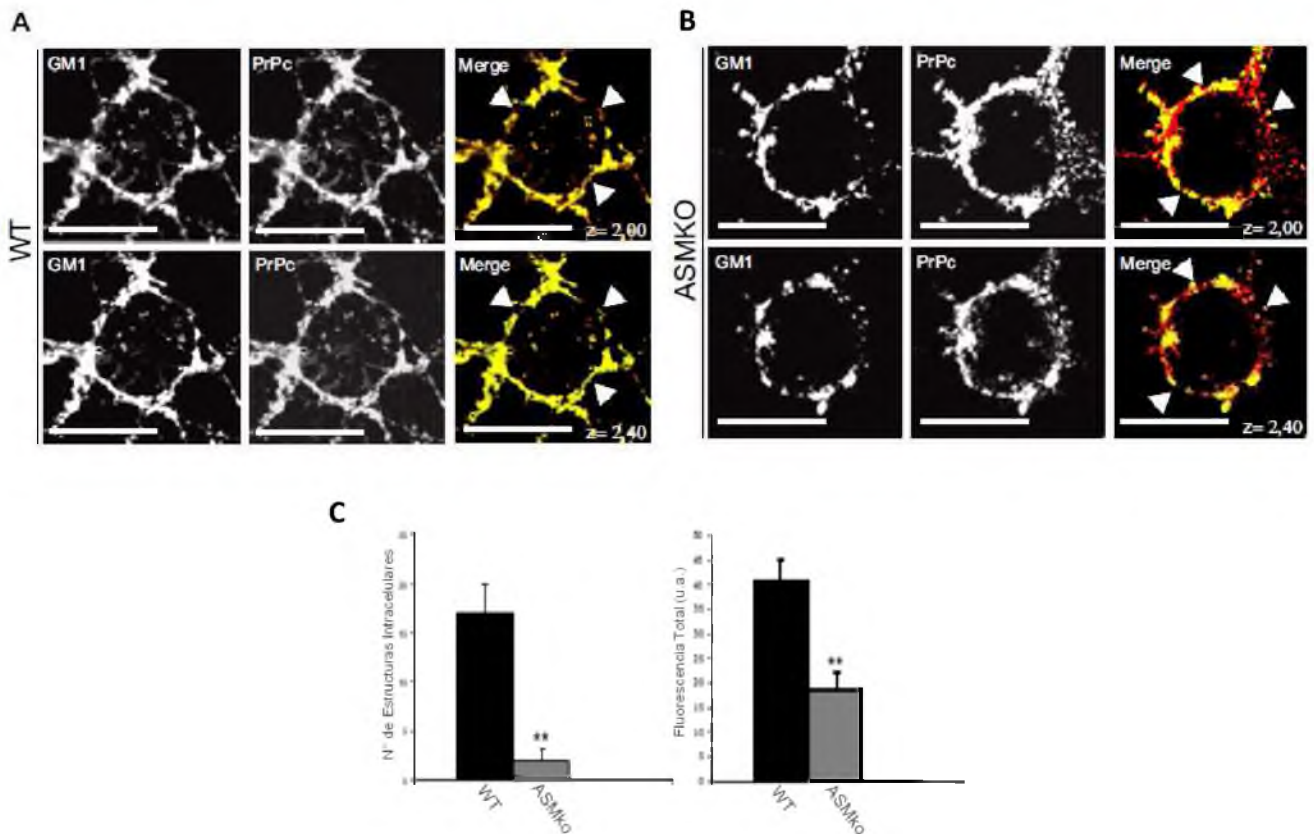
Estos resultados indican que la distribución polarizada del dominio GPI requiere de un transporte exocítico a axones y dendritas seguido de eventos endocíticos más activos en dendritas que limitan la expresión de GPI al axón en estado estacionario.

Nuestros datos demuestran que el transporte exocítico no está afectado por la carencia de ASM sugiriendo que alteraciones en la endocitosis serían responsables de la deficiencia en la polarización axonal de GPI en neuronas ASMko.

### 4.3.3 Análisis de la endocitosis de moléculas de rafts en neuronas hipocampales de ratones ASMko.

Para determinar si la deficiencia en la endocitosis forma parte del mecanismo por el que alteraciones en rafts afectan a la polaridad axonal de proteínas GPI, neuronas hipocampales wt y ASMko se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-PrP<sup>C</sup>, seguido de fijaciones celulares en PFA al 4% P/V a distintos periodos de tiempo (ver materiales y métodos, apartado 3.5.12, pág. 49). Por microrscopía confocal se midió el grado de internalización de esta proteína. Las neuronas se incubaron simultáneamente con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica para evidenciar la internalización de GM1 (Orlandi & Fishman, 1998; Puri y col., 2001). Este análisis reveló una eficiente internalización de ambas moléculas y su alto grado de colocación en estructuras intracelulares del cuerpo celular en neuronas wt (**Fig. 47A y C**).

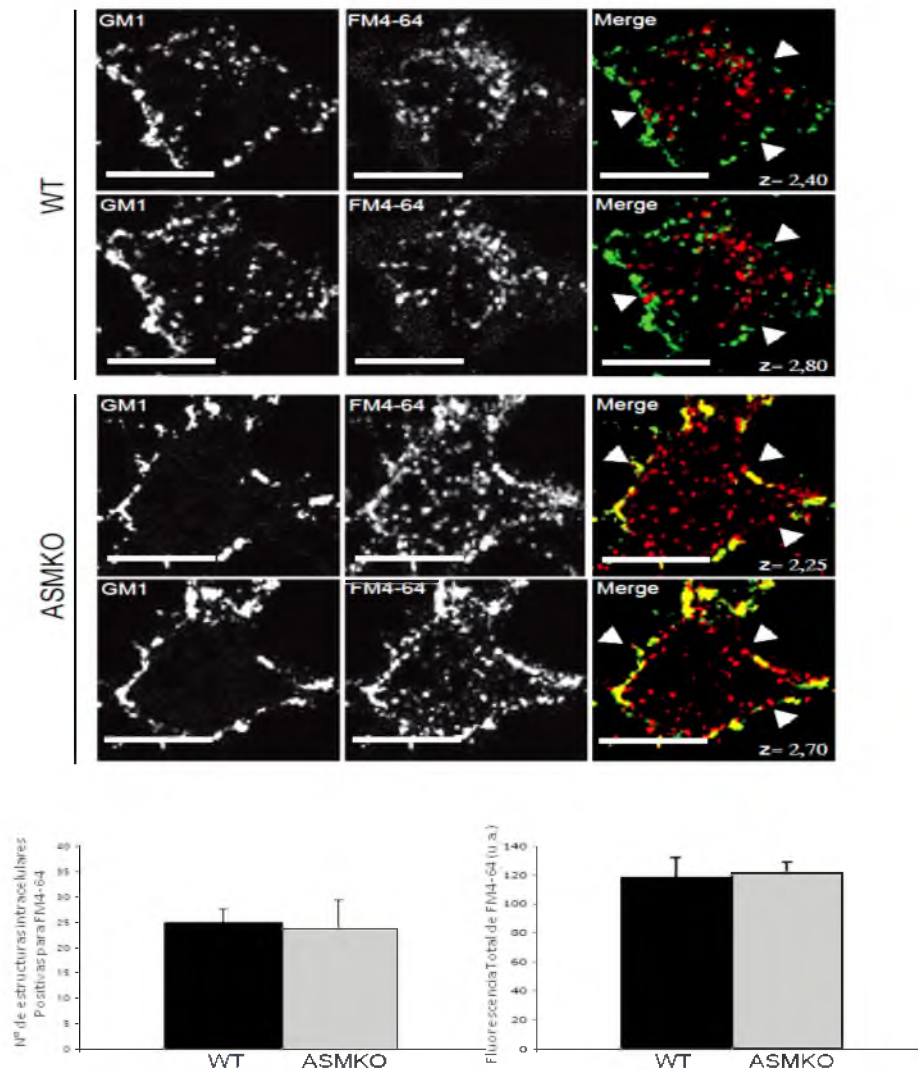
Cuando el número de estructuras intracelulares positivas para PrP<sup>C</sup> y GM1 se analizaron en neuronas ASMko observamos una fuerte reducción ( $17 \pm 2,9$  y  $2 \pm 1,2$  estructuras intracelulares en neuronas wt y ASMko, respectivamente)(**Fig. 47B**). Además del número de estructuras endocíticas, analizamos su tamaño, la fluorescencia asociada a cada una de estas estructuras, y la fluorescencia asociada a la totalidad de las mismas por célula como indicadores de la totalidad del material endocitado. Si bien la media de intensidad de cada estructura fue similar ( $1,5 \pm 0,7$  y  $1,7 \pm 0,2$  unidades arbitrarias (u.a.) en neuronas wt y ASMko, respectivamente), observamos una tendencia a tener un mayor tamaño en neuronas ASMko comparadas con las wt ( $22 \pm 10$  vs  $13 \pm 4$  u.a.). Sin embargo, de acuerdo con el menor número de estructuras, la señal fluorescente del total de estructuras endocíticas era significativamente menor en la condición ASMko ( $41,1 \pm 3,7$  y  $18,5 \pm 3,4$  u.a. en neuronas wt y ASMko, respectivamente; **Fig. 47C**, N=3 cultivos independientes, 15 neuronas provenientes de cada cultivo para cada condición,  $**p<0,01$ ).



**FIGURA 47. Imágenes representativas del análisis de endocitosis de moléculas asociadas a rafts en neuronas wt y ASMko.** Imágenes confocales del cuerpo celular provenientes de neuronas wt (**A**) o ASMko (**B**) luego de 10 minutos de internalización de la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica que se une específicamente a GM1 (verde en imágenes de colocalización) y del anticuerpo anti- PrP<sup>C</sup> (rojo en imágenes de colocalización). Los valores de Z indican la profundidad en  $\mu\text{m}$ , de cada imagen del cuerpo celular. Las puntas de flecha designan la superficie del cuerpo celular. (**C**) Gráficos mostrando el análisis cuantitativo donde los datos están expresados como valores medios  $\pm$  e.s. correspondiente del número de estructuras intracelulares positivas para GM1 y PrP<sup>C</sup> por área del cuerpo celular o como fluorescencia total en unidades arbitrarias.

Por otro lado, observamos que la ineficiente internalización de constituyentes de rafts no afectaba a moléculas no residentes de estos microdominios de membrana. De hecho, la tasa endocítica del marcador de fase fluida FM 4-46 no mostró diferencias entre neuronas wt y ASMko ( $25 \pm 2,6$  y  $23,7 \pm 5,7$  número de estructuras intracelulares y  $118,8 \pm 13$  y  $121,1 \pm 7,7$  u.a. de intensidad de fluorescencia total en neuronas wt y ASMko,

respectivamente; **Fig. 48**, N=3 cultivos independientes, 15 neuronas provenientes de cada cultivo para cada condición,  $p>0,05$ ).

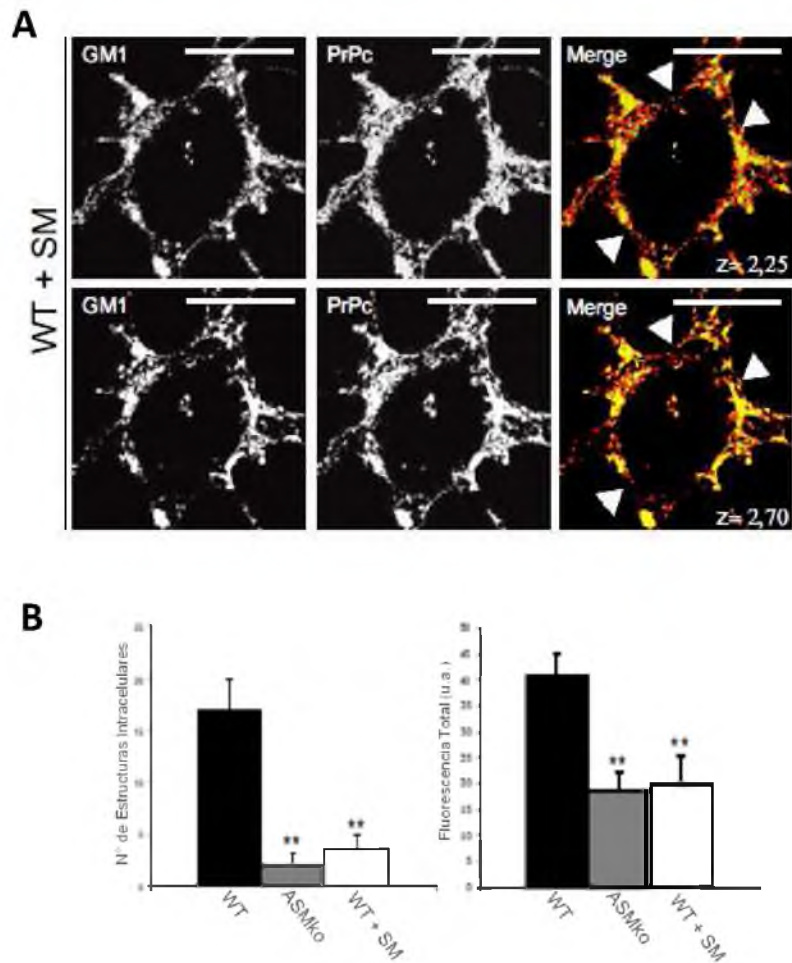


**FIGURA 48. Imágenes representativas mostrando que la endocitosis de fase fluida no se ve afectada en neuronas ASMko.** Imágenes confocales de cuerpos celulares de neuronas wt y ASMko luego de 10 minutos de internalización de FM4-64 (imágenes en rojo) y la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica (imágenes en verde). Los valores de Z indican la profundidad en  $\mu\text{m}$  dentro del cuerpo celular en cada imagen. Las puntas de flecha designan la superficie celular. Los gráficos muestran los valores medios  $\pm$  e.s. expresados como el número de estructuras intracelulares positivas para FM4-64 por cada cuerpo celular o como la intensidad total de fluorescencia asociada a estructuras positivas para FM4-64 expresado en unidades arbitrarias.

#### 4.3.4 El aumento de SM es responsable de la endocitosis deficiente de moléculas de rafts en neuronas hipocampales de ratones ASMko.

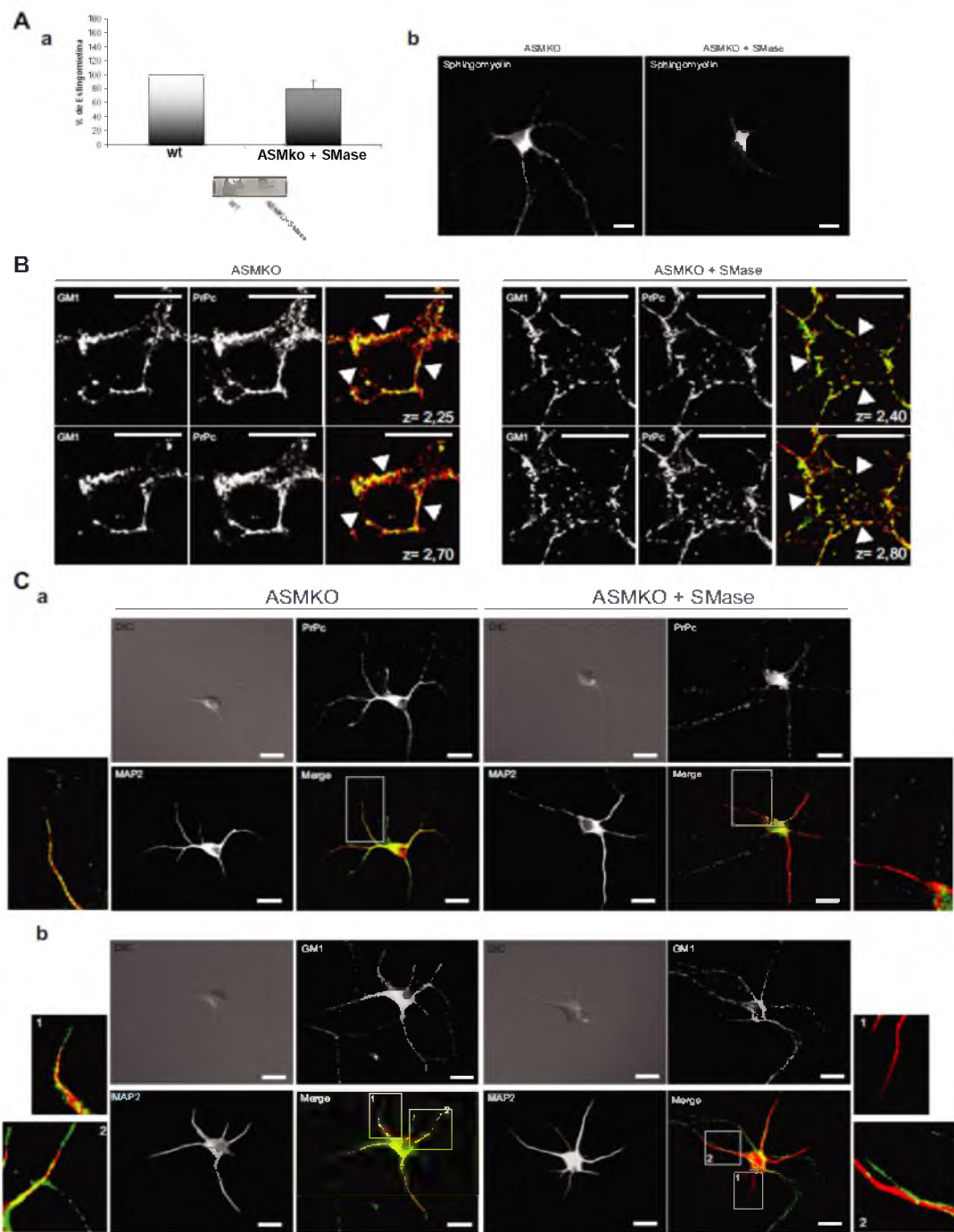
Nuestro siguiente objetivo fue profundizar en el mecanismo molecular que explicara la deficiencia en la endocitosis de componentes de rafts en neuronas carentes de ASM. En función de los resultados previos demostrando la importancia de la SM en la distribución polarizada de PrP<sup>C</sup> y GM1 y el incremento significativo de los niveles de este lípido en rafts de neuronas ASMko, hipotetizamos que el defecto en la endocitosis podría ser consecuencia directa del exceso de SM. Para demostrarlo medimos el grado de internalización de PrP<sup>C</sup> y GM1 en neuronas wt en las que aumentamos experimentalmente el contenido de SM (ver materiales y métodos, apartado 3.5.8, pág. 46). La adición de SM exógena redujo drásticamente el número de estructuras endocíticas positivas para PrP<sup>C</sup> y GM1 ( $3,6 \pm 1,3$  y  $17 \pm 1,9$  en neuronas tratadas y no tratadas, respectivamente; **Fig. 49A y B**). Similar a la situación en neuronas ASMko, la intensidad de fluorescencia de cada estructura no se alteró significativamente ( $1,5 \pm 0,5$  y  $1,7 \pm 0,2$  u.a. en neuronas tratadas y no tratadas, respectivamente), aunque el tamaño promedio se vió levemente aumentado en neuronas tratadas con SM ( $21 \pm 5$  y  $13 \pm 4$  u.a. en neuronas tratadas y no tratadas, respectivamente)(**Fig. 49B**, N=3 cultivos independientes, 15 neuronas de cada cultivo para cada condición,  $**p<0,01$ ).





**FIGURA 49. Imágenes representativas mostrando que altos niveles de SM disminuyen la endocitosis de GM1 y PrP<sup>C</sup>.** (A) Imágenes confocales del cuerpo celular provenientes de neuronas wt tratadas con SM, luego de 10 minutos de internalización de la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica que se une específicamente a GM1 (verde en imágenes de colocalización) y del anticuerpo anti- PrP<sup>C</sup> (rojo en imágenes de colocalización). Los valores de Z indican la profundidad en  $\mu\text{m}$ , de cada imagen del cuerpo celular. Las puntas de flecha designan la superficie del cuerpo celular. (B) Gráficos mostrando el análisis cuantitativo expresados como valores medios  $\pm$  e.s. correspondiente del número de estructuras intracelulares positivas para GM1 y PrP<sup>C</sup> por área del cuerpo celular o como fluorescencia total en unidades arbitrarias (comparar con Fig. 47).

Para confirmar la contribución del aumento de SM a la deficiente endocitosis en neuronas ASMko, las incubamos con esfingomielinidasa exógena (Smasa)(ver materiales y métodos, apartado 3.5.8, pág. 46). Este tratamiento redujo el contenido de SM de la MP en neuronas ASMko llevándolo a niveles similares a los de neuronas wt (**Fig. 50Aa y Ab**, N=3 cultivos independientes, 15 neuronas de cada cultivo para cada condición,  $p>0,05$ ). Si bien los niveles de ceramida fueron incrementados ligeramente (70 y 20 pmol/nmol PC en neuronas tratadas y no tratadas, respectivamente), la viabilidad y morfología celular no se vieron afectadas ( $2,7 \pm 0,6$  y  $2,3 \pm 1,5\%$  de células apoptóticas en neuronas tratadas y no tratadas, respectivamente) (Ver morfología en **Fig. 42**). El grado de internalización de PrP<sup>C</sup> y GM1 en neuronas ASMko tratadas con Smasa aumentó alcanzando niveles similares a los de neuronas wt ( $15,6 \pm 3,2$ ;  $17 \pm 2,9$  y  $2 \pm 1,2$  estructuras endocíticas y  $45,5 \pm 11$ ;  $42,8 \pm 5$  y  $16 \pm 2,1$  intensidad de fluorescencia total en neuronas ASMko tratadas con Smasa, neuronas wt y neuronas ASMko no tratadas, respectivamente; **Fig 50B**). Para demostrar que los altos niveles de SM responsables de la deficiente endocitosis también provocaban alteraciones en la polarización de las neuronas ASMko, analizamos la distribución de PrP<sup>C</sup> y GM1 después del tratamiento con Smasa. Las neuronas ASMko tratadas recuperaban el enriquecimiento axonal de PrP<sup>C</sup> y GM1 de manera comparable al de neuronas wt ( $87 \pm 4,7\%$  de PrP<sup>C</sup> y  $91,8 \pm 7\%$  de GM1 se encontró en axones de neuronas ASMko tratadas con Smasa; **Fig. 50Ca y Cb**; comparar también con **Fig. 41**).

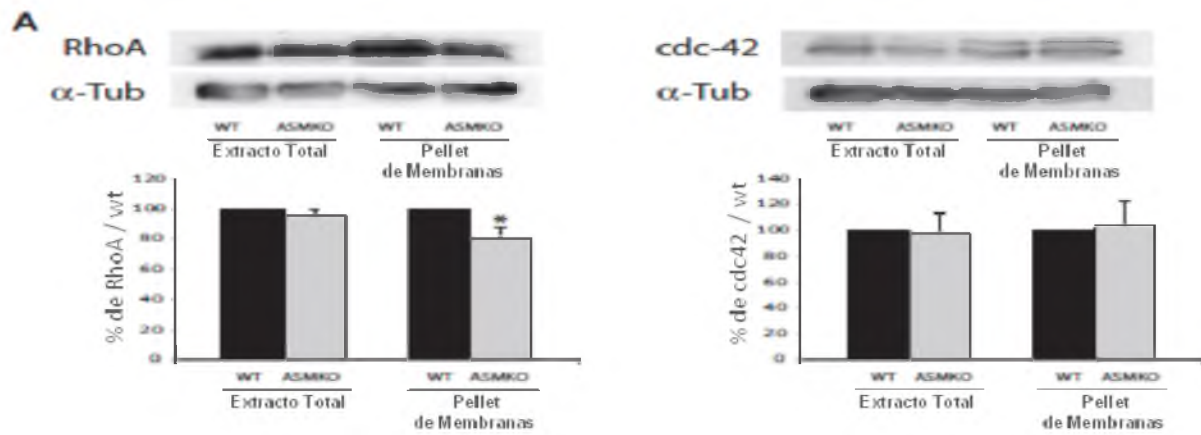


**FIGURA 50. Imágenes representativas demostrando que la reducción de los niveles de SM mediante tratamientos con Smasa restablece la endocitosis y la distribución polarizada de GM1 y PrP<sup>c</sup>.** (Aa) Análisis de los niveles de SM por medio de TLC en neuronas wt no tratadas y neuronas ASMko tratadas con Smase. Gráficos mostrando los datos cuantitativos expresados como porcentaje sobre el valor wt, considerado como 100%. (Ab) Imágenes de fluorescencia de neuronas ASMko no permeabilizadas, tratadas o no con Smase e incubadas con Lysenin-MBP, con el objetivo de visualizar la SM de la superficie celular. (B) Imágenes confocales representativas del cuerpo celular de neuronas ASMko tratadas o no con Smase después de 10 minutos de incubación con el anticuerpo anti-PrP<sup>c</sup>, para permitir su internalización, (rojo en la imagen de colocalización) o subunidad β de la toxina colérica (verde en la imagen de colocalización). Los valores de Z indican la profundidad, indicado en μm. Las puntas de flecha indican la superficie del cuerpo celular. (C) Imágenes representativas del análisis de inmunofluorescencia de doble marcación con PrP<sup>c</sup> (a) o GM1 (b) y anti-MAP2 de neuronas ASMko tratadas o no con Smase. Los recuadros enumerados, fueron ampliados para mostrar mejor el restablecimiento de la distribución axonal de PrP<sup>c</sup> y GM1 (procesos MAP2 negativos) en neuronas tratadas, en contraste con las neuronas no tratadas, donde se observa que esas moléculas colocalizan en dendritas con MAP2. Las barras blancas indican 10 μm en todos los paneles.

Estos resultados demuestran que la deficiente polarización axonal de componentes de rafts (PrP<sup>C</sup> y GM1) en neuronas carentes de ASM se debe a defectos en la endocitosis provocados por el aumento de la cantidad de SM.

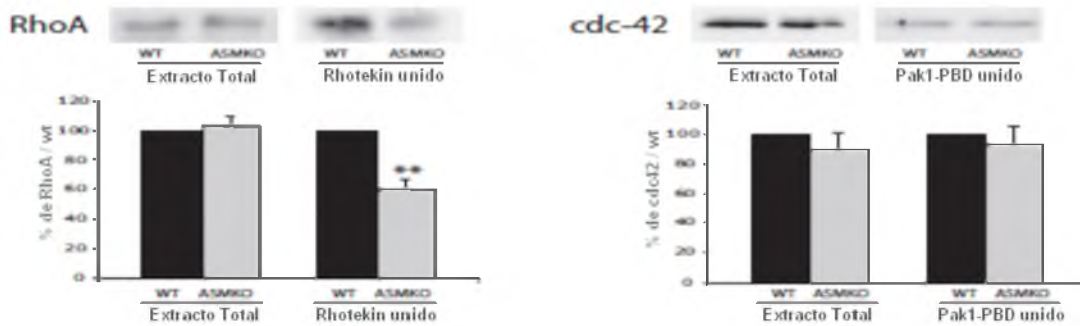
#### 4.3.5. Alteraciones en la unión a membrana de RhoA reducen la endocitosis de moléculas de rafts en neuronas ASMko.

Por último, quisimos profundizar en el mecanismo molecular responsable del efecto del aumento de SM en la endocitosis. Estudios en fibroblastos habían demostrado la influencia de los niveles de SM en la interacción de las Rho GTPasas (RhoA y cdc42) con la MP (Cheng y col., 2006). Por otro lado, se había descrito la participación de estas GTPasas en mecanismos de internalización independientes de clatrina en células no neuronales (Sabharanjak y col., 2002). A partir de estos datos, hipotetizamos que el aumento de SM observado en condiciones ASMko podría alterar la unión a membrana de estas GTPasas. Para comprobarlo, comparamos los niveles de RhoA y cdc42 unidas a membrana en cerebros wt y ASMko (las membranas se obtuvieron por centrifugación de extractos totales a 100.000 g). Observamos que mientras la unión de cdc42 no estaba alterada, la de RhoA mostraba una moderada pero significativa reducción ( $20 \pm 8\%$ ) en membranas ASMko comparadas con las wt (**Fig. 51**, N=3 experimentos independientes, cerebros de ratones adultos de cada condición para cada experimento (500  $\mu$ g de proteínas), \* $p < 0,05$ ), aunque no detectamos diferencias en los niveles totales de estas dos proteínas.



**FIGURA 51. Western blots mostrando la deficiente unión de RhoA a membrana en cerebros ASMko.** Extractos totales y preparados de membranas provenientes de cerebros de ratones wt y ASMko se estudiaron usando anticuerpos contra RhoA, cdc42 y tubulina. Los gráficos muestran valores medios de los niveles de RhoA y cdc42, normalizados en función de la cantidad de tubulina, expresados como el porcentaje sobre los valores wt considerado como 100%.

La unión a membrana determina la actividad de RhoA (Cheng y col., 2006). Con el objetivo de confirmar que la disminución observada en la unión de esta GTPasa se reflejaba en una menor actividad realizamos ensayos de unión a Rhotekin, un efector al que RhoA sólo se une cuando está activa (ver materiales y métodos, apartado 3.5.13, pág. 50). Confirmando la disminución en la actividad de RhoA, su afinidad por Rhotekin disminuyó un  $39,8 \pm 6\%$  en cerebros ASMko con respecto a los wt (**Fig. 52**). Por otro lado, y de acuerdo con la unión normal a membrana de cdc42, no se encontraron alteraciones en la actividad de esta GTPasa medida por la capacidad de unión a un dominio de la quinasa Pak1 que sólo sucede en forma activa (ver materiales y métodos, apartado 3.5.13, pág 50)(**Fig. 52**, N=3 experimentos independientes, 3 cerebros de ratones adultos de cada condición para cada experimento, \*\* $p < 0,01$ ).



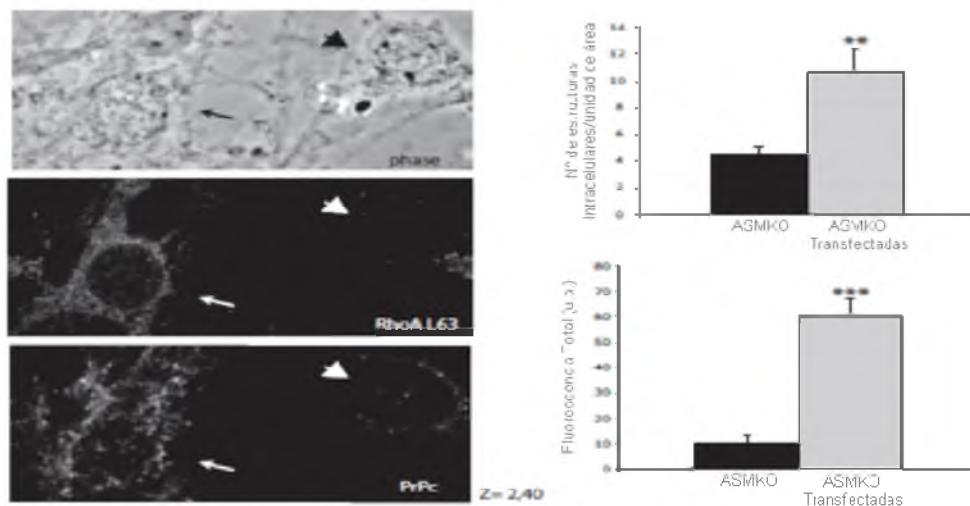
**FIGURA 52. Western blots mostrando que la activación de RhoA, pero no de cdc-42, está afectada en cerebros ASMko.** Extractos totales o de muestras unidas a Rhotekin o Pak1-PBD provenientes de cerebros de ratones wt y ASMko, fueron analizados usando anticuerpos específicos anti-RhoA o anti-cdc42, respectivamente. Los gráficos muestran los valores medios de los niveles de RhoA y cdc42 en extractos totales y de la cantidad de RhoA o cdc-42 unidas a Rhotekin o Pak1-PBD, respectivamente, normalizadas en función de su cantidad en los extractos totales. Los datos están expresados como porcentaje sobre el valor wt considerado como el 100%.

Para determinar si la acumulación de SM era la responsable del defecto de unión a membrana de RhoA se añadió SM exógena a neuronas de ratones wt. Este tratamiento redujo la unión de RhoA a membrana ( $36 \pm 11\%$  respecto a neuronas wt no tratadas) (**Fig. 53**, N=3 cultivos independientes, 200  $\mu$ g de proteínas/100.000 células de cada cultivo para cada condición,  $*p < 0,05$ ).



**FIGURA 53. Western blots muestran que el aumento de SM es el responsable del defecto de unión de RhoA a membrana en las neuronas ASMko.** Extractos totales y de preparados de membrana provenientes de neuronas en cultivo tratadas o no con SM, usando anticuerpos contra RhoA y tubulina. Los gráficos muestran los valores medios de los niveles de RhoA normalizados en función de la cantidad de tubulina, expresados como el porcentaje sobre el valor wt considerado como el 100%.

A partir de estos resultados, diseñamos un ensayo para rescatar los defectos de endocitosis en neuronas ASMko basado en aumentar la actividad deficiente de RhoA. Para ello transfectamos neuronas ASMko con una forma constitutivamente activa de la GTPasa (Takaishi y col., 1995; Kotani y col., 1997). En estas condiciones los niveles de internalización de PrP<sup>C</sup> mejoraron significativamente ( $10,6 \pm 1,8$  y  $4,5 \pm 0,6$  estructuras intracelulares /  $60 \pm 7$  y  $10 \pm 3,5$  u.a. en la intensidad total de fluorescencia, en neuronas ASMko transfectadas y no transfectadas, respectivamente; **Fig. 54**, N=3 experimentos independientes, 15 células para cada condición de cada uno de los cultivos,  $**p < 0,01$  y  $***p < 0,001$ ).



**FIGURA 54. Imágenes representativas mostrando que la sobreexpresión de RhoA en neuronas ASMko restaura la internalización de PrP<sup>C</sup>.** Imagen confocal de neuronas ASMko transfectadas (indicada por la flecha) o no (punta de flecha) con la forma activa de RhoA (L63) luego de 10 minutos de internalización del anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup>. Los valores de Z indican la profundidad en  $\mu\text{m}$  de la imagen dentro del cuerpo celular mostrado. Los gráficos muestran el análisis cuantitativo expresado como valores medios  $\pm$  del número de estructuras intracelulares positivas para PrP<sup>C</sup> por unidad de área del cuerpo celular o como el total de fluorescencia en unidades arbitrarias.

Estos resultados demuestran la influencia de los niveles de SM en la unión a membrana de la GTPasa RhoA en neuronas hipocámpicas y su papel en la endocitosis de moléculas de rafts. Alteraciones en este mecanismo explican la deficiencia de la endocitosis en neuronas carentes de ASM.



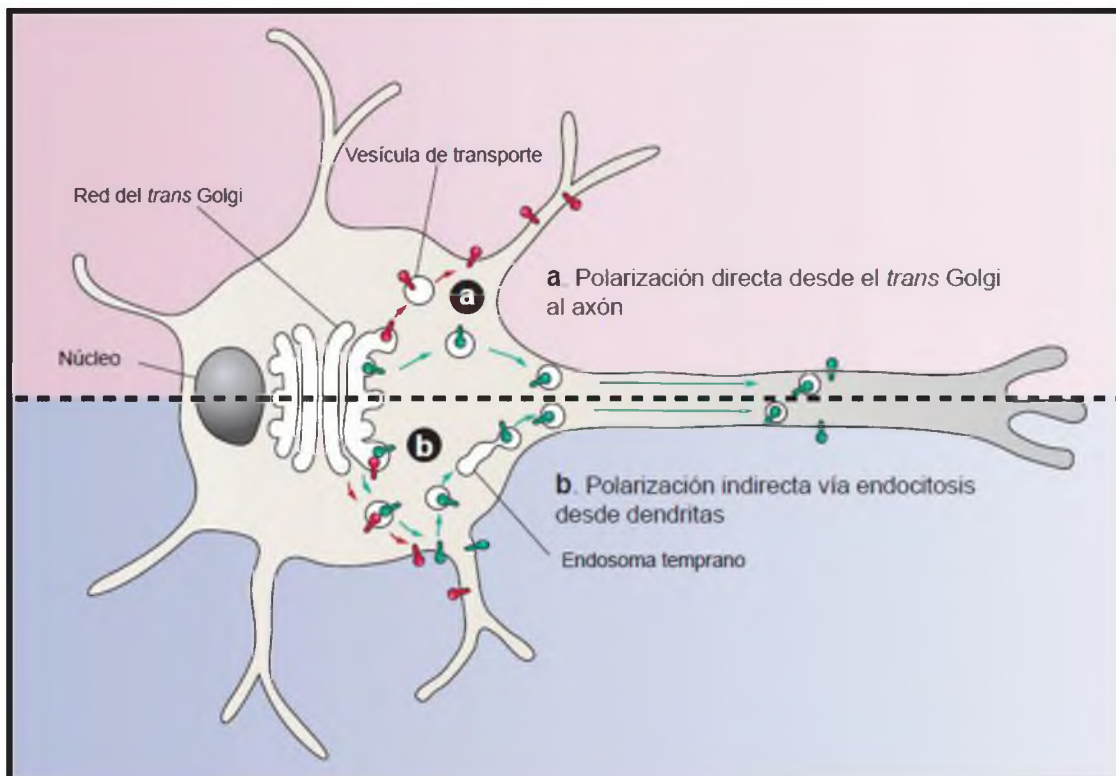
## 5. DISCUSIÓN

Los datos aportados en esta tesis doctoral tienen relevancia no sólo desde el punto de vista fisiológico sino también desde el patológico. Así, los resultados obtenidos contribuyen por un lado a aclarar el mecanismo molecular por el que los rafts participan en el establecimiento de la polaridad neuronal y por otro lado develan la contribución de alteraciones en rafts a la enfermedad de NPA. A continuación se discuten los resultados con especial atención a las observaciones más novedosas y a las preguntas que plantean.

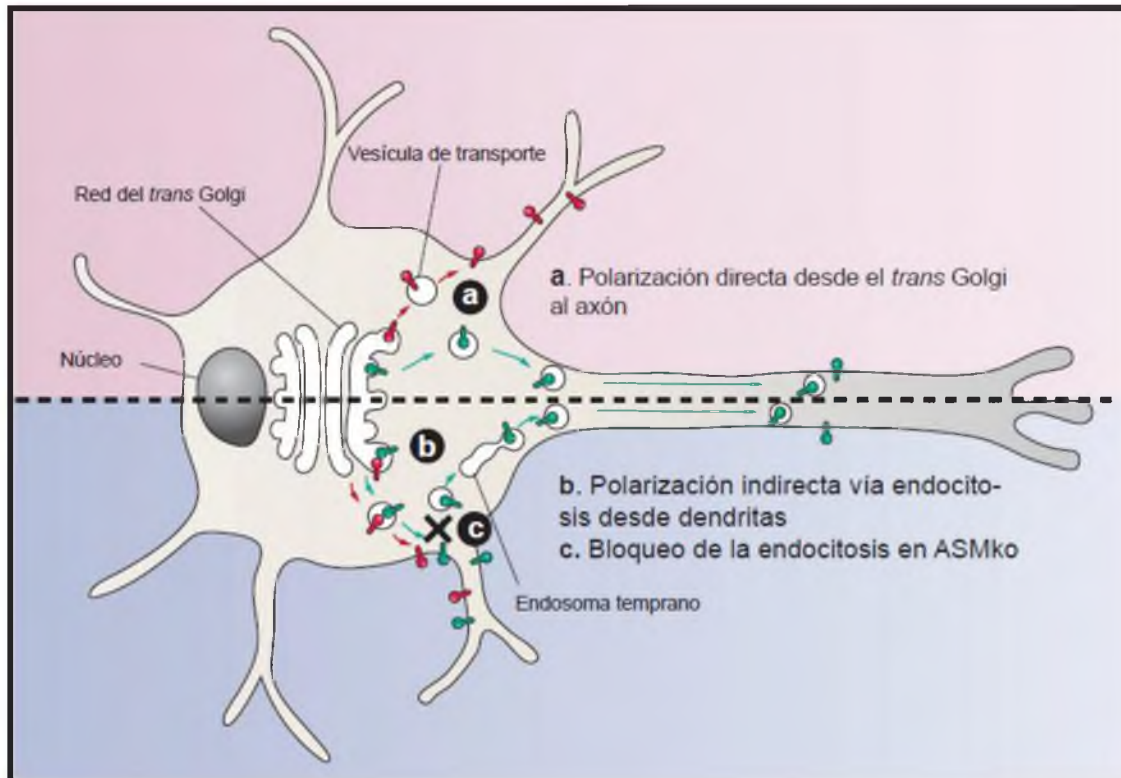
### **5.1.Relevancia de los rafts en la polarización axonal: mecanismo molecular.**

Aunque existían evidencias que demostraban la relevancia de los rafts en el establecimiento de la polaridad axonal en neuronas hipocampales (Ledesma y col., 1998; Ledesma y col., 1999), poco se sabía sobre el mecanismo molecular y sobre las moléculas que lo utilizaban para conseguir polarizarse. El trabajo realizado en esta tesis identifica a la proteína PrP<sup>C</sup> como una de ellas. Además, utilizando esta proteína como herramienta experimental demostramos que las proteínas GPI utilizan una vía indirecta para su localización axonal en neuronas hipocampales. Este era un tema controvertido en células epiteliales donde dos vías diferentes se habían propuesto para explicar la distribución apical de este tipo de proteínas: 1) por transcitosis desde la membrana basolateral hacia el dominio apical (Polishchuk y col., 2004) o 2) por transporte exocítico directo desde el TGN hacia la superficie apical (Paladino y col., 2006). Nuestros resultados, que muestran marcación del dominio GFP-GPI tanto en los axones como en las dendritas de neuronas hipocampales completamente polarizadas a tiempos cortos post-transfección y su presencia exclusivamente axonal a tiempos más

largos, apoyan un mecanismo basado en la retención selectiva a nivel axonal más que un transporte selectivo hacia este dominio como destino final. Observamos que después de la síntesis y del transporte exocítico tanto a axones como a dendritas, el dominio GPI sufre una endocitosis muy activa en dendritas que lo lleva a enriquecerse en estado estacionario en el axón (**Fig. 55**). Los rafts regulan esta endocitosis que se ve reducida por alteraciones lipídicas (por ejemplo el incremento de SM) de estos microdominios de membrana, resultando en una permanencia anormal de proteínas GPI en las dendritas y en su localización no polarizada (**Fig. 56**).



**Figura 55. Modelo propuesto para la polarización axonal de dominios GPI en la que intervienen los rafts.** Estas proteínas con el dominio GPI (en verde), seguirían una vía exocítica luego de ser sintetizadas, junto con otras proteínas de membrana (en rojo), desde el TGN hacia la superficie celular, tanto dendrítica como axonal. Luego ese dominio GPI sufriría una endocitosis muy activa desde la membrana dendrítica, que lo llevaría por una vía de transporte particular (*Transcitosis*), hacia su destino final donde será fuertemente retenido, la membrana axonal.



**Figura 56. Modelo que representa el defecto en el tráfico polarizado de una proteína GPI en neuronas ASMko.** Las proteínas con el dominio GPI seguirían una vía exocítica, luego de ser sintetizadas, desde el TGN hacia la superficie celular tanto dendrítica como axonal. La endocitosis deficiente desde la membrana dendrítica alteraría su distribución final que en vez de ser netamente axonal como en neuronas wt se encontraría en la superficie de las dendritas y de los axones.

La relevancia de los lípidos en fenómenos de endocitosis se ha estudiado en distintos escenarios. Un estudio pionero demostró que los niveles de colesterol regulan la endocitosis de esfingolípidos (Puri y col., 1999) y la motilidad de endosomas tardíos (Lebrand y col., 2002). Además, niveles de colesterol endosomal elevados en fibroblastos de pacientes con NPA inhibían la función de Rab4 alterando el reciclaje de transferrina (Choudhury y col., 2004). Por otro lado, la adición de colesterol y glicosfingolípidos, pero no de ceramida o fosfatidilcolina, estimulaban específicamente la endocitosis mediada por caveolina que es un componente de rafts (Sharma y col., 2004).

Los resultados obtenidos en esta tesis resaltan la importancia de la SM en la regulación de la endocitosis en neuronas. Es interesante destacar que los altos niveles de SM en la MP tienen un efecto contrario al descrito para el incremento de colesterol o glicoesfingolípidos (Sharma y col., 2004) causando una reducción de la endocitosis en vez de su estimulación. Todo lo anterior apoya un modelo en el que los lípidos, según su tipo, modulan de forma diferencial la endocitosis participando en distintos pasos del proceso lo que además puede variar según el tipo celular.

Nuestro estudio revela además el papel de la GTPasa RhoA, pero no de cdc42, en la internalización vía rafts de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocampales. Estos resultados contrastan con el requerimiento de cdc42 para la internalización de proteínas ligadas a GPI en otros tipos celulares (Sabharanjak y col., 2002). Demostramos que el incremento de SM en rafts de la MP disminuye la unión a membrana de RhoA y por lo tanto su activación. Consistente con estas observaciones, la expresión de RhoA constitutivamente activo restauró los niveles de endocitosis de PrP<sup>C</sup> en neuronas ASMko. Curiosamente, se ha descrito en células no neuronales que la unión a membrana de RhoA también se ve afectada por cantidades reducidas de SM (Cheng y col., 2006), lo que sugiere que niveles adecuados de SM son necesarios para una correcta unión de RhoA a membrana y que tanto un exceso (resultados de esta tesis) como un defecto (Cheng y col., 2006) de este lípido conducen a la inactivación de RhoA y por lo tanto a un trastorno en la endocitosis.

## 5.2. Polarización axonal de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocampales: implicancias fisiológicas y patológicas.

Los estudios realizados en esta tesis sobre los niveles y distribución de PrP<sup>C</sup> durante el desarrollo neuronal y sobre su presencia en rafts abren perspectivas para la poco conocida fisiología de esta proteína. Los resultados sugieren que PrP<sup>C</sup> no juega un rol esencial en la especificación y/o crecimiento axonal en neuronas hipocampales, ya que durante la fase de elongación axonal está igualmente distribuida en conos de crecimiento del proceso que luego se convertirá en axón como en los de aquéllos que serán dendritas. Además, los niveles de expresión de PrP<sup>C</sup> en este estadio temprano de desarrollo son muy bajos comparados con los de estadios tardíos, donde el crecimiento de las neuritas es mucho menor. Estas observaciones contrastan con las descritas en neuronas de retina donde PrP<sup>C</sup> está enriquecida en axones en fase de elongación por lo que se postuló que esta proteína sería relevante para el crecimiento axonal de estas neuronas (Sales y col., 2002). La comparación de estos datos con los nuestros sugiere que la función de PrP<sup>C</sup> podría diferir dependiendo del tipo neuronal. Por el contrario nuestros resultados sugieren que PrP<sup>C</sup> juega un papel relacionado con eventos axonales en neuronas hipocampales maduras ya que esta proteína se encuentra restringida a la superficie axonal de estas células. Esta contribución no sería en todo caso sináptica ya que no encontramos colocalización de PrP<sup>C</sup> con el marcador sináptico, synaptophysin. El descubrimiento de que PrP<sup>C</sup> está enriquecido en rafts de neuronas hipocampales maduras, abre la posibilidad de que esta proteína esté involucrada en eventos de señalización celular, para los que estos microdominios lipídicos son clave en muchos tipos celulares (Simons & Toomre, 2000). La presencia de PrP<sup>C</sup> en rafts y la dependencia de estos dominios lipídicos para su polarización axonal puede tener implicancias patológicas. De hecho, la alteración que observamos en la

polaridad de PrP<sup>C</sup> en neuronas hipocámpales de los ratones ASMko en cultivo, que confirmamos *in-vivo*, sugiere que este defecto también se da en el cerebro de pacientes con NPA y podría contribuir a las deficiencias cognitivas y a la neurodegeneración que sufren.

Nuestros resultados podrían también tener implicancias para la patología de otra enfermedad, la priónica. En ella, PrP<sup>C</sup> se transforma en una isoforma resistente, PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner, 1998). Estudios realizados en células epiteliales han sugerido que esta transformación podría darse en rafts y depender del contenido lipídico de los mismos (Taraboulos y col, 1995). Nuestros datos aportan información sobre los requerimientos lipídicos que determinan la participación de PrP<sup>C</sup> en rafts y su insolubilidad en detergentes, que depende de colesterol pero no de SLs. Sin embargo, alteraciones en los niveles de ambos lípidos conducen a la desorganización de los rafts que da lugar a una despolarización en la distribución de PrP<sup>C</sup>. Por ello proponemos que mientras el colesterol podría ser un lípido de rafts esencial para conferir insolubilidad a PrP<sup>C</sup>, él sólo no sería capaz de formar rafts funcionales que consigan conducir la distribución polarizada de PrP<sup>C</sup>. Para que esto último ocurra se necesitaría del aporte de los SLs.

### **5.3. La ASM como moduladora de la composición proteica y lipídica de la MP: implicancias para NPA.**

Un hallazgo importante y sorprendente de este trabajo es la relevancia que la ASM tiene en la composición lipídica y proteica de la MP. La ASM se consideró durante mucho tiempo una enzima exclusivamente lisosomal, que como su propio nombre indica, necesita de un pH ácido para que su actividad sea óptima (Stoffel y col., 1999).

Aunque más recientemente se observó un pequeño depósito de esta enzima en la superficie celular (Grassmé y col., 2001; Gulbins, 2003), se consideraba que la esfingomielinidasa neutra era la principal responsable de controlar los niveles de SM en la MP, debido a su abundancia en este sitio celular y a su máxima actividad a pH neutro. Sin embargo, nuestros datos demuestran que la carencia de ASM en neuronas lleva a un drástico incremento de los niveles de SM en MP, que afecta principalmente a los rafts donde este lípido está especialmente enriquecido.

Proponemos varias razones para explicar este sorprendente efecto. Por un lado, la capacidad que tiene la ASM para degradar SM en partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) a pH neutro (Schissel y col., 1998), lo que sugiere que la enzima conserva su funcionalidad, al menos en parte, en un amplio rango de pH. Por otro lado, la posibilidad de que exista un microambiente ácido en las proximidades de la superficie celular (Bourguignon y col., 2004; Steinert y col., 2008), que proporcione las condiciones óptimas para la actividad de ASM. Además, las alteraciones lipídicas provocadas por la falta de ASM podrían afectar a la actividad de su enzima análoga, la esfingomielinidasa neutra, agravando de esta manera la acumulación de SM. En apoyo de esta idea, está la observación de que la actividad de la esfingomielinidasa neutra está reducida en cerebros de ratones ASMko a pesar de que el gen que codifica para esta enzima no está afectado (Horinouchi y col., 1995).

Independientemente de cuál sea la razón por la que alteraciones en la ASM tienen un impacto tan marcado en la MP, este hecho tiene implicancias en la patología de NPA. Ésta se ha considerado tradicionalmente como una enfermedad de depósito lisosomal y se postuló que deficiencias en la función de estas organelas, debidas a la acumulación de SM, originarían la patología (Futerman & van Meer, 2004). Sin embargo, los datos presentados en esta tesis doctoral demostrando que los niveles de

SM están igualmente incrementados en membranas lisosomales y no lisosomales, amplían las posibles alteraciones con consecuencias patológicas. Las anomalías que observamos a nivel de la MP, y más en concreto en dominios de rafts, son una de ellas. En este trabajo, demostramos que esta alteración lleva a una deficiente polarización en neuronas hipocampales carentes de ASM donde moléculas normalmente restringidas al axón aparecen también en dendritas. Además de las consecuencias deleterias que una composición molecular alterada tendría en la funcionalidad de axones y dendritas, la deslocalización de proteínas ancladas a grupos GPI que son en muchos casos receptores de factores neurotróficos (Saarma, 2000), podrían reducir la capacidad de supervivencia de las neuronas y explicar la neurodegeneración que se observa en ratones ASMko y en pacientes con NPA. Los resultados aquí presentados invitan a analizar esta posibilidad.

#### **5.4. Modulación de la SM como posible terapia para NPA: efectos en otros lípidos?**

La identificación de la acumulación de SM en MP como un factor importante en la patología neuronal en ausencia de ASM convierte a este hecho en una nueva diana terapéutica. En efecto, los experimentos realizados para confirmar el papel de los rafts en la polarización de moléculas axonales como PrP<sup>C</sup> o GM1 sugieren que la modulación de la SM podría convertirse en una posibilidad de terapia para la enfermedad NPA. Así, demostramos que mientras que la adición de SM a neuronas wt reproduce los defectos en endocitosis y en la polarización de marcadores axonales de las neuronas ASMko, la disminución de este lípido a través del uso de esfingomielinidasa exógena revierte estos defectos.



Un aspecto a tener en cuenta al modular lípidos es la especificidad del tratamiento sobre el lípido diana. Se ha demostrado que cambios en los niveles y/o distribución de un lípido pueden afectar tales parámetros en otros lípidos (Marks & Pagano, 2002). Así, la acumulación de esfingolípidos conduce a alteraciones en la distribución intracelular del colesterol en fibroblastos y macrófagos en diversas lipidosis incluyendo NPA (Puri y col., 1999; Leventhal y col., 2001). Se especula que el colesterol podría ser atrapado dentro de los compartimientos cargados de esfingolípidos como resultado de la afinidad entre ellos (Pagano y col., 2000). Sin embargo, nuestros resultados muestran que los niveles de colesterol en la membrana plasmática de neuronas provenientes de ratones ASMko no son más altos a pesar del claro aumento de SM. Este fue también el caso cuando aumentamos los niveles de SM a nivel de MP por el agregado exógeno de este SL, sugiriendo que las neuronas reaccionan de una manera específica y dependiente del tipo celular a esta acumulación de SM en la MP.

Alternativamente, podemos pensar que las neuronas deficientes en ASM podrían responder con un flujo de salida defectuoso del colesterol desde las organelas de almacén intracelular (es decir, lisosomas) hacia la MP, como ya se ha descrito en macrófagos de los pacientes con enfermedad de Niemann-Pick Tipo C (Leventhal y col., 2001). Esto compensaría la reducción en la endocitosis, dando lugar a los niveles normales de colesterol a nivel de la MP de las neuronas ASMko en los estados estacionarios. En cualquier caso nuestros resultados apuntan a que cambios en los niveles de SM podrían conseguirse sin alterar los niveles o distribución de otros lípidos en neuronas ASMko.

Aunque la modulación de lípidos en cerebro podría ser beneficiosa para muchas lipidosis hoy en día supone un gran reto. La barrera hematoencefálica, al tiempo que cumple una función protectora, convierte al cerebro en un compartimento estanco

donde la entrada está muy regulada (Goldstein & Betz, 1986; Wolburg & Risau, 1995; Kandel y col., 2000; Pardrige, 2002). Por ello, intervenciones a nivel periférico tienen pocas posibilidades de modular los niveles de lípidos en cerebro (Dietschy & Turley, 2001; Ledesma & Dotti, 2006). Este es el caso de dietas dirigidas a bajar o subir los niveles de colesterol en sangre que sin embargo no afectan los niveles cerebrales de este lípido. El uso de pequeñas moléculas con capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica y que pudieran modular la actividad de enzimas metabólicas de lípidos podría ser una posibilidad. En el caso de la enfermedad NPA, aunque las mutaciones que causan la pérdida de función de la ASM hacen imposible aumentar la actividad de esta enzima, podría contemplarse la activación de su enzima análoga en la MP: la esfingomielinidasa neutra. Diversos compuestos se han identificado como activadores específicos de esta enzima (Alpert & Beaudet, 1981; Sakuragawa, 1995; Reismann & Tulassay, 2008). Investigaciones recientes han demostrado la eficacia de uno de estos activadores, el glucocorticoide sintético dexametasona, para reducir los niveles de SM en cerebro y corregir deficiencias sinápticas en ratones ASMko (Arroyo y col., 2014). Estos resultados abren nuevas perspectivas para el tratamiento de una enfermedad que actualmente no tiene cura.

## 6. CONCLUSIÓN FINAL

Los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La proteína PrP<sup>C</sup> tiene niveles de expresión muy bajos y no está polarizada en neuronas hipocampales inmaduras en estadio 3.
2. La PrP<sup>C</sup> no se incorpora a rafts en neuronas en estadio 3 por la deficiencia en la formación de estos microdominios debido a los bajos niveles de algunos de sus componentes lipídicos en este estadio del desarrollo.
3. La PrP<sup>C</sup> aumenta su nivel de expresión y su presencia en rafts en neuronas hipocampales maduras en estadio 5 donde adquiere una localización polarizada al axón por un mecanismo de retención selectiva que requiere una endocitosis activa desde las dendritas.
4. La reducción de los niveles de colesterol o SLs, que son componentes esenciales de rafts, altera la polarización axonal de PrP<sup>C</sup> disminuyendo su endocitosis.
5. La composición lipídica y proteica de los rafts está alterada en neuronas carentes de ASM a nivel de la MP pero no a nivel del aparato de Golgi.
6. Componentes de rafts como PrP<sup>C</sup> o GM1 no están polarizados en el axón en neuronas hipocampales carentes de ASM debido al aumento de la SM.
7. El incremento de la SM evita la polarización de PrP<sup>C</sup> en neuronas ASMko al reducir la endocitosis de esta proteína por un mecanismo que incluye una deficiente unión a membrana y actividad de la GTPasa RhoA.

## 7. ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APP</b>	<i>Amyloid precursor protein</i> (Proteína precursora del amiloide)
<b>ASM</b>	Esfingomielinidasa Acida
<b>ASMko</b>	Ratones knock out para el gen de la ASM
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina sérica bovina)
<b>CER</b>	Ceramida
<b>CHOL</b>	Colesterol
<b>CHOLE</b>	Colesteril ésteres
<b>CLAP</b>	Cocktail de inhibidores de proteasas
<b>CVs</b>	Cubreobjetos
<b>2D-PAGE</b>	Geles de poliacrilamida bidimensionales
<b>DABCO</b>	1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano
<b>DIV</b>	Días <i>in-vitro</i>
<b>DRMs</b>	<i>Detergent resistant membranes</i> (Membranas resistentes a la extracción con detergente no iónico)
<b>e.s.</b>	Error estándar
<b>DTT</b>	<i>Dithiothreitol</i>
<b>E16, E18</b>	Embriones de 16 y 18 días de gestación
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FB1</b>	<i>Fumonisin B1</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Suero Fetal Bovino)

<b>FRAP</b>	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
<b>FRET</b>	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i> (Proteína fluorescente verde)
<b>Glur1</b>	Subunidad del receptor de glutamato
<b>GM1</b>	Gangliósido GM1
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>HBSS</b>	<i>Hank's balanced salt sodium</i> (Solución tamponada de Hank)
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico
<b>L<sub>d</sub></b>	Fase líquida desordenada
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>L<sub>o</sub></b>	Fase líquida ordenada
<b>MAP2</b>	<i>Microtubule Associated Protein2</i> (Proteína asociada a microtúbulos)
<b>MBS</b>	Buffer constituido por MES y NaCl.
<b>MEM</b>	<i>Minimal essential medium</i> (Medio mínimo esencial)
<b>MEM-HS</b>	Medio mínimo esencial suplementado con 10% <i>Horse Serum</i> (Suero de caballo)
<b>MCD</b>	<i>Metil-β-cyclodextrin</i>
<b>MP</b>	Membrana plasmática
<b>NB-B27</b>	Medio Neurobasal suplementado con 2% B-27
<b>NIH</b>	<i>National Institutes of Health</i> (Institutos Nacionales de Salud)
<b>NPA</b>	Síndrome de Niemann-Pick tipo A
<b>NPB</b>	Síndrome de Niemann-Pick tipo B
<b>NPD</b>	Enfermedad de Niemann-Pick
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampón fosfato salino)
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina

<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>P1, P2, P3</b>	Pellet 1, 2 y 3
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PLL</b>	Poly-L-Lysina
<b>PrP<sup>C</sup></b>	Proteína priónica
<b>PrP<sup>Sc</sup></b>	Isoforma resistente a proteasas de la proteína priónica
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>RFP</b>	<i>Red fluorescent protein</i> (Proteína fluorescente roja)
<b>SePC</b>	Esfingosilfosforilcolina
<b>SFTM</b>	<i>Single fluorophore tracking microscopy</i>
<b>SLs</b>	Esfingolípidos
<b>SM</b>	Esfingomielina
<b>Smasa</b>	Enzima esfingomielinidasa
<b>SMPD1</b>	Gen codificante para la proteína ASM
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>SPFT</b>	<i>Single particle fluorescent tracking</i>
<b>Sph</b>	Esfingosina
<b>Sy-38</b>	Anticuerpo anti-Synaptophysin
<b>TAG</b>	Triglicéridos
<b>TLC</b>	<i>Thin layer chromatography</i> (Cromatografía en capa delgada)
<b>TGN</b>	<i>Trans Golgi Network</i> (Región trans del aparato de Golgi)
<b>TfRc</b>	Receptor de transferrina
<b>u.a.</b>	Unidades arbitrarias
<b>WB</b>	Western Blot
<b>wt</b>	ratones salvajes

## 8. REFERENCIAS

- Abad-Rodríguez J, Ledesma MD, Craessaerts K, Perga S, Medina M, Delacourte A, Dingwall C, De Strooper B, Dotti CG (2004). Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *The Journal of cell biology* 167: 953-60.
- Abe M, Makino A, Hullin-Matsuda F, Kamijo K, Ohno-Iwashita Y, Hanada K, Mizuno H, Miyawaki A, Kobayashi T (2012). A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis. *Mol Cell Biol.* 32(8): 1396-1407.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2006). *Introducción a la Biología Celular. 2da Edición. Editorial Médica Panamericana.*
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). *Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science.*
- Alpert AJ, Beaudet AL (1981). Apolipoprotein C-III-1 activates lysosomal sphingomyelinase in vitro. *L Clin Invest.* 68(6): 1592-1596.
- Arroyo AI, Camoletto PG, Morando L, Sassoe-Pognetto M, Giustetto M, Van Veldhoven PP, Schuchman EH, Ledesma MD (2014). Pharmacological reversion of sphingomyelin-induced dendritic spine anomalies in a Niemann Pick disease type A mouse model. *EMBO Mol. Med.* 6(3): 398-413.
- Atger VM, de la Llera Moya M, Stoudt GW, Rodriguez WV, Phillips MC, Rothblat GH (1997). Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *J Clin Invest.* 99: 773-780.
- Behnke O, Tranum-Jensen J, van Deurs B (1984). Filipin as a cholesterol probe. II. Filipin-cholesterol interaction in red blood cell membranes. *Eur J Cell Biol.* 35(2): 200-215.
- Bennett WF, Tieleman DP (2013). Computer simulations of lipid membrane domains. *Biochimica et biophysica acta* 1828(8): 1765-1776.

- Blanco A (2007). *Química Biológica. 8va Edición. Editorial El Ateneo.*
- Bligh EG, Dyer, WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.
- Borchelt DR, Koliatsos VE, Guarnieri M, Pardo CA, Sisodia, SS, Price D (1994). Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. *J. Biol. Chem.* 269: 14711–14714.
- Borchelt DR, Rogers M, Stahl N, Telling G, Prusiner SB (1993). Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology* 3(4): 319 – 329.
- Bork P, Schultz J, Ponting CP (1997). Cytoplasmic signalling domains: The next generation. *Trends Biochem. Sci.* 22: 296–298.
- Börnig H, Geyer G (1974). Staining of cholesterol with the fluorescent antibiotic "filipin". *Acta Histochem.* 50(1): 110–115.
- Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E (2004). CD44 interaction with Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J. Biol. Chem.* 279: 26991–27007.
- Bradke F, Dotti CG (1997). Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron* 19(6): 1175–1186.
- Brady RO, Kanfer JN, Mock MB, Fredrickson DS (1966). The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 55: 366–369.
- Brown RE (1998). Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* 111:1–9.
- Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339– 1347.



- Caceres A, Banker G, Steward O, Binder L, Payne M (1984). MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Dev. Brain. Res.* 13: 314–318.
- Calderon de Anda F, Gartner A, Tsai LH, Dotti CG (2008). Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *Journal of cell science* 121: 178-85.
- Cheng ZJ, Singh RD, Sharma DK, Holicky EL, Hanada K, Marks DL, Pagano RE. (2006). Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Mol. Biol. Cell.* 17: 3197–3210.
- Choudhury A, Sharma DK, Marks DL, Pagano RE (2004). Elevated endosomal cholesterol levels in Niemann-Pick cells inhibit rab4 and perturb membrane recycling. *Mol. Biol. Cell.* 15: 4500–4511.
- Conzelmann E, Sandhoff K (1983). Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev. Neurosci.* 6: 58–71.
- Coskun U, Simons K (2010). Membrane rafting: From apical sorting to phase phase segregation. *FEBS Lett.* 584: 1685-1693.
- Craig AM, Banker G (1994). Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 267–310.
- De Strooper B, M Simons, G Multhaup, F Van Leuven, K Beyreuther, CG Dotti (1995). Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *EMBO J.* 14:4932–4938.
- Dietschy JM, Turley SD (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* 12: 105–112.
- Dotti CG, Banker GA (1987). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature* 330 (6145): 254-256.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience* 8(4): 1454-1468.

- Dupraz S, Grassi D, Bernis ME, Sosa L, Bisbal M, Gastaldi L, Jausoro I, Cáceres A, Pfenninger KH, Quiroga S (2009). The TC10-Exo70 complex is essential for membrane expansion and axonal specification in developing neurons. *J Neurosci.* 29(42):13292-301.
- Engelman DM (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438: 578-580.
- Estus S, Tucker HM, van Rooyen C, Wright S, Brigham EF, Wogulis M, Rydel RE (1997). Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J. Neurosci.* 17: 7736-7745.
- Fath KR, Burgess DR (1993). Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein. *J. Cell Biol.* 120: 117-127.
- Fishman PH, Pacuszka T, Orlandi PA (1993). Gangliosides as receptors for bacterial enterotoxins. *Adv. Lipid Res.* 25: 165-187.
- Fowler S (1969). Lysosomal localization of sphingomyelinase in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 191: 481-484.
- Futerman AH, Hannun YA (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 8: 777-782.
- Futerman AH, van Meer G (2004). Lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 554-565.
- Futerman AH, Khanin R, Segel LA (1993). Lipid diffusion in neurons. *Nature* 362(6416): 119.
- Galvan C, Camoletto PG, Dotti CG, Aguzzi A, Ledesma MD (2005). Proper axonal distribution of PrPc depends on cholesterol-sphingomyelin- enriched membrane domains and is developmentally regulated in hippocampal neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 30: 304-315.
- Gatt S (1963). Enzymic hydrolysis and synthesis of ceramides. *J. Biol. Chem.* 238: 3131-3133.
- Goldstein GW, Betz AL (1986). The blood-brain barrier. *Sci Am.* 255(3): 74-83.

- González-Billault C, Engelke M, Jiménez-Mateos EM, Wandosell F, Cáceres A, Avila J (2002). Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J. Neurosci. Res.* 67(6): 713-719.
- Gorodinsky A, Harris DA (1995). Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J. Cell Biol.* 129: 619-627.
- Gorter E, Grendel E (1925). On biomolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* 41: 439-443.
- Goslin K, Banker G (1989). Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of cell biology* 108: 1507-1516.
- Goslin K, Banker G (1991). Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: *Culturing Nerve Cells*, Goslin, K., and Banker, G. (eds.), Cambridge, MA: Massachusetts Institute of Technology.
- Graber D, Salvayre R, Levade T (1994). Accurate differentiation of neuronopathic and nonneuronopathic forms of Niemann-Pick disease by evaluation of the effective residual lysosomal sphingomyelinase activity in intact cells. *J. Neurochem.* 63: 1060-1068.
- Grassmé H, Schwarz H, Gulbins E (2001). Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 1016-1030.
- Gulbins E (2003). Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol. Res.* 47: 393-399.
- Hancock JE (2006). Lipid rafts: Contentious only from simplistic standpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 456-462.
- Hanada K, Nishijima M, Akamatsu Y, Pagano RE (1995). Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. *J. Biol. Chem.* 270: 6254-6260.
- Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *The Journal of cell biology* 141: 929-42.

- Horinouchi K, Erlich S, Perl DP, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, Desnick RJ, Stewart CL, Schuchman EH (1995). Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat. Genet.* 10: 288–293.
- Horton AC, Ehlers MD (2003). Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40: 277-95.
- Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RGW (2007). Lipid rafts: At a crossroad between cell biology and physics. *Nat. Cell Biol.* 9: 7-14.
- James J, Ferguson Jr, Ibrahim FD, Harry R (1959). The biosynthesis of mevalonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 45(4): 499–504.
- Janes PW, Ley SC, Magee AI (1999). Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol.* 147(2): 447-461.
- Kaech S, Banker G (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc.* 1: 2406-15.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2000). Principles of Neural Science, 4th Ed. McGraw-Hill, New York, p. 1294.
- Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB (1997). COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc.Natl.Acad.Sci USA.* 94(6): 2333 – 2338.
- Keller P, Toomre D, White J, Simons K (2001). Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat. Cell. Biol.* 3: 140–149.
- Kiyokawa E, Makino A, Ishii K, Otsuka N, Yamaji-Hasegawa A, Kobayashi T (2004). Recognition of sphingomyelin by lysenin and lyseninrelated proteins. *Biochemistry* 43: 9766–9773.
- Kobayashi T., Storrie B., Simons K, Dotti CG (1992). A functional barrier to movement of lipids in polarized neurons. *Nature* 359: 647-650.
- Köhrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA (1999). Microtubule-dependent recruitment of Staufien-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell.* 10: 2945–2953.

- Kotani H, Takaishi K, Sasaki T, Takai Y (1997). Rho regulate association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells. *Oncogene* 14: 1705-1713.
- Kramer EM, Koch T, Niehaus A & Trotter J (1997). Oligodendrocytes direct glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins to the myelin sheath in glycosphingolipid-rich complexes. *J.Biol.Chem.* 272: 8937-8945.
- Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Pathol.* 122: 1-5.
- Kunda P, Paglini G, Quiroga S, Kosik K, Cáceres A (2001). Evidence for the involvement of Tiam1 in Axon Formation. *The Journal of Neuroscience* 21(7): 2361-2372.
- Leach MK, Naim YI, Feng ZQ, Gertz CC, Corey JM (2011). Stages of neuronal morphological development *in vitro*--an automated assay. *J Neurosci Methods.* 199: 192-198.
- Lebrand C, Corti M, Goodson H, Cosson P, Cavalli V, Mayran N, Faure J, Gruenberg J (2002). Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *EMBO J.* 21:1289-1300.
- Ledesma MD, Brugger B, Bunning C, Wieland FT, Dotti CG (1999). Maturation of the axonal plasma membrane requires upregulation of sphingomyelin synthesis and formation of protein-lipid complexes. *The EMBO Journal* 18(7): 1761-1771.
- Ledesma MD, Dotti CG (2003). Membrane and Cytoskeleton Dynamics During Axonal Elongation and Stabilization. *Int Rev Cytol.* 227: 183-219.
- Ledesma MD, Dotti CG (2006). Amyloid excess in Alzheimer's disease: what is cholesterol to be blamed for? *FEBS Lett.* 580: 5525-5532.
- Ledesma MD, Prinetti A, Sonnino S, Schuchman EH (2011). Brain pathology in Niemann Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice. *J. Neurochem.* 116(5): 779-788.
- Ledesma MD, Simons K, Dotti CG (1998). Neuronal Polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95: 3966-3971.

- Leenders AG, Lin L, Huang LD, Gerwin C, Lu PH, Sheng ZH (2008). The role of MAP1A light chain 2 in synaptic surface retention of Cav2.2 channels in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 28(44): 11333-11346.
- Lester RL, Dickson RC (2001). High-performance liquid chromatography analysis of molecular species of sphingolipid-related long chain bases and long chain base phosphates in *Saccharomyces cerevisiae* after derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Anal. Biochem.* 298: 283–292.
- Leventhal AR, Chen W, Tall AR, Tabas I (2001). Acid sphingomyelinase- deficient macrophages have defective cholesterol trafficking and efflux. *J. Biol. Chem.* 276: 44976–44983.
- Lingwood D & Simons K (2010). Lipid rafts as a membraneorganizing principle. *Science* 327: 46–50.
- London E, Brown DA (2000). Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta.* 1508(1-2): 182-195.
- Lucero HA, Robbins PW (2004). Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 426: 208-24.
- Marella M, Lehmann S, Grassi J, Chabry J (2002). Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J. Biol. Chem.* 277: 25457– 25464.
- Marks DL, Pagano RE (2002). Endocytosis and sorting of glycosphingolipids in sphingolipids storage disease. *Trends. Cell Biol.* 12: 605–613.
- Mouritsen OG, Zuckermann MJ (2004). What's so special about cholesterol? *Lipids* 39(11):1101-1113.
- Munro S (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115: 377-88.
- Nakai Y, Sakurai Y, Yamaji A, Asou H, Umeda M, Uyemura K, Itoh K (2000). Lysenin-sphingomyelin binding at the surface of oligodendrocyte lineage cells increases during differentiation in vitro. *J. Neurosci. Res.* 62(4): 521-529.

- Naslavsky N, Shmeeda H, Friedlander G, Yanai A, Futerman AH, Barenholz Y, Taraboulos A (1999). Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. *J. Biol. Chem.* 274: 20763–20771.
- Nichols BJ (2003). GM1-containing lipid rafts are depleted within clathrin coated pits. *Curr. Biol.* 13: 686–690.
- Ohvo H, Slotte JP (1996). Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. *Biochemistry* 35: 8018–8024.
- Ohvo-Rekilä H, Akerlund B, Slotte JP (2000). Cyclodextrin-catalyzed extraction of unresistant sterols from monolayer membranes and small unilamellar vesicles. *Chem. Phys. Lipids.* 105: 167–178.
- Orlandi PA, Curran PK, Fishman PH (1993). Brefeldin A blocks the response of cultured cells to cholera toxin. Implications for intracellular trafficking in toxin action. *J. Biol. Chem.* 268(16): 12010–12016.
- Orlandi PA, Fishman PH (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell. Biol.* 141: 905–915.
- Ostermeyer AG, Beckrich BT, Ivanson KA, Grove KE, Brown DA (1999). Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 1999: 34459–34466.
- Pagano RE, Puri V, Dominguez M, & Marks DL (2000). Membrane traffic in sphingolipid storage diseases. *Traffic* 1: 807–815.
- Paladino S, Pocard T, Catino MA, Zurzolo C (2006). GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 172: 1023–1034.
- Pardridge WM (2002). Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Nature* 36(4): 555–558.
- Parton RG, Hancock JF (2004). Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell. Biol.* 14: 141–147.

- Parton RG, Richards AA (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4: 724-738.
- Peters PJ, Mironov A Jr, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003). Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J. Cell Biol.* 162: 703 – 717.
- Polishchuk R, Di Pentima A, Lippincott-Schwartz J (2004). Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat. Cell Biol.* 6: 297–307.
- Priola SA, Chesebro B (1998). Abnormal properties of prion protein with insertional mutations in different cell types. *J. Biol. Chem.* 273(19): 11980 – 11985.
- Prusiner SB (1998). *Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13363 –13383.
- Puri V, Jefferson JR, Singh RD, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE (2003). Sphingolipid storage induces accumulation of intracellular cholesterol by stimulating SREBP-1 cleavage. *J. Biol. Chem.* 278: 20961–20970.
- Puri V, Watanabe R, Dominguez M, Sun X, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE (1999). Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat. Cell Biol.* 1: 386–388.
- Ramasamy S, Wang E, Henning B, Merrill AH Jr (1995). Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133(2): 343-348.
- Rao A, Kim EK, Sheng M, Craig AM (1998). Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 18: 1217–1229.
- Reismann P, Tulassay Z (2008). Treatment prospects of lysosomal storage disorders. *Orv. Hetil.* 149(25): 1171-1179.
- Saarma M (2000). GDNF—a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur. J. Biochem.* 267: 6968–6971.



- Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S (2002). GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev. Cell.* 2: 411–423.
- Sachdev P, Menon S, Kastner DB, Chuang JZ, Yeh TY, Conde C, Caceres A, Sung CH, Sakmar TP (2007). G protein beta gamma subunit interaction with the dynein light-chain component Tctex-1 regulates neurite outgrowth. *EMBO J.* 26(11):2621-32.
- Sakuragawa N (1995). Medicinal therapy for lysosomal storage diseases. *Hihon. Rinsho.* 53(12): 3072-3076.
- Sales N, Hassig R, Rodolfo K, Di Giamberardino L, Traiffort E, Ruat M, Fretier P, Moya, KL (2002). Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur. J. Neurosci.* 15: 1163–1177.
- Sampo B, Kaech S, Kunz S, Banker G (2003). Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 37: 611–624.
- Sarnataro D, Campana V, Paladino S, Stornaiuolo M, Nitsch L, Zurzolo C (2004). PrP<sup>C</sup> association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. *Mol. Biol. Cell.* 15: 4031– 4042.
- Sarnataro D, Paladino S, Campana V, Grassi J, Nitsch L, Zurzolo C (2002). PrP<sup>C</sup> is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. *Traffic* 3: 810–821.
- Sassoe-Pognetto M, Ottersen OP (2000). Organization of ionotropic glutamate receptors at dendrodendritic synapses in the rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* 20: 2192– 2201.
- Scheiffele P, Roth GR, Simons K (1997). Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* 16: 5501–5508.
- Schissel SL, Jiang X, Tweedie-Hardman J, Jeong T, Camejo EH, Najib J, Rapp JH, Williams KJ, Tabas I (1998). Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J. Biol. Chem.* 273: 2738–2746.

- Schroeder RE, London E, Brown D (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12130–12134.
- Schuchman EH, Desnick RJ (2001). Niemann Pick disease types A and B: acid sphingomyelinase deficiencies, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th edn* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D., eds), pp. 3589. McGraw-Hill, New York.
- Shakor AB, Czurylo EA, Sobota A (2003). Lysenin, a unique sphingomyelin-binding protein. *FEBS Lett.* 542(1-3): 1-6.
- Sharma DK, Brown JC, Choudhury A, Peterson TE, Holicky E, Marks DL, Simari R, Parton, RG, Pagano RE (2004). Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol. Biol. Cell.* 15:3114–3122.
- Simons K, Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
- Simons K, Sampaio JL (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3(10):a004697.
- Simons K, Toomre D (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 31–39.
- Simons K, Van Meer G (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27: 6197-6202.
- Singer SJ, Nicholson GL (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175(4023): 720-731.
- Smart EJ, Ying YS, Mineo C, Anderson RG (1995). A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(22): 10104-10108.
- Soma MR, Corsini A, Paoletti R (1992). Cholesterol and mevalonic acid modulation in cell metabolism and multiplication. *Toxicol. Lett.* 64 -65 Spec N°: 1-15.
- Sonnino S, Prinetti A (2013). Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Current medicinal chemistry* 20: 4-21.

- Steinert S, Lee E, Tresset G, Zhang D, Hortsch R, Wetzel R, Hebbar S, Sundram JR, Kesavapany S, Boschke E, Kraut R (2008). A fluorescent glycolipid-binding peptide probe traces cholesterol dependent microdomain-derived trafficking pathways. *PLoS ONE* 3(8): e2933.
- Stevenson BR, Keon BH (1998). The tight junction: Morphology to molecules. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14: 89-109.
- Stoffel W (1999). Functional analysis of acid and neutral sphingomyelinases in vitro and in vivo. *Chem. Phys. Lipids.* 102: 107-121.
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003). The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* 22: 3591-3601.
- Takaishi K, Sasaki T, Kameyama T, Sa, Tsukita, Sh, Tsukita, Takai Y (1995). Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. *Oncogene* 11: 39-48.
- Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* 129(1): 121-132.
- Testai FD, Landek MA, Goswami R, Ahmed M, Dawson G (2004). Acid sphingomyelinase and inhibition by phosphate ion: role of inhibition by phosphatidyl-myo-inositol 3,4,5-triphosphate in oligodendrocyte cell signaling. *J. Neurochem.* 89: 636-644.
- Toulmay A, Prinz WA (2013). Direct imaging reveals stable, micrometer-scale lipid domains that segregate proteins in live cells. *J. Cell Biol.* 202(1): 35-44.
- Van Overloop H, Gijsbers S, Van Veldhoven PP (2006). Further characterization of mammalian ceramide kinase: Substrate delivery and (stereo) specificity, tissue distribution and subcellular localization studies. *J. Lipid. Res.* 47: 268-283.
- Van Veldhoven P, Bell RM (1988). Effect of harvesting methods, growth conditions and growth phase on diacylglycerol levels in cultured human adherent cells. *Biochim. Biophys. Acta* 959: 185-196.
- Van Veldhoven PP, Meyhi E, Mannaerts GP (1998). Enzymatic quantitation of cholesterol esters in lipid extracts. *Anal. Biochem.* 258: 152-155.

- Van Veldhoven PP, Swinnen JV, Esquenet M, Verhoeven G (1997). Lipase-based quantitation of triacylglycerols in cellular lipid extracts: requirement for presence of detergent and prior separation by thin-layer chromatography. *Lipids* 32: 1297–1300.
- Vidalain PO, Azocar O, Servet-Delprat C, Rabourdin-Combe C, Gerlier D, Manié S (2000). CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *EMBO J.* 19(13): 3304-3313.
- West AE, Neve RL, Buckley KM (1997). Identification of a somatodendritic targeting signal in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor. *J. Neurosci.* 17: 6038–6047.
- Winckler B, Forscher P, Mellman I (1999). A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* 379: 698-701.
- Wolburg H, Risau W (1995). Formation of the blood-brain barrier. In *Neuroglia*. Kettenmann H, and Ransom B., eds Oxford University Press, pp. 763-776.
- Yamazaki T, Selkoe DJ, Koo EH (1995). Trafficking of cell surface beta-amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J. Cell Biol.* 129: 431–442.
- Yancey PG, Rodriguez WV, Kilsdonk EP, Stoudt GW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH (1996). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* 271: 16026–16034.

## 9. PUBLICACIONES

### I. PUBLICACIONES QUE SURGIERON COMO RESULTADO DE ESTE TRABAJO DE TESIS

**Proper axonal distribution of PrP<sup>C</sup> depends on cholesterol-sphingomyelin-enriched membrane domains and is developmentally regulated in hippocampal neurons.** Galván C, Camoletto PG, Dotti CG, Aguzzi A, Ledesma MD. *Mol Cell Neurosci*. 2005 Nov; 30(3): 304-315.

**Anomalous surface distribution of glycosyl phosphatidyl inositol-anchored proteins in neurons lacking acid sphingomyelinase.** Galván C, Camoletto PG, Cristofani F, Van Veldhoven PP, Ledesma MD. *Mol Biol Cell*. 2008 Feb; 19(2): 509-522.

### II. PUBLICACIONES EN LAS CUALES PARTICIPÉ COMO CO-AUTOR DURANTE EL TRANCURSO DE ESTA TESIS

**Astrocytic but not neuronal increased expression and redistribution of parkin during unfolded protein.** Ledesma MD, Galván C, Hellias B, Dotti C, Jensen PH. *J Neurochem*. 2002, Dec; 83(6): 1431-1440.

**Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer's disease brains.** Ledesma MD, Abad-Rodriguez J, Galván C, Biondi E, Navarro P, Delacourt A, Dingwall C, Dotti CG. *EMBO Rep*. 2003 Dec; 4(12): 1190-1196.

### III. REVISIONES EN LAS CUALES PARTICIPÉ DURANTE EL TRANCURSO DE ESTA TESIS

**Plasmin deficiency in Alzheimer's disease brains: causal or casual?** Dotti CG, Galván C, Ledesma MD. *Neurodegener Dis*. 2004; 1(4-5): 205-212.

# Proper axonal distribution of PrP<sup>C</sup> depends on cholesterol–sphingomyelin-enriched membrane domains and is developmentally regulated in hippocampal neurons

Cristian Galvan,<sup>a</sup> Paola G. Camoletto,<sup>a</sup> Carlos G. Dotti,<sup>a</sup>  
Adriano Aguzzi,<sup>b</sup> and Maria Dolores Ledesma<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Fondazione Cavalieri Ottolenghi Scientific Institute, Università degli Studi di Torino, A.O. San Luigi Gonzaga, Regione Gonzole 10, 10043 Orbassano (Turin), Italy

<sup>b</sup>Institute of Neuropathology, University Hospital Zurich, Schmelzbergstrasse 12, CH-8091 Zurich, Switzerland

Received 31 March 2005; revised 13 June 2005; accepted 7 July 2005

Available online 1 September 2005

**Defects in cellular localization and trafficking seem to facilitate the conversion of PrP<sup>C</sup> into the disease-associated form, PrP<sup>Sc</sup>. Still, it is not clear to which membrane compartments PrP<sup>C</sup> localizes in hippocampal neurons a population most affected in the prion disease. We here show that in developing hippocampal neurons in culture PrP<sup>C</sup> is equally distributed to all neurites yet enriched in growth cones. By contrast, in fully mature neurons PrP<sup>C</sup> is restricted to axons. The axonal distribution in mature stages is paralleled by the increased partitioning of PrP<sup>C</sup> into detergent-resistant cholesterol–sphingolipid-rich domains (DRMs). Consistent with a cause–effect mechanism, disruption of DRMs by sphingolipid or cholesterol depletion leads to the non-polarized distribution and impaired endocytosis of PrP<sup>C</sup>. These results indicate that DRMs are essential for proper trafficking and distribution of PrP<sup>C</sup> at late stages of neuronal differentiation and that its function, at least in hippocampus, is restricted to the axonal domain.**  
© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane protein that plays a pivotal role in prion diseases, a group of fatal neurodegenerative disorders (Bueler et al., 1993). The conformational change of PrP<sup>C</sup> into an altered protease-resistant isoform (PrP<sup>Sc</sup>) appears to be essential for the propagation of these diseases (Prusiner, 1998). Much effort has been

focused in understanding the pathological implications of the protein, yet its physiological function is unknown. In this regard, basic aspects of the PrP<sup>C</sup> biology such as its cellular localization are not completely established especially in neurons where the protein is expressed at the highest levels (Kretzschmar et al., 1986). Thus, while a strong axonal PrP<sup>C</sup> staining was found on the surface of retinal axons in living explants (Sales et al., 2002), in cultured dorsal root ganglia neurons PrP<sup>C</sup> was seen restricted to the cell body (Madore et al., 1999). In addition, analysis of different brain areas revealed axonal and dendritic staining for PrP<sup>C</sup> (Mironov et al., 2003).

Another essential issue that is not yet clear for PrP<sup>C</sup> is its intracellular trafficking. PrP<sup>C</sup> undergoes rapid axonal anterograde transport in peripheral and central nervous system nerves (Borchelt et al., 1994) but the mechanism for this transport is unknown. The GPI-anchor and its N-terminal region target PrP<sup>C</sup> into detergent-resistant membrane domains (DRMs) (Taraboulos et al., 1995; Walmsley et al., 2003). Although these complexes have been involved in the polarized exocytosis of other GPI-anchored protein to the axonal membrane in neurons (Ledesma et al., 1998), this does not seem to be the case for the basolateral sorting of PrP<sup>C</sup> in epithelial cells, which occurs independently of DRMs (Sarnataro et al., 2002). This highlights the importance of studying the involvement of DRMs for the proper distribution of PrP<sup>C</sup> in neurons. This is further justified by the fact that trafficking of GPI-anchored proteins varies depending on the cell type (Fivaz et al., 2002). In addition, it has recently been demonstrated that polarized distribution of GPI-anchored proteins in epithelial cells depends on endocytosis at the plasma membrane and subsequent transcytosis rather than on direct trafficking from the *trans*-Golgi network (Polishchuk et al., 2004). In this regard, while caveolin-related endocytosis has been described for PrP<sup>C</sup> in fibroblast-like, glial and neuroblastoma cells (Peters et al., 2003; Marella et al., 2002; Kaneko et al., 1997), other studies propose that internal-

*Abbreviations:* PrP<sup>C</sup>, cellular prion protein; DRMs, detergent-resistant cholesterol-sphingolipid rich domains; SM, sphingomyelin; SLs, sphingolipids; GPI, glycosylphosphatidylinositol; FB1, Fumonisin B1; MCD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin.

\* Corresponding author. Fax: +39 011 670 54 49.

*E-mail address:* lola.ledesma@unito.it (M. Dolores Ledesma).

Available online on ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).

ization of PrP<sup>C</sup> in neuroblastoma cells and sensory neurons occurs via clathrin-coated pits (Sunyach et al., 2003).

Given the above fragmented and at times contradictory data on the intracellular trafficking and polarized localization of PrP<sup>C</sup> and on the possible involvement of DRMs in such processes, we have analyzed these features in primary neurons from rat hippocampus. This is particularly relevant since these cells acquire full polarization in vitro similar to their counterparts in situ (Dotti et al., 1988) and because the hippocampus is the brain area with highest levels of PrP<sup>C</sup> expression (Taraboulos et al., 1992), with a potentially important role in the pathogenesis of prion diseases (DeArmond et al., 1998; Taraboulos et al., 1992).

## Results

### *Polarization of PrP<sup>C</sup> to the axons of hippocampal neurons is developmentally regulated*

To address the question of whether PrP<sup>C</sup> is polarized in hippocampal neurons or not, we performed immunofluorescence analysis using a specific antibody against PrP<sup>C</sup> (see Experimental methods) at different stages of differentiation. All stage 3 neurons, which are morphologically but not molecularly polarized (Ledesma and Dotti, 2003), expressed PrP<sup>C</sup> that was equally abundant in all neurites (ratio longest neurite/short neurites = 0.94, see Experimental methods) with a relative enrichment (3-fold) in the growth cones versus the neuritic shafts (Fig. 1Aa). It is important to note that no significant difference in the amount of PrP<sup>C</sup> was observed between the growth cone corresponding to the longest neurite, which will become the axon (Dotti et al., 1988), and the others (ratio growth cone longest neurite/other neurites = 0.99) (Fig. 1Aa, insets). To establish whether the signal observed for PrP<sup>C</sup> corresponds to its intracellular or surface localization, living cells were incubated with anti-PrP<sup>C</sup> antibody, fixed and processed for immunofluorescence analysis. This revealed very little amount of PrP<sup>C</sup> at the cell surface of immature stage 3 neurons (Fig. 1Ab), indicative that most of the protein is intracellular.

PrP<sup>C</sup> distribution was then analyzed in neurons kept in culture for more than 1 week, when axonal and dendritic plasma membranes are molecularly and functionally distinct (stage 5 of differentiation) (Ledesma and Dotti, 2003). Neurons were plated at low density to avoid the formation of a too complex net of axons and dendrites that would make more difficult the identification of single processes at this stage. In these cells PrP<sup>C</sup> labeling appeared restricted to a subpopulation of neurites (Fig. 1B). Double staining with antibodies against PrP<sup>C</sup> and the dendritic cytoskeletal protein MAP2 revealed no co-localization with MAP2 (Fig. 1Ba) indicative that PrP<sup>C</sup> is enriched in axons (see also Supplementary Figure A for more examples and triple labeling staining of PrP<sup>C</sup>, MAP2 and the cytoskeletal axonal protein Tau). This was confirmed by the presence of PrP<sup>C</sup> in the same processes as the axonal membrane protein Thy-1 (Dotti et al., 1991) (Fig. 1Bb) but not the dendritic membrane protein glutamate receptor (Fig. 1Bc). Quantitative analysis revealed that 89 ± 6% of PrP<sup>C</sup> is in axons (ratio axons/dendrites = 8.2,  $P < 0.0001$ ). When live cell surface PrP<sup>C</sup> staining was performed in mature neurons intense labeling along the entire axons was found

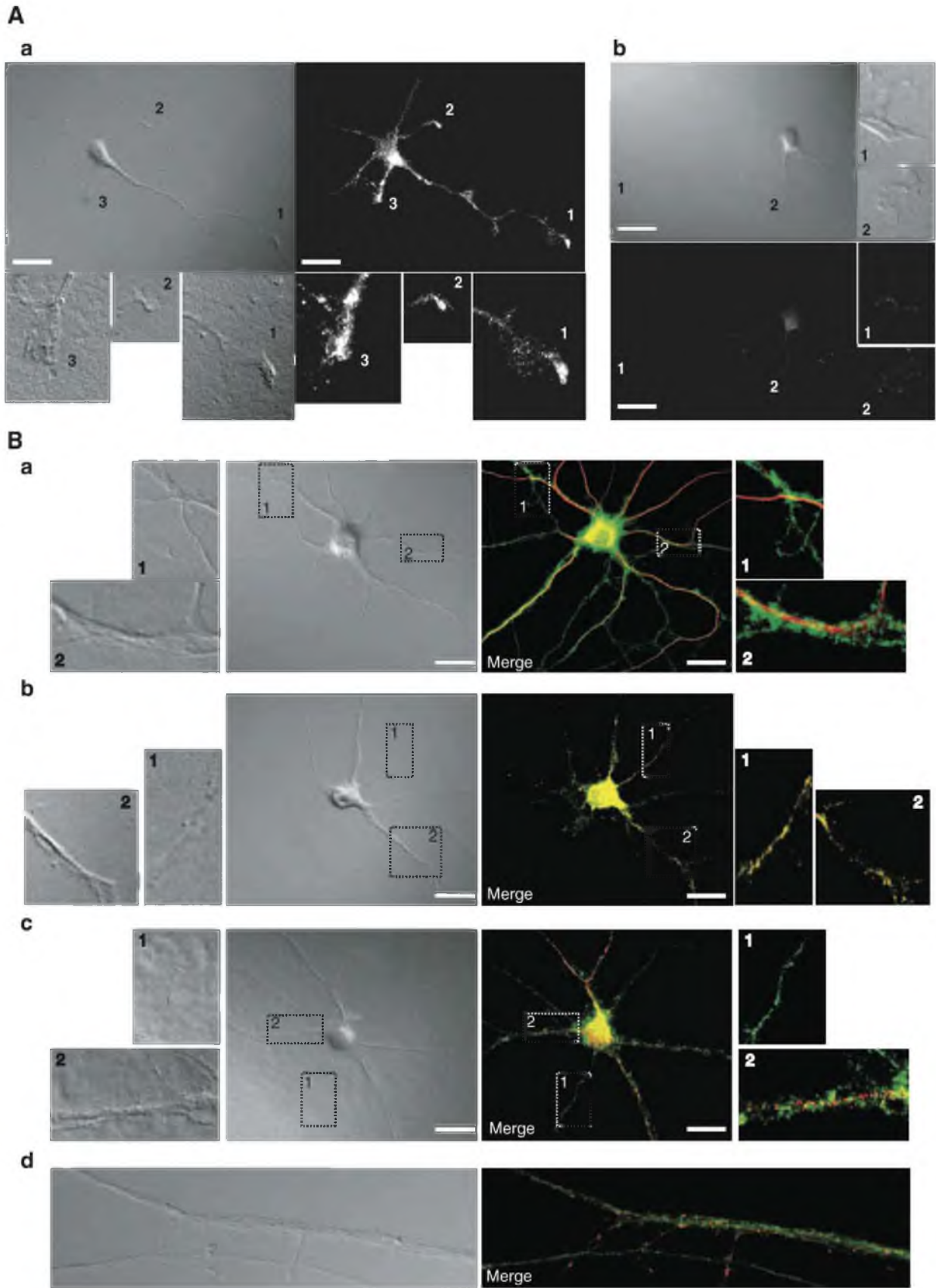
(Figure Ba). Together with the fact that PrP<sup>C</sup> undergoes a significant increase in PrP<sup>C</sup> levels of expression in stage 5 neurons (3-fold) compared with stage 3 (Figure Bb), this first series of results suggest that PrP<sup>C</sup> is mainly playing an axonal membrane-dependent role in hippocampal neurons. Interestingly, the PrP<sup>C</sup>-positive spots along the axons of mature hippocampal neurons did not co-localize with the axonal synaptic marker synaptophysin (Fig. 1Bd), indicating that PrP<sup>C</sup> is not directly involved in the synaptic machinery in these cells. Moreover, it is remarkable that the levels of expression of the protein were much higher (5-fold) in the neurons compared to astrocytes, which in low numbers (less than 5%) are present in our culture system (data not shown).

### *The association of PrP<sup>C</sup> with DRMs parallels the acquisition of polarized distribution*

Since PrP<sup>C</sup> is present in DRMs of neuroblastoma cell lines (Taraboulos et al., 1995; Gorodinsky and Harris, 1995; Naslavsky et al., 1999) and these membrane domains are involved in the polarized distribution of proteins (Parton and Hancock, 2004), we asked whether PrP<sup>C</sup> axonal enrichment in primary hippocampal neurons also requires DRMs. Biochemical analysis of stage 3 neurons revealed that only a minor pool of total PrP<sup>C</sup> ( $3.4 \pm 1\%$ ,  $P < 0.0001$ ) is associated with detergent-insoluble fractions corresponding to DRMs (Fig. 2A). Contrarily, a significant proportion ( $32 \pm 1.7\%$ ,  $P < 0.0001$ ) gets incorporated into DRMs in stage 5 neurons (Fig. 2A).

To assess to which extent DRM partitioning of total PrP<sup>C</sup> corresponds to the presence of the protein in such domains in intracellular compartments or at the plasma membrane, detergent insolubility was analyzed by immunofluorescence microscopy in living neurons. No PrP<sup>C</sup> signal was detected on the surface of stage 3 neurons in which antibody incubation was followed by exposure to cold detergent before fixation, a method that enables to assess cell surface DRMs in situ (Ledesma et al., 1998) (Fig. 2Ba). Weak staining could be observed when cold detergent extraction was performed prior to antibody incubation in order to detect intracellular DRMs (Fig. 2Bb). Quantitative comparison of this staining with that of non-extracted permeabilized cells (Fig. 2Bc) revealed that only  $3.5 \pm 0.7\%$  ( $P < 0.0001$ ) of intracellular PrP<sup>C</sup> is cold detergent resistant. These results are in agreement with the biochemical data and illustrate that the low amount of PrP<sup>C</sup> in DRMs corresponds to intracellular but not cell surface lipid domains in stage 3 neurons. In contrast, most of PrP<sup>C</sup> clusters remain on the surface of the axons in cold-detergent-extracted stage 5 neurons ( $89 \pm 7\%$  of those observed in non-detergent-extracted cells,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 2C). This indicates that a large pool of PrP<sup>C</sup> is in DRMs on the axonal plasma membrane of mature, but not immature, neurons.

The almost complete absence of PrP<sup>C</sup> in DRMs of stage 3 neurons raised the question of whether this is due to paucity of these lipid domains or because the protein is unable to get incorporated into them. Supporting the former are the low levels of SM detected by mass spectrometry in total extracts of stage 3 neurons compared to stage 5 neurons (Ledesma et al., 1999, see also Fig. 3Aa). To further analyze this point we compared by TLC and slot-blot the amounts of DRM-enriched lipids (i.e., cholesterol, ceramide, SM and GM1) in total extracts and DRMs at the two developmental stages. Lipid analysis of the total extracts contain-





ing the same amount of protein revealed diminished levels of GM1 (1.7-fold) and SM (2.3-fold) in the immature neurons compared to the mature ones (Fig. 3Aa) while levels of cholesterol and ceramide did not show significant differences. The levels of phospholipids (phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphoinositol (PI)) did not show significant changes either between stage 3 and stage 5 neurons (Fig. 3Aa). The levels of GM1 and SM were 1.9- and 2-fold lower, respectively, at the early developmental stage after normalization to the average amount of phospholipids. When the sucrose gradients of cold detergent extracts were examined very low amounts of cholesterol and SM were detected in the light density fractions corresponding to DRMs (4–5) in stage 3 neurons compared to stage 5 neurons (Fig. 3Ab). To further investigate whether the scarcity of PrP<sup>C</sup> in stage 3 DRMs could be due to paucity of these domains or to the particular inability of this protein to get targeted into them we analyzed its membrane partitioning. A significant proportion of total PrP<sup>C</sup> (46.5%) appears linked to membranes indicating that the GPI anchor, a DRM-targeting signal, is already acquired in the immature neurons (Fig. 3B). Moreover, immunofluorescence of permeabilized non-treated (Fig. 3Cb) and cold-detergent-extracted (Fig. 3Ca) stage 3 neurons using antibodies against two other DRM-enriched proteins, Thy-1 and Flotillin1, indicated that the presence of these proteins in DRMs is also very low. Altogether, these data argue in favor of the poor ability to make DRMs and not of a deficiency in the PrP<sup>C</sup> itself as the cause for the lack of incorporation of the protein into these microdomains in stage 3 neurons.

#### *PrP<sup>C</sup> axonal distribution and detergent insolubility depends on cholesterol levels*

To investigate the involvement of DRMs in the polarized distribution of PrP<sup>C</sup> in stage 5 neurons we analyzed, both biochemically and by microscopy, the effect of reducing membrane cholesterol, an essential component of DRMs. Hippocampal neurons were treated for several days with low doses of the cholesterol synthesis inhibitor, mevilonin, and the membrane cholesterol-extracting drug, methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD). This treatment induces a moderate reduction of membrane cholesterol (28  $\pm$  4%), which does not interfere with cell survival or with the amount of total protein in the membrane and does not affect the proper distribution of cytoskeletal and synaptic proteins (see Experimental methods and Ledesma et al., 2003). Moreover, the treatment does not alter the total levels of SM or GM1 (Fig. 4Aa). However, this experimental approach leads to DRM disruption. Thus, only 11  $\pm$  2% and 46  $\pm$  5% of the total cholesterol and GM1 remained in DRMs while SM was not detectable. In non-treated neurons these percentages were 30  $\pm$  3, 99%  $\pm$  1 and 99%  $\pm$  4, respectively. These differences were statistically significant,  $P < 0.0001$  (Fig. 4Ab). DRM disorganization was further indicated by the shift of the canonical DRM marker flotillin1 towards heavy fractions of the gradients (Figs. 4Ba and b). PrP<sup>C</sup> shows a similar

alteration in its membrane density profile (Figs. 4Ba and b). The displacement of the protein from DRM domains was confirmed by the lack of PrP<sup>C</sup> staining on the membrane of neurons with reduced membrane cholesterol exposed to cold Triton X-100 (Figure Ca). Remarkably, reduction of neuronal membrane cholesterol results in the appearance of PrP<sup>C</sup> in both axons and dendrites (ratio axons/dendrites = 1.03). The difference with respect to the control cells was statistically significant,  $P = 0.007$  (Fig. 4C).

#### *PrP<sup>C</sup> axonal distribution but not its insolubility depends on SL levels*

DRMs are not only enriched in cholesterol but also in SLs. While studies in neuroblastoma cells revealed that the DRM partitioning capability of PrP<sup>C</sup> depends on cholesterol but not on SLs (Taraboulos et al., 1995; Naslavsky et al., 1999), a recent analysis in epithelial cells has shown that PrP<sup>C</sup> insolubility is affected by SL depletion (Samataro et al., 2004). Thus, it was important to address this issue in true central nervous system differentiated neurons and also to know if these DRM lipids could affect the polarized distribution of the protein in these cells. Long-term treatment with the SL synthesis inhibitor, Fumonisin B1 (FB1), did not affect cell viability (see Experimental methods) but reduced the levels of SLs (SM and GM1) in total neuronal extracts without significantly changing the levels of total cholesterol (Fig. 4Aa). This experimental approach altered DRM lipid composition (Fig. 4Ab). Hence, 22  $\pm$  2%, 0% and 79  $\pm$  7% of the total cholesterol, SM and GM1, respectively, were present in DRMs of FB1-treated neurons while these percentages increased to 30  $\pm$  3, 99.5  $\pm$  1 and 99  $\pm$  1 in the non-treated neurons ( $P < 0.0001$ ). Despite these changes in lipid composition, incubation with FB1 did not significantly alter the insolubility of PrP<sup>C</sup> after Triton X-100 extraction of mature hippocampal neurons. In these cells, while only 1.8  $\pm$  0.5% of Flotillin1 remains in DRMs, indicative of the alteration in DRM protein composition after the treatment, 30.5  $\pm$  1.5% of PrP<sup>C</sup> is in these membrane domains, similar to non-treated cells (Figs. 4Ba and c). Accordingly, immunofluorescence analysis of Triton X-100-extracted neurons that had been treated with FB1 reveals numerous clusters of PrP<sup>C</sup> on the axonal surface (Figure Cb).

The above results indicated that although SLs do not seem to be essential for the insolubility of PrP<sup>C</sup> in hippocampal neurons, they are required for proper DRM organization and composition. This was further confirmed by isolation of DRMs using a detergent-independent method based in sonication (Smart et al., 1995) (Figure D). This approach revealed the displacement of both Flotillin1 and PrP<sup>C</sup> from light density fractions of the gradients upon SL depletion. We asked therefore whether the accurate balance in the amount of DRM lipids is important for the functionality of these domains and thus for the axonal enrichment of PrP<sup>C</sup>. Indeed, immunofluorescence analysis of FB1-treated neurons revealed the presence of PrP<sup>C</sup> in the entire neuronal arbor, axons and dendrites (ratio axons/dendrites = 1.04,  $P = 0.002$ ), different from the axonal enrichment of control neurons (Fig. 4D).

Fig. 1. PrP<sup>C</sup> becomes polarized to the axon during differentiation of hippocampal neurons. (Aa) Phase contrast and immunostaining with the anti-PrP<sup>C</sup> antibody of a permeabilized stage 3 neuron. The protein is present in all neurites with a relative enrichment in the growth cones (shown in insets 1, 2 and 3). (Ab) Phase contrast and surface PrP<sup>C</sup> labeling of a stage 3 neuron. (B) Phase contrasts and merge images of double staining of permeabilized mature neurons using antibodies against (Ba) PrP<sup>C</sup> (green) and MAP2 (red); (Bb) PrP<sup>C</sup> (green) and Thy-1 (red); (Bc) PrP<sup>C</sup> (green) and glutamate receptor (red); (Bd) PrP<sup>C</sup> (green) and synaptophysin (red). Insets of the numbered areas in panels Ba, b and c show in detail the presence of PrP<sup>C</sup> exclusively in the axons (also labeled with anti-Thy-1) that often wrap up the dendrites (stained with MAP2 and glutamate receptor). Image in panel Bd shows the segregation of PrP<sup>C</sup> and the axonal synaptic marker synaptophysin. White bars indicate 10  $\mu$ m.

### PrP<sup>C</sup> endocytosis requires DRMs in mature hippocampal neurons

It has been recently reported that the polarized distribution of GPI-anchored proteins depends on endocytic and transcytotic events rather than on exocytic trafficking (Polishchuk et al., 2004). We therefore tested whether DRMs and their main lipid components, cholesterol and SLs, participate in PrP<sup>C</sup> endocytosis in hippocampal neurons. Mature living neurons were thus incubated with fluorescein-linked cholera toxin subunit B, which binds with high affinity to the DRM lipid GM1 (Fishman et al., 1993). This toxin subunit has been used to distinguish DRM endocytosis from clathrin-coated pit-mediated endocytosis, as a major pool of it is efficiently excluded from clathrin-coated pits (Orlandi and Fishman, 1998; Nichols, 2003). This was confirmed in the hippocampal neurons by the almost complete lack of co-localization between cholera toxin subunit B and the canonical marker for clathrin-coated pit endocytosis transferrin receptor (TfRc) (0% total co-localization, 1.4% partial co-localization, see Experimental methods) (Fig. 5Aa). The simultaneous incubation of living neurons with PrP<sup>C</sup> antibody and labeled cholera toxin B revealed that 82% and 8.8% ( $P < 0.0001$ ) of PrP<sup>C</sup> endocytic structures completely or partially co-localized, respectively, with those GM1 positive as seen in confocal slices (Fig. 5Ab). Similar results were obtained when internalization was allowed for 2, 6 and 10 min. The non-clathrin-dependent endocytosis of PrP<sup>C</sup> was also supported by immunoelectron microscopy analysis of hippocampal slices showing the absence of the protein in clathrin-coated pits and its presence in non-coated membrane invaginations (Supplementary Figure E). To test the functional relevance of DRMs in PrP<sup>C</sup> endocytosis, this event was analyzed in conditions of cholesterol reduction. This approach diminished the co-localization of GM1 and PrP<sup>C</sup> at the plasma membrane and drastically reduced the number of endocytic structures positive for GM1 or PrP<sup>C</sup> (78% and 85% reduction, respectively,  $P < 0.0001$ ) (see Experimental methods) (Fig. 4Bb). This, together with the biochemical analysis of PrP<sup>C</sup> and GM1 flotation showing the displacement of these molecules from DRM domains after cholesterol depletion (Fig. 4Ab and Ba, b), supports the contribution of these microdomains to PrP<sup>C</sup> endocytosis. Concurrently, inhibition of SL synthesis was reflected in low GM1 production and its displacement from DRMs (Figs. 4B and 5Cb) and in reduced PrP<sup>C</sup> endocytosis (82% reduction of PrP<sup>C</sup> endocytic structures,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 5Cb). By contrast, cholesterol and SL depletion did not affect the number of TfRc endocytic structures (Figs. 5Ba and Ca).

### Discussion

A first conclusion that arises from our work is that PrP<sup>C</sup> does not play an essential role in axonal specification and/or axonal growth. This derives from the observations that (i) PrP<sup>C</sup> is ubiquitously distributed during the phase of axonal elongation, in the growth

cone of the actively growing axon but also in those of dendrites that grow very little at this stage, with minute amounts of PrP<sup>C</sup> present at the growth cone surface; (ii) the levels of expression of PrP<sup>C</sup> at this early stage of development are very low compared with later stages when neurite growth has stopped. This conclusion is in contrast to that derived from the finding of PrP<sup>C</sup> enrichment in elongating axons of embryonic retinal explants that led to propose a role for the protein in axonal growth (Sales et al., 2002). PrP<sup>C</sup> enrichment in axons may reflect the non-specific overall protein trafficking that occurs in the direction of highest growth (see Ledesma and Dotti, 2003). This is likely since we observed that PrP<sup>C</sup> is not incorporated in DRMs at this developmental stage.

A second conclusion is that PrP<sup>C</sup> probably plays a role related with axonal-specific events in mature hippocampal neurons. This derives from the fact that PrP<sup>C</sup> is restricted to the axonal surface in these cells. However, the lack of co-localization with the synaptic marker synaptophysin argues against PrP<sup>C</sup> being a component of the synaptic machinery. Further work will determine which functions PrP<sup>C</sup> play. Our observation that the protein is enriched in DRMs at the axonal surface opens the perspective that the protein is involved in DRM-mediated roles such as signaling (Simons and Toomre, 2000).

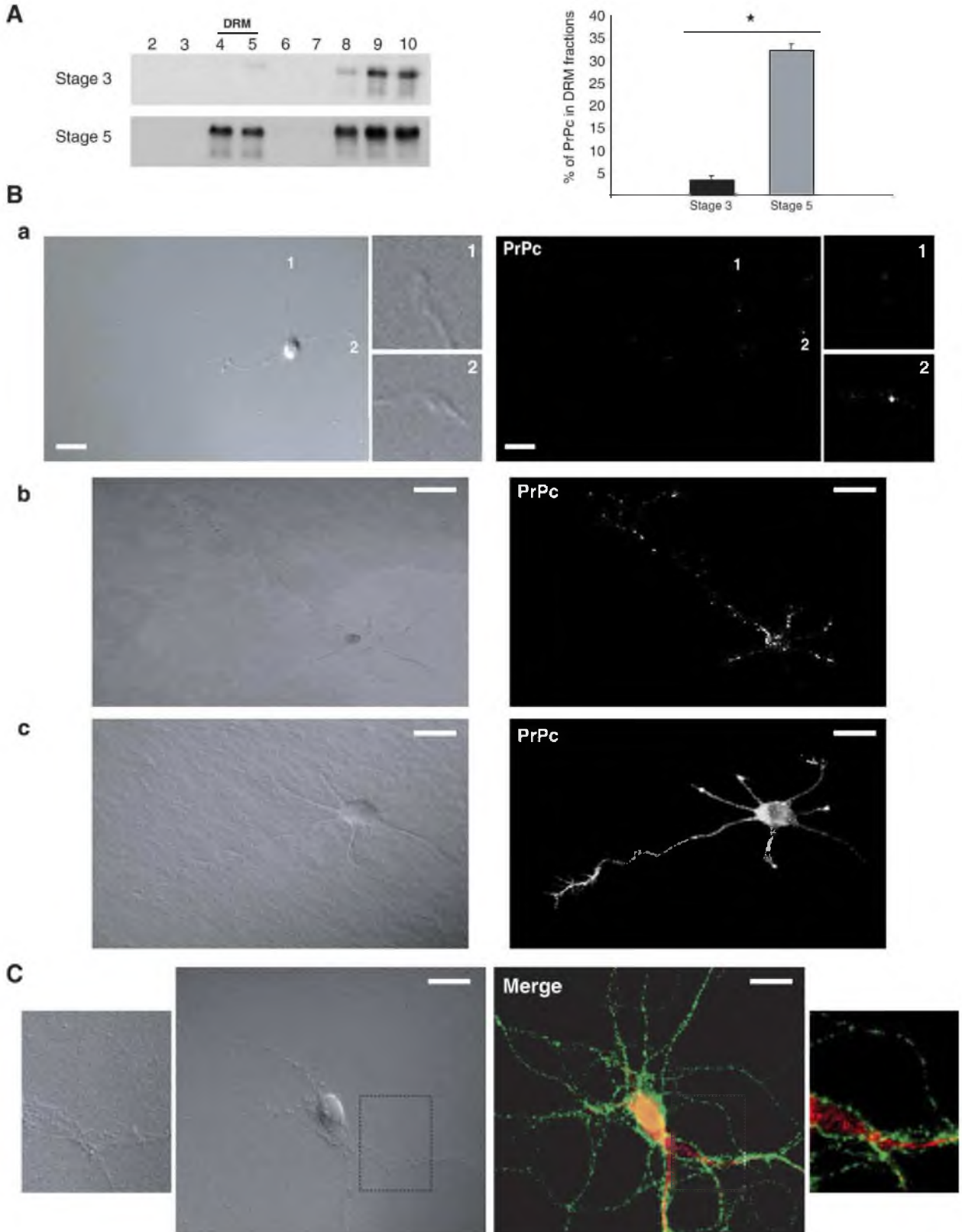
PrP<sup>C</sup> proper axonal distribution depends on DRM integrity, and in fact PrP<sup>C</sup> becomes misdistributed to dendrites upon the alteration of DRM composition by reducing the levels of cholesterol or SLs. This is the first time such requirement is described for PrP<sup>C</sup> and appears in contrast with previous findings in epithelial cells where the sorting of PrP<sup>C</sup> to the basolateral membrane occurs independently of DRMs (Sarnataro et al., 2002). We do not have a mechanistic explanation for the different sensitivity of PrP<sup>C</sup> to changes in cholesterol and SL levels in neurons but it may be a specific cell-type event that could explain why the major site of prion accumulation occurs in the brain. Interestingly, several studies including this work have shown that PrP<sup>C</sup> incorporation into DRMs has a different requirement of lipids in neurons than in other cell types (Taraboulos et al., 1995; Naslavsky et al., 1999; Sarnataro et al., 2004) pointing to particular types of DRMs that would contain this protein. Indeed, a specific lipid composition of PrP<sup>C</sup>-containing DRMs that differs from total DRMs has been reported in rat brain (Brugger et al., 2004).

In addition, our results suggest specific requirements for the different DRM lipids in regard to PrP<sup>C</sup> detergent solubility and axonal polarization. Thus, we show that while the maintenance of certain levels of DRM cholesterol but not SLs (particularly SM) is essential for PrP<sup>C</sup> insolubility, alterations of the DRM levels of both kind of lipids lead to DRM disorganization and to the unpolarized distribution of PrP<sup>C</sup>. Taking all this into account we propose that cholesterol would be the DRM lipid essential for conferring detergent insolubility to PrP<sup>C</sup>. Still, cholesterol alone would not be enough to form functional DRMs that could drive the polarization to the axons of PrP<sup>C</sup>. For this to take place, the contribution of SLs would be also required.

Fig. 2. PrP<sup>C</sup> association to DRMs parallels the acquisition of its axonal polarity. (A) Western blots using the anti-PrP<sup>C</sup> antibody of the sucrose gradients of total extracts from stage 3 and stage 5 neurons after extraction in 1% Triton X-100 at 4°C. Quantitation of the percentage of PrP<sup>C</sup> in DRMs (fractions 4 and 5 of the gradients) from two independent cultures is shown in the graph ( $*P < 0.0001$ ). (B) Phase contrast images and immunofluorescence of stage 3 neurons in the following conditions: (a) incubated with anti-PrP<sup>C</sup> and extracted for 5 min with 1% Triton X-100 at 4°C prior to fixation to detect cell surface DRMs. (b) Extracted for 5 min with 1% Triton X-100 at 4°C prior to incubation with anti-PrP<sup>C</sup> to detect intracellular DRMs. (c) Permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min at RT followed by incubation with anti-PrP<sup>C</sup> to stain total PrP<sup>C</sup>. White bars indicate 10 μm. (C) Phase contrast and immunofluorescence of a stage 5 neuron incubated with anti-PrP<sup>C</sup> and extracted for 5 min with 1% Triton X-100 at 4°C prior to fixation. Anti-MAP2 (in red) was used to label dendrites. White bars indicate 10 μm.

A recent study by Polishchuk et al. (2004) highlights the essential role of endocytosis in the polarized distribution of GPI-anchored proteins. Previous analyses of PrP<sup>C</sup> endocytosis have led to different results. Thus, while a caveolin-dependent pathway has

been described in microglia and neuroblastoma cells (Kaneko et al., 1997; Marella et al., 2002), a study in primary sensory neurons describes that PrP<sup>C</sup> leaves DRM domains to enter coated pits for endocytosis (Sunyach et al., 2003). Our data using immunoelectron



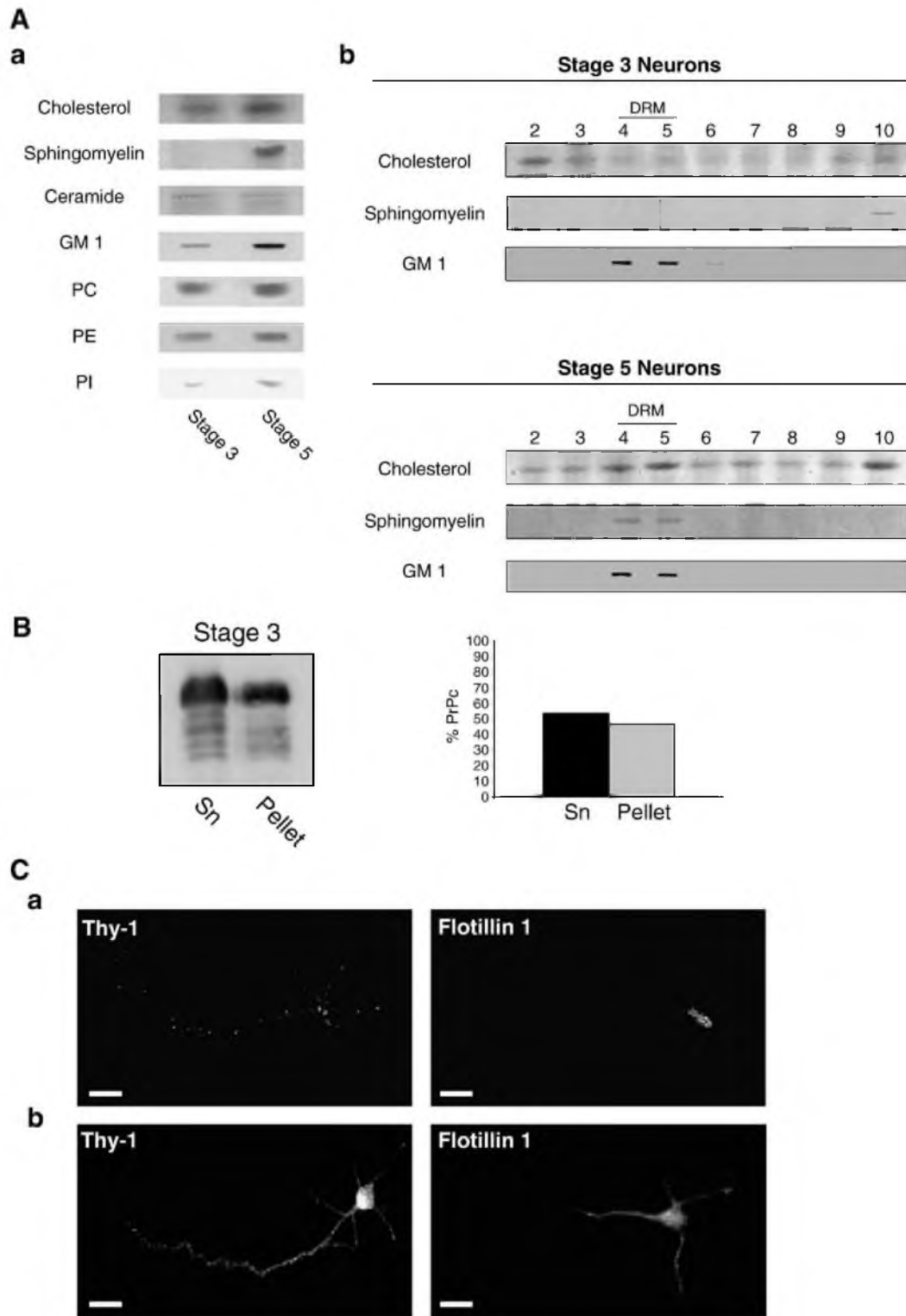


Fig. 3. Lack of incorporation of PrP<sup>C</sup> into DRMs in stage 3 neurons correlates with the poor ability of these cells to make DRMs. (A) TLC or slot-blot analysis of the indicated lipids in the total extracts (a) and the sucrose gradients of cold detergent extracted (b) stage 3 and stage 5 neurons. Same amount of total protein (40  $\mu$ g for total extracts and 200  $\mu$ g for the gradients) was used as starting material in both stages. (B) Western blot using the anti-PrP<sup>C</sup> antibody of the supernatant and pellet obtained after centrifugation at 100,000  $\times$  g for 1 h at 4°C of the total extract of stage 3 neurons. Graph on the right shows the quantification of the percentage of PrP<sup>C</sup> present in the supernatant or the pellet. (C) Immunofluorescence of cold detergent extracted (a) and non-extracted permeabilized (b) stage 3 neurons using antibodies against Thy-1 and Flotillin1. White bars indicate 10  $\mu$ m.

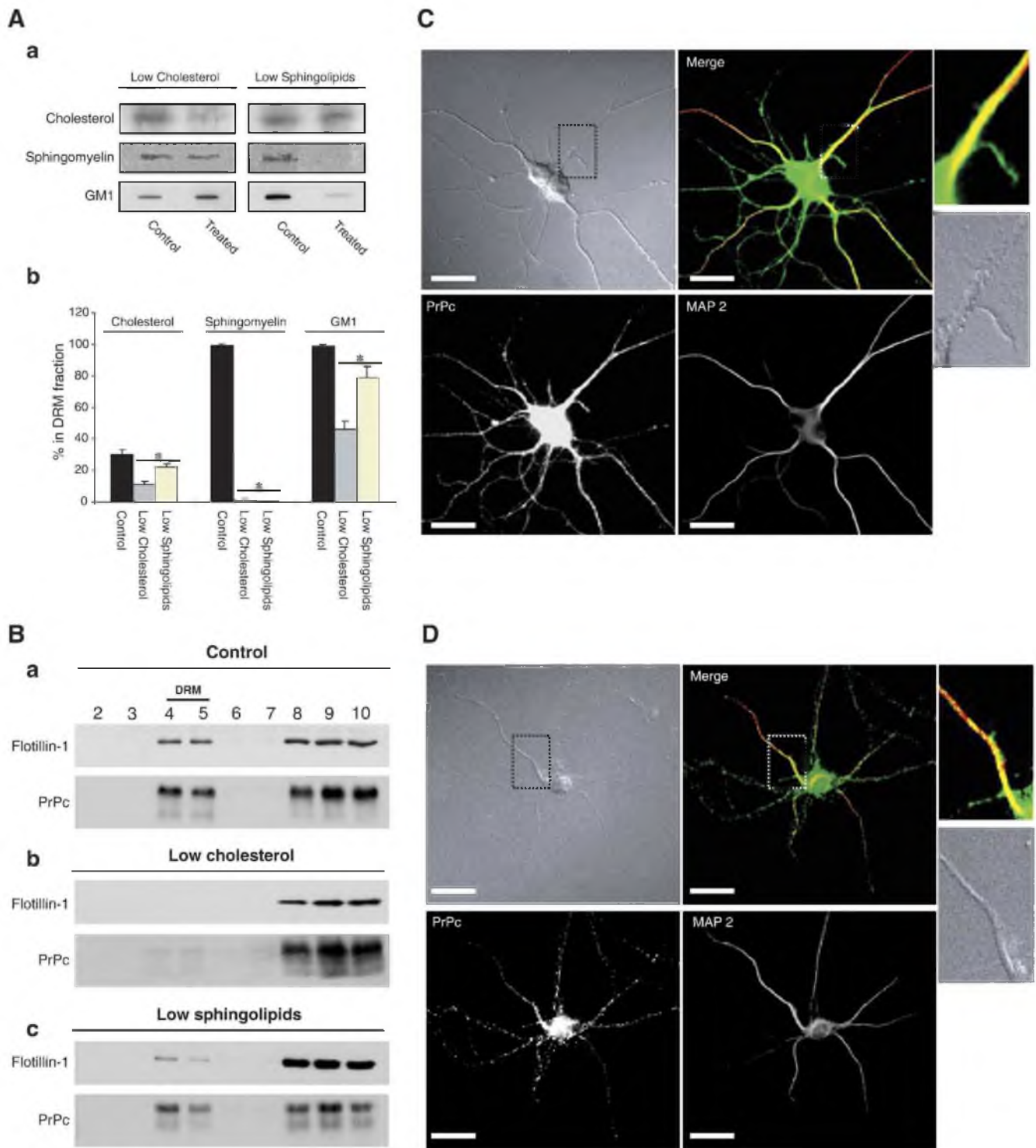
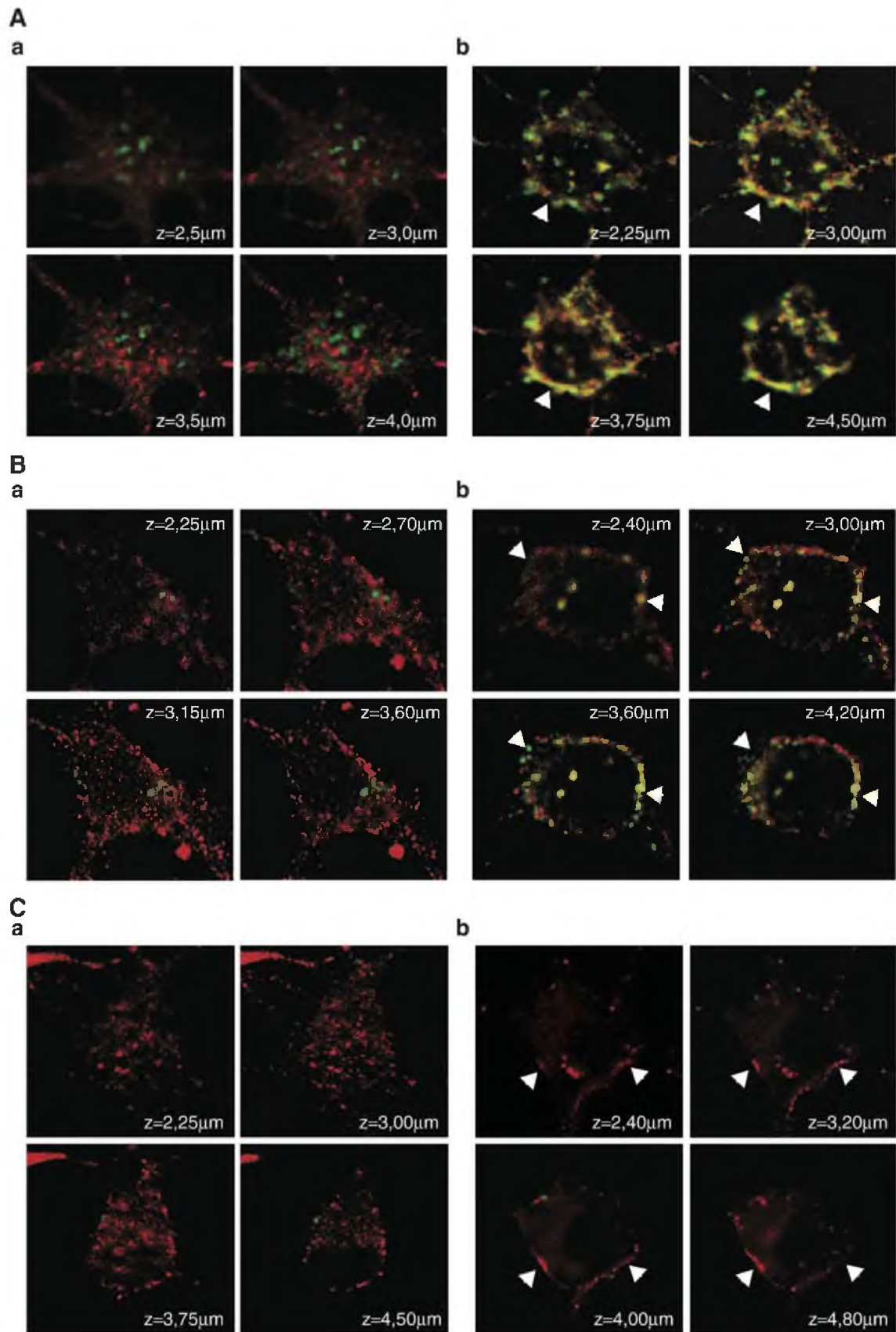


Fig. 4. Cholesterol and sphingolipid depletion causes DRM alteration and misdistribution of PrP<sup>C</sup> to the dendrites in mature hippocampal neurons. (Aa) TLC analysis showing the amounts of cholesterol and sphingomyelin or slot-blot showing the amount of GM1 in total extracts of stage 5 neurons non-treated (control) and treated with mevilonin and MCD (Low cholesterol) or with FB1 (Low sphingolipids). (Ab) Graph showing the percentage of total cholesterol, SM and GM1 in the DRM fraction of stage 5 neurons non-treated (control), treated with mevilonin and MCD (Low cholesterol) or with FB1 (Low sphingolipids). Data correspond to the mean values and standard error from two independent experiments ( $*P < 0.0001$ ). (B) Western blots using anti-Flotillin1 and anti-PrP<sup>C</sup> antibodies of the sucrose gradients of stage 5 neurons non-treated (a, control), treated with mevilonin and MCD (b, low cholesterol) or with FB1 (c, low sphingolipids). (C, D) Phase contrast and double immunofluorescence using anti-PrP<sup>C</sup> (green) and anti-MAP2 (red) antibodies of a stage 5 neuron with reduced cholesterol (C) or reduced SLs (D). PrP<sup>C</sup> is not only present in the axons but also appears in dendrites co-localizing with MAP2 (see insets and Fig. 1Ba for comparison with the control situation). White bars indicate 10  $\mu$ m.



microscopy in hippocampal slices and confocal microscopy and pharmacological manipulation of DRM lipids in primary hippocampal neurons reveal that a vast majority of PrP<sup>C</sup> endocytic structures are also enriched in the DRM lipid marker GM1 and are different from those containing the non-DRM-coated pit endocytosed protein TfRc. We further show that PrP<sup>C</sup> endocytosis depends on DRM lipid levels. These results indicate that the major PrP<sup>C</sup> endocytic route in polarized hippocampal neurons relies on DRMs and suggest that alterations in PrP<sup>C</sup> endocytosis due to DRM modifications could contribute to the misdistribution of the protein to the dendrites observed when the levels of DRM lipids are reduced.

Finally, the relationship of PrP<sup>C</sup> with DRMs might have implications not only for the physiological role of the protein but also for prion pathology. Studies based on cholesterol and SL modulation (Taraboulos et al., 1995; Naslavsky et al., 1999) have indicated that association of PrP<sup>C</sup> with DRMs is essential for the efficient pathological conversion of this protein into PrP<sup>Sc</sup>. Thus, it has been proposed that this conversion occurs in DRMs that could affect the folding of the protein (Sarnataro et al., 2004) or that these microdomains could encourage the formation of PrP<sup>Sc</sup> by facilitating propitious trafficking and/or sorting events (Kaneko et al., 1997; Marella et al., 2002). Indeed, an essential role of DRMs for PrP<sup>C</sup> endocytosis and axonal distribution is shown in this work. Taking these evidences into account, it would be important to determine whether DRM alterations could be found in brains affected by the prion diseases. In this regard, dissociation of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) from DRMs seems to be responsible for its deficient activity in brains of mice with experimental scrapie and in scrapie-infected neuroblastoma cells (Ovadia et al., 1996; Keshet et al., 1999). Further investigation on the involvement of DRMs in PrP<sup>C</sup> function and prion pathologies will be necessary to determine whether the lipid and/or protein composition of DRMs could become a therapeutic target in prion diseases.

## Experimental methods

### Materials

The monoclonal antibody (IgG1) against PrP<sup>C</sup> (Pom-1, clone Ag1193) was produced by immunizing mice with the recombinant full-length protein. It was affinity purified over a Protein-G column. Its epitope is not exactly defined but recognizes a sequence after amino acid 121 of the mouse PrP<sup>C</sup> and it competes for binding with 6H4 (amino acids 142–156), indicating that the epitopes overlap or sterically hinder each other. The purity of the antibody was tested by SDS–electrophoresis and mass spectrometry and its specificity was confirmed on neuronal extracts by Western blot. The following antibodies were also used: polyclonal anti-MAP2 (a gift from Dr. C. Sanchez, CBM, Madrid, Spain); monoclonal anti-Tau-1 (Chemicon); monoclonal anti-Thy-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); polyclonal anti-glutamate receptor (Upstate); polyclonal anti-TfRc (Santa Cruz Biotechnology Inc.); monoclonal anti-Flotillin1 (BD Transduction Laboratories); and

polyclonal anti-synaptophysin. Cholera toxin subunit B fluorescein-linked, Fumonisin B (FB1), methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) and mevilonin were from Sigma.

### Cell culture

Primary hippocampal neurons were prepared from 18-day-old rat embryos as described in Goslin and Banker (1991). These neurons survive for several weeks and undergo full polarization when cultured in serum-free medium (N<sub>2</sub>). For our experiments cells were kept in culture for 3 days (immature stage 3 neurons) or 8–15 days (mature stage 5 neurons).

### DRM isolation using Triton X-100

Hippocampal neurons were extracted in MBS buffer (25 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5) and CLAP (25  $\mu$ g/ml each of chymostatin, leupeptin, antipain and pepstatin A) containing 1% Triton X-100. After 60 min of incubation at 4°C, the suspensions (100  $\mu$ g of total protein/ml) were brought to 60% sucrose in MBS and a sucrose step gradient was overlaid (35% and 5% sucrose). After centrifugation at 120,000  $\times$  g for 18 h at 4°C, eleven fractions were collected from the top of each tube. Fractions 4–5 were identified as the DRM fractions by the presence of the DRM markers in the control samples.

### DRM isolation by sonication

Hippocampal neurons in culture were washed in cold-phosphate-buffered saline and scraped into 1 ml of ice-cold MBS buffer. The cells were homogenized by 10 passages through a 22-G needle and sonicated using a 130-W Ultrasonic Processor set at amplitude 50 (twelve 5-s bursts). This homogenate was then subjected to fractionation in sucrose gradient as described above.

### DRM lipid depletion

Cholesterol reduction in hippocampal neurons was performed by treating the cells at day 5 in vitro with 0.4  $\mu$ M mevilonin and 0.5 mM MCD. At day 10 the cells were processed for immunofluorescence, detergent extraction or cholesterol and SL determination.

Sphingolipid (SL) depletion was performed by adding to the neurons FB1 from a 1-mM stock solution in 20-mM HEPES, pH 7.4, 24 h after plating. FB1 was subsequently added every 48 h reaching each time a final concentration of 25  $\mu$ M. After 8 days of treatment cells were processed for immunofluorescence, detergent extraction or SL and cholesterol measurements.

### Cell viability after lipid depletion

Neuronal morphology, total protein content of membranes (40  $\pm$  9  $\mu$ g protein/100,000 cells) and molecular polarization of cytoskeletal or synaptic components were not altered by cholesterol or SL depletion (this work and see also Ledesma et al., 2003) indicating that the treatments are not deleterious. To further assess

Fig. 5. PrP<sup>C</sup> endocytosis is mediated by DRMs in mature hippocampal neurons. (A) Confocal images of the cell body of mature neurons after 10 min internalization of cholera toxin B (green) and TfRc antibody (red) (a) or cholera toxin B (green) and PrP<sup>C</sup> antibody (red) (b) in control conditions (A), in neurons with low cholesterol (B), in neurons with reduced SLs (C). Z indicates the depth of the stack in each image. Arrowheads show the surface of the cell body.

this point cell viability was tested by measuring the levels of apoptosis and necrosis in a total of hundred cells for every treatment in each independent culture. Apoptosis was scored by TUNEL assay as described in *Estus et al., 1997*. The levels of apoptosis were very similar in control, cholesterol-depleted and SL-depleted neurons:  $10 \pm 2.6\%$ ,  $8 \pm 2\%$  and  $12 \pm 3.1\%$ , respectively. Necrosis was measured by Trypan blue uptake as described in *Goslin and Banker (1991)*. The percentages of Trypan blue positive neurons were not significantly different for control, cholesterol-depleted and SL-depleted neurons:  $5 \pm 1.5\%$ ,  $4 \pm 1.8\%$  and  $6 \pm 2\%$ , respectively.

#### Lipid analysis

To compare the amount of DRM lipids in total extracts and DRMs of stage 3 and stage 5 neurons and to monitor the efficiency of the protocols used for lipid depletion, cholesterol and SL levels were analyzed by thin layer chromatography (TLC). Cell membrane pellets were obtained after centrifugation at  $100,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 1 h and lipids were extracted according to *Bligh and Dyer (1959)*. Extracted lipids were subsequently analyzed on silica gel 60 HPTLC plates using two different running solvents: hydrophilic: chloroform/acetone/acetic acid/methanol/water [50:20:10:10:5]; and hydrophobic: hexane/ethyl acetate [5:2]. Standards for cholesterol, ceramide, SM (Sigma) and the phospholipids PC, PE and PI (Matreya, Inc.) were used to identify these lipid species. The levels of the ganglioside GM1 were determined by slot-blot using cholera toxin B peroxidase linked and the ECL method (Amersham). Quantitation of the results obtained from 2 to 3 independent experiments per each condition was done on the scanned TLCs or slot-blots in conditions of non-saturated signal using the NIH image software.

#### Immunofluorescence and quantifications

Immunofluorescence of permeabilized neurons (incubated with 0.1% Triton X-100 for 5 min at RT) or cold-detergent-extracted neurons (incubated with 1% Triton X-100 for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ ) was performed as described in *Ledesma et al. (1998)*. Surface staining was performed by incubation of living cells with anti-PrP<sup>C</sup> for 10 min at  $12^\circ\text{C}$  before fixation (see also Supplementary material). For quantitation, areas were chosen randomly in each growth cone or in each neurite. In the mature neurons the phase contrast images and the MAP2 and Tau staining (see Supplementary Figure A) were analyzed to unequivocally identify the areas as dendritic or axonal. Pixel intensity of the PrP<sup>C</sup> labeling in these areas was measured with the NIH program. The mean intensity was calculated per area unit. Data are given as the ratio of the average values obtained for the longest versus the short neurites in 25 stage 3 neurons or for the axons (MAP2 negative, Tau positive) versus dendrites (MAP2 positive, Tau negative) in stage 5 neurons. 70–80 dendrites and 50–60 axons were analyzed for each experimental condition at this stage.

#### Endocytosis

Living neurons were incubated for 2, 6 or 10 min with cholera toxin subunit B fluorescein linked and antibodies against PrP<sup>C</sup> or TfRc. Cells were then extensively washed, fixed with 4% PFA and permeabilized with 0.1% Triton X-100. After blocking

species-specific secondary antibodies rhodamine linked (Alexa) were used. Samples were analyzed in a confocal scanning microscope (LSM 510 on an Axiovert 100 M platform). Co-localization was determined by converting to colored circles GM1 (green) and TfRc or PrP<sup>C</sup> (red) clusters. The degree of intersection was considered as total co-localization (more than 80% intersection) or partial co-localization (50–80% intersection). Cell bodies from 10 different neurons were analyzed in each condition. To evaluate the level of endocytosis, the number of clusters in the cell body area was counted excluding the clusters at the periphery that were considered surface staining. The average number of clusters in the cell bodies of cholesterol- and SL-depleted neurons was referred to the average number of clusters in the cell bodies of non-treated neurons and expressed as percentage of the control.

#### Immunoelectron microscopy

Sections from rodent hippocampus embedded in Lowicryl HM20 were labeled by postembedding immunogold procedure as described in *Sassoe-Pognetto and Ottersen (2000)*. Sections were incubated with the anti-PrP<sup>C</sup> antibody diluted in Tris buffer (5 mM) containing 0.3% NaCl and 0.1% Triton X-100 for 2 h and then with an anti-mouse secondary antibody conjugated to 10-nm gold particles.

#### Statistical analysis

The Student *t* test was used to analyze the data. *P* values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

#### Acknowledgments

We thank B. Hellias and E. Cassin for the cultured neurons, M. Polymenidou for the characterization of the epitope and K. Mertz for the advice on the use of anti-PrP<sup>C</sup> antibody and P. Panzanelli and M. Sassoe for providing with hippocampal slices and material for the electron microscopy analysis. This work was supported by grants from the NNPDF to M.D.L, Telethon Italia to M.D.L and C.G.D and by EU contract LSHM-CT-2003-503330 (APOPIS) to A.A and C.G.D.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.mcn.2005.07.003](https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.07.003).

#### References

- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Borchelt, D.R., Koliatsos, V.E., Guarnieri, M., Pardo, C.A., Sisodia, S.S., Price, D.L., 1994. Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. *J. Biol. Chem.* 269, 14711–14714.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C., 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339–1347.
- Brugger, B., Graham, C., Leibrecht, I., Mombelli, E., Jen, A., Wieland, F.,



- Morris, R., 2004. The membrane domains occupied by glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein and Thy-1 differ in lipid composition. *J. Biol. Chem.* 279, 7530–7536.
- DeArmond, S.J., Mobley, W.C., DeMott, D.L., Barry, R.A., Beckstead, J.H., Prusiner, S.B., 1998. Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* 50, 1271–1280.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., Banker, G.A., 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8, 1454–1468.
- Dotti, C.G., Parton, R.G., Simons, K., 1991. Polarized sorting of glypiated proteins in hippocampal neurons. *Nature* 349, 158–161.
- Estus, S., Tucker, H.M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E.F., Wogulis, M., Rydel, B.E., 1997. Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant apoptotic pattern of gene induction. *J. Neurosci.* 17, 7736–7745.
- Fishman, P.H., Pacuszka, T., Orlandi, P.A., 1993. Gangliosides as receptors for bacterial enterotoxins. *Adv. Lipid Res.* 25, 165–187.
- Fivaz, M., Vilbois, F., Thumheer, S., Pasquali, C., Abrami, L., Bickel, P.E., Parton, R.G., van der Goot, F.G., 2002. Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *EMBO J.* 21, 3989–4000.
- Gorodinsky, A., Harris, D.A., 1995. Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J. Cell Biol.* 129, 619–627.
- Goslin, K.B., Banker, G.A., 1991. *Culturing Nerve Cells*. MIT Press, Cambridge, MA.
- Kaneko, K., Vey, M., Scott, M., Pilkuhn, S., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., 1997. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2333–2338.
- Keshet, G.I., Ovadia, H., Taraboulos, A., Gabizon, R., 1999. Scrapie-infected mice and PrP knockout mice share abnormal localization and activity of neuronal nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* 72, 1224–1231.
- Kretzschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E., DeArmond, S.J., 1986. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Pathol.* 122, 1–5.
- Ledesma, M.D., Dotti, C.G., 2003. Membrane and cytoskeleton dynamics during axonal elongation and stabilization. *Int. Rev. Cytol.* 227, 183–219.
- Ledesma, M.D., Simons, K., Dotti, C.G., 1998. Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3966–3971.
- Ledesma, M.D., Brugger, B., Bunning, G., Weiland, F.T., Dotti, C.G., 1999. Maturation of the axonal plasma membrane requires upregulation of sphingomyelin synthesis and formation of protein-lipid complexes. *EMBO J.* 18, 1761–1771.
- Ledesma, M.D., Abad-Rodriguez, J., Galvan, C., Biondi, E., Navarro, P., Delacourte, A., Dingwall, C., Dotti, C.G., 2003. Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep.* 4, 1190–1196.
- Madore, N., Smith, K.L., Graham, C.H., Jen, A., Brady, K., Hall, S., Morris, R., 1999. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J.* 18, 6917–6926.
- Marella, M., Lehmann, S., Grassi, J., Chabry, J., 2002. Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J. Biol. Chem.* 277, 25457–25464.
- Mironov Jr., A., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R.A., Burton, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Peters, P.J., 2003. Cytosolic prion protein in neurons. *J. Neurosci.* 23, 7183–7193.
- Naslavsky, N., Shmeeda, H., Friedlander, G., Yanai, A., Futerman, A.H., Barenholz, Y., Taraboulos, A., 1999. Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. *J. Biol. Chem.* 274, 20763–20771.
- Nichols, B.J., 2003. GM1-containing lipid rafts are depleted within clathrin-coated pits. *Curr. Biol.* 13, 686–690.
- Orlandi, P.A., Fishman, P.H., 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell Biol.* 141, 905–915.
- Ovadia, H., Rosenmann, H., Shezen, E., Halimi, M., Ofra, I., Gabizon, R., 1996. Effect of scrapie infection on the activity of neuronal nitric oxide synthase in brain and neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 271, 16856–16861.
- Parton, R.G., Hancock, J.F., 2004. Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol.* 14, 141–147.
- Peters, P.J., Mironov, A., Peretz Jr., D., et al., 2003. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J. Cell Biol.* 162, 703–717.
- Polishchuk, R., Di Pentima, A., Lippincott-Schwartz, J., 2004. Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat. Cell Biol.* 6, 297–307.
- Prusiner, S.B., 1998. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13363–13383.
- Sales, N., Hassig, R., Rodolfo, K., Di Giamberardino, L., Traiffort, E., Ruat, M., Fretier, P., Moya, K.L., 2002. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1163–1177.
- Sarnataro, D., Paladino, S., Campana, V., Grassi, J., Nitsch, L., Zurzolo, C., 2002. PrP<sup>C</sup> is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. *Traffic* 3, 810–821.
- Sarnataro, D., Campana, V., Paladino, S., Stomaiuolo, M., Nitsch, L., Zurzolo, C., 2004. PrP(C) association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. *Mol. Biol. Cell.* 15, 4031–4042.
- Sassoe-Pognetto, M., Ottersen, O.P., 2000. Organization of ionotropic glutamate receptors at dendrodendritic synapses in the rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* 20, 2192–2201.
- Simons, K., Toomre, D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 1, 31–39.
- Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C., Anderson, R.G., 1995. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10104–10108.
- Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K.T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M.W., Morris, R., 2003. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* 22, 3591–3601.
- Taraboulos, A., Jendroska, K., Serban, D., Yang, S.L., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., 1992. Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7620–7624.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., Prusiner, S.B., Avraham, D., 1995. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* 129, 121–132.
- Walmsley, A.R., Zeng, F., Hooper, N.M., 2003. The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. *J. Biol. Chem.* 278, 37241–37248.

# Anomalous Surface Distribution of Glycosyl Phosphatidyl Inositol-anchored Proteins in Neurons Lacking Acid Sphingomyelinase

Cristian Galvan,<sup>\*†</sup> Paola G. Camoletto,<sup>\*†§||</sup> Flavio Cristofani,<sup>\*</sup>  
Paul P. Van Veldhoven,<sup>||</sup> and Maria Dolores Ledesma<sup>\*†§</sup>

<sup>\*</sup>Cavaliere Ottolenghi Scientific Institute, Università degli Studi di Torino, A.O. San Luigi Gonzaga, Regione Gonzole 10, 10043 Orbassano (Torino), Italy; <sup>†</sup>Department of Molecular and Developmental Genetics, Flanders Institute for Biotechnology, 3000 Leuven, Belgium; <sup>§</sup>Center for Human Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, 3000 Leuven, Belgium; and <sup>||</sup>Department of Molecular Cell Biology, Laboratorium for Lipid Biochemistry and Protein Interactions, Katholieke Universiteit Leuven, 3000 Leuven, Belgium

Submitted May 11, 2007; Revised October 29, 2007; Accepted November 9, 2007  
Monitoring Editor: Sean Munro

**Acid sphingomyelinase (ASM) converts sphingomyelin (SM) into ceramide. Mutations in the ASM gene cause the mental retardation syndrome Niemann Pick type A (NPA), characterized as a lysosomal disorder because of the SM accumulation in these organelles. We here report that neurons from mice lacking ASM (ASMKO) present increased plasma membrane SM levels evident in detergent-resistant membranes. Paralleling this lipidic alteration, GPI-anchored proteins show an aberrant distribution in both axons and dendrites instead of the axonal enrichment observed in neurons from wild-type mice. Trafficking analysis suggests that this is due to defective internalization from dendrites. Increasing the SM content in wild-type neurons mimics these defects, whereas SM reduction in ASMKO neurons prevents their occurrence. Moreover, expression of active RhoA, which membrane attachment is affected by SM accumulation, rescues internalization rates in ASMKO neurons. These data unveil an unexpected role for ASM in neuronal plasma membrane organization and trafficking providing insight on the molecular mechanisms involved. They also suggest that deficiencies in such processes could be key pathological events in NPA disease.**

## INTRODUCTION

Loss-of-function mutations in the gene encoding for the sphingomyelin (SM)-converting enzyme acid sphingomyelinase (ASM) cause the Niemann Pick type A (NPA) disease, a severe neurological disorder characterized by mental retardation and early death (Brady *et al.*, 1966). In ASM knock out (ASMKO) mice, which develop a phenotype essentially identical to the human NPA disease (Horinouchi *et al.*, 1995; Otterbach and Stoffel, 1995), the presence of axonal dystrophy (Kuemmel *et al.*, 1997) and neurodegeneration with a differential susceptibility depending on the molecular phenotypes of the neurons (Sarna *et al.*, 2001) have been described. How the lack of ASM activity leads to these alterations, which can certainly define the severe neurological course of the disease, remains however poorly understood.

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E07-05-0439>) on November 21, 2007.

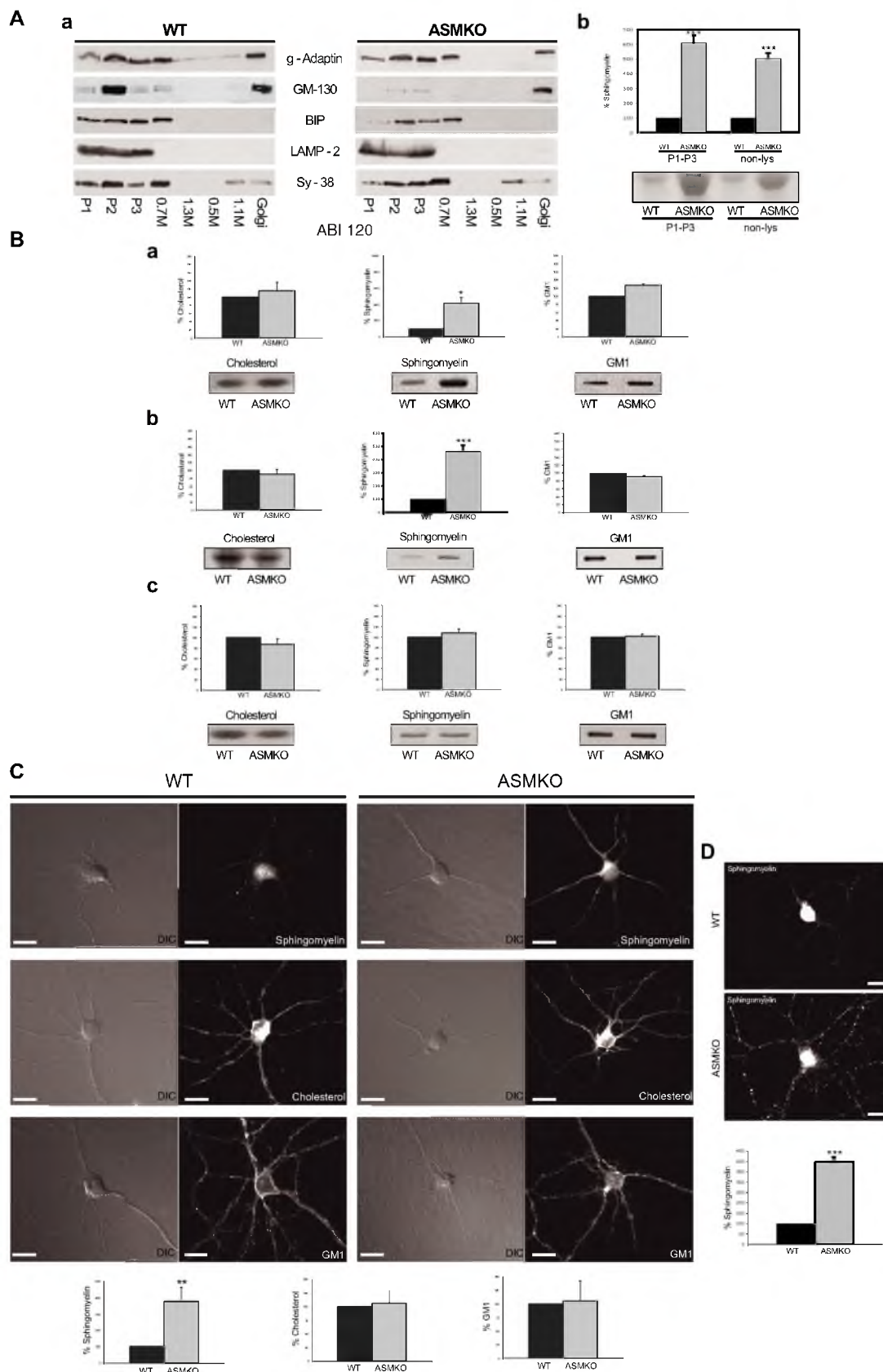
<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to: Maria Dolores Ledesma (lola.ledesma@med.kuleuven.be).

Abbreviations used: Pr<sup>PC</sup>, cellular prion protein; DRMs, detergent-resistant membranes; ASM, acid sphingomyelinase; NPA, Niemann Pick type A disease; SM, sphingomyelin; TLC, thin-layer chromatography; GPI, glycosyl phosphatidyl inositol; MBP, maltose binding protein.

The major site of ASM activity is in lysosomes (Stoffel, 1999) and in fact, the cells of NPA-affected individuals and ASMKO mice present abnormally large lysosomes filled with SM. This particular feature has been utilized to classify NPA as a lysosomal storage disease (Futerman and van Meer, 2004). Still, it is not directly proven that abnormal SM accumulation in lysosomes leads to brain dysfunction and neurodegeneration. Although the neutral sphingomyelinase (Smase) has been considered the main responsible of SM turnover at the cell surface, the remarkable enrichment of SM at the plasma membrane of neurons and the presence of a pool of the ASM at this cellular site, particularly in detergent-resistant membranes (DRMs; Liu and Anderson, 1995; Grassme *et al.*, 2001), suggest that at least some of the alterations in NPA disease might be the consequence of plasma membrane defects.

Although to certain extent their biological significance remains conflictive (Munro, 2003; Douglass and Vale, 2005), the existence of plasma membrane-derived DRMs has been described in most cell types (Parton and Richards, 2003). DRMs are biochemically defined by their resistance to extraction with nonionic detergents at low temperature (Simons and Toomre, 2000). This is due to their particular lipid composition enriched in SM and cholesterol, which cluster together with the ganglioside GM1 and certain proteins, most notoriously, glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored, dually acylated and cholesterol-associated, and palmitoylated proteins (Simons and Toomre, 2000). Numerous experimental evidences support that clustering within DRMs is important for a number of functions, including



**Figure 1.** Increased SM levels in the plasma membrane- but not Golgi-derived DRMs from ASMKO neurons. (Aa) Preparation of total and Golgi lysosomal-free membranes from wt and ASMKO brains. Three steps of low-speed centrifugations (see *Materials and Methods*) were used to eliminate lysosomes from brain homogenates. The supernatant of the pellet P3 was considered the total extract. Further centrifugations in

certain types of endocytosis (Parton and Richards, 2003), modulation of intracellular signaling (Simons and Toomre, 2000), and as a way to keep segregated plasma membrane territories with different protein composition, such as the apical and basolateral surface in epithelial cells or the axonal and dendritic surface in neurons (Simons and Ikonen, 1997; Ledesma *et al.*, 1998). Given the potential biological relevance of DRMs and that ASM has been found in these kind of membranes and controls the turnover of a major DRM lipid, SM, we have in this work investigated DRM composition, trafficking and function in ASMKO mice-derived neurons in vitro and in situ.

## MATERIALS AND METHODS

### Antibodies

Antibodies against the following molecules were used:  $\gamma$ -adaptn (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY); Bip (BD Transduction Laboratories); GM-130 (BD Transduction Laboratories); Lamp-2 (BD Transduction Laboratories); synaptophysin (Clone Sy-38, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN); Transferrin Receptor (Clone CD-71, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); amyloid precursor protein (APP; Clone 22C11, Chemicon, Temecula, CA); Flotillin-1 (BD Transduction Laboratories); PrP<sup>c</sup> (Pom-1, clone Ag1193, kindly provided by Dr. A. Aguzzi, Institute of Neuropathology, Zurich, Switzerland); MAP2 (Peninsula Laboratories, Belmont, CA, polyclonal); RhoA (clone 26C4, Santa Cruz Biotechnology); Cdc-42 P1 (Santa Cruz Biotechnology);  $\alpha$ -tubulin (Calbiochem, La Jolla, CA).

### Mice

A breeding colony of ASM heterozygous C57BL/6 mice (Horinouchi *et al.*, 1995), kindly donated by Dr. E. Schuchman (Mount Sinai School of Medicine, New York), was established. The experiments were performed by comparing littermates of wild-type (wt) or ASMKO mice (7 mo of age), which genotype

**Figure 1 (cont).** sucrose gradients were performed to isolate Golgi membranes. The figure shows Western blots of the different fractions of the experimental protocol using antibodies against markers of several membrane compartments:  $\gamma$  adaptn and GM130 (Golgi), Bip (endoplasmic reticulum), Lamp-2 (lysosomes), and synaptophysin (synaptic vesicles/plasma membrane), which confirm the initial elimination of lysosomes and the enrichment of Golgi membranes in a specific fraction. (Ab) Comparison of the SM content in lysosomal enriched and lysosomal free fractions. The amount of SM in fractions P1–P3 and in the supernatant of pellet 3 that gathers nonlysosomal fractions (nonlys) was analyzed by TLC. The bottom panel shows a representative example of the SM staining in the TLC. The graph shows mean values and SD of data corresponding to three ASMKO and three wt brains expressed as percentage over the wt values that were considered 100% (\*\**p* < 0.001). (B) Lipid analysis of total membrane DRMs from wt and ASMKO mice brains (a) and 10<sup>6</sup> cultured hippocampal neurons (b) or Golgi membrane DRMs from wt and ASMKO mice brains (c). Bottom panels show representative images of the TLC for cholesterol and SM or slot-blot for GM1. Graphs in the top panels show mean values and SD of five ASMKO and five wt brains (a and c) or three independent neuronal cultures (b) expressed as percentage over the wt values that were considered 100% (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.001). (C) Levels of DRM-enriched lipids at the neuronal surface. DIC and fluorescence images of nonpermeabilized wt and ASMKO neurons labeled with Lysenin-MBP, filipin, and cholera-toxin subunit B to stain cell surface SM, cholesterol, and GM1, respectively. Graphs show mean values and SD of the fluorescence intensity/area unit expressed as percentage over wt values that were considered 100%. Twenty cells in each of three independent cultures were analyzed per condition (\*\**p* < 0.005). (D) Levels of SM in cell surface DRMs. Fluorescence images of representative wt and ASMKO neurons extracted with cold Triton X-100 after incubation with Lysenin-MBP. Graph shows mean values and SD of the fluorescence intensity/area unit expressed as percentage over wt values that were considered 100%. Twenty cells in each of three independent cultures were analyzed per condition (\*\**p* < 0.001). Bars, 10  $\mu$ m in all panels.

was determined from genomic DNA in a PCR reaction as described in Horinouchi *et al.* (1995). All procedures involving the use of animals were performed under the supervision of a licensed veterinarian (Dr. F. Cristofani) according to guidelines specified for the animal protection and welfare by the Italian Ministry of Health (DDL 116/92).

### Cell Culture

Cultures of hippocampal neurons were prepared from brains of 16-d-old mouse embryos as described in Goslin and Banker (1991). These neurons survive for several weeks and undergo full polarization when cultured in serum-free medium in the presence of a supporting layer of astrocytes. For our experiments hippocampal neurons were kept in culture for more than 8 d when they reach full maturation (Dotti *et al.*, 1988).

### Isolation of Lysosomal Free Membrane Fractions and Golgi-enriched Membranes

Total mice brains were homogenized in ice-cold 0.5 M sucrose-PKM buffer (100 mM potassium phosphate, pH 6.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 3 mM KCl). Samples were centrifuged for 10 min at 2500 rpm. The postnuclear supernatant was centrifuged two more times for 10 min at 8000 rpm to get a lysosomal-free fraction. The supernatant after these series of low-speed centrifugations was considered total membrane extract as it contained markers for all membranes tested (i.e., endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, plasma membrane, and endosomes; Figure 1A and data not shown). To obtain Golgi-enriched membranes, this supernatant was treated as indicated by Fath and Burgess (1993). Thus, it was layered onto a step gradient containing 1.3 M sucrose-PKM and 0.7 M sucrose-PKM and then centrifuged at 17500 rpm in a SW40 rotor for 60 min. Membranes that concentrated at the 0.7/1.3 sucrose interface were collected and brought to 1.25 M sucrose-PKM overlaid with 1.1 M sucrose-PKM, 0.5 M sucrose-PKM, and centrifuged at 15000 rpm in a SW40 rotor for 90 min. Golgi membranes were collected at the 0.5/1.1 M interface, adjusted to 0.7 M sucrose-PKM, and finally centrifuged at 10400 rpm for 15 min to pellet the Golgi stacks.

### Gel Electrophoresis and Immunoblotting

Proteins were resolved on 12% SDS-PAGE gels and electroblotted to nitrocellulose membranes. Immunoblots were incubated with appropriate primary antibodies followed by incubation with peroxidase-labeled secondary antibodies and visualized using enhanced chemiluminescence reagents. For quantitation scanned autoradiographies were analyzed with the NIH Image J program (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) under conditions of nonsaturated signal.

### DRM Isolation

Either total or Golgi-enriched membranes without lysosomes were incubated for 1 h at 4°C in 1% Triton X-100, 25 mM MES, pH 7.00, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, and protease inhibitors (CLAP: chymostatin, leupeptin, antipain, pepstatin, each at a final concentration of 25  $\mu$ g/ml). The extracts were mixed with 90% sucrose prepared in MBS buffer (25 mM MES, pH 7.00, 150 mM NaCl, and CLAP) to reach a final concentration of 60% and overlaid in an SW40 centrifugation tube with a step gradient of 35 and 5% sucrose in MBS. After overnight centrifugation at 35,000 rpm and 4°C, DRMs were obtained in fractions 4 and 5.

### Lipid Extraction and Analysis by Thin Layer Chromatography

Membrane pellets were obtained after centrifugation at 100000 g at 4°C for 1 h and lipids were extracted according to Bligh and Dyer (1959). Extracted lipids were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel 60 HPTLC plates using two running solvents subsequently (hydrophilic: chloroform/acetone/acetic acid/methanol/water [50:20:10:10:5] and hydrophobic: hexane/ethyl acetate [5:2]). Standards of cholesterol, ceramide, and SM (Sigma, St. Louis, MO) were run in each TLC to identify the different lipid species. GM1 was analyzed by slot-blot using cholera toxin subunit B linked to peroxidase (Sigma). Scanned TLCs or slot-blots were quantified using the ImageJ under conditions of nonsaturated signal.

### Mass Analysis of Lipids

The amount of major lipids were measured in lipid extracts prepared from one brain hemisphere in chloroform/methanol/water (1/2/0.8, vol/vol) and phase-separated in the presence of salt or prepared from monolayers scraped in methanol (Van Veldhoven and Bell, 1988), followed by extraction with chloroform/methanol and phase separation. Aliquots of the extracts were analyzed for phospholipids (organic phosphate; Van Veldhoven and Bell, 1988), ceramide by means of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP and recombinant ceramide kinase (Van Overloop *et al.*, 2006) or subjected to TLC (0.25 mm Silica gel 60, Merck, Rahway, NJ; solvent hexane/diethylether/acetic acid 70/30/1, vol/vol) followed by elution and enzymatic quantification of triglycerides, cholesterylest-ers, and cholesterol as described in Van Veldhoven *et al.*, (1997, 1998) except that cholesterylest-ers and triglycerides were hydrolyzed chemically (5% 5 M

KOH in ethanol, 75°C, 90 min). Main phospholipids, also separated by TLC (solvent chloroform/methanol/formic acid 65/25/10, vol/vol), were visualized by iodine staining followed by ashing and phosphate analysis (Van Veldhoven and Bell, 1988). Recovery of standards after chromatography is estimated at 80–85%. Analysis of minor lysosphingolipids, including sphingosine, will be described in detail elsewhere. Briefly, acidic methanolic tissue or cell extracts were fortified with a suitable internal standard ( $C_{17}$ -sphingosine, Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canada), diluted with water and applied to a hydrophobic SPE cartridge (60 mg HLB-Oasis, Waters Associates, Millipore, Milford, MA). Compounds, eluted with methanol, were derivatized with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (Lester and Dickson, 2001) with some modifications and subjected to normal phase SPE (100 mg NH<sub>2</sub>-BondElut, Varian, Sunnyvale, CA) to separate the derivatized sphingoid bases/lysosphingolipids. After two selective hydrolysis steps, samples were separated by reversed phase HPLC (Symmetry C18-column  $4.6 \times 150$ ;  $5 \mu\text{m}$ ;  $100 \text{ \AA}$ ; Waters) with an increasing gradient of buffered methanol/acetonitrile coupled to fluorometric analysis (Van Veldhoven, unpublished data).

### Treatments with SM or Smase

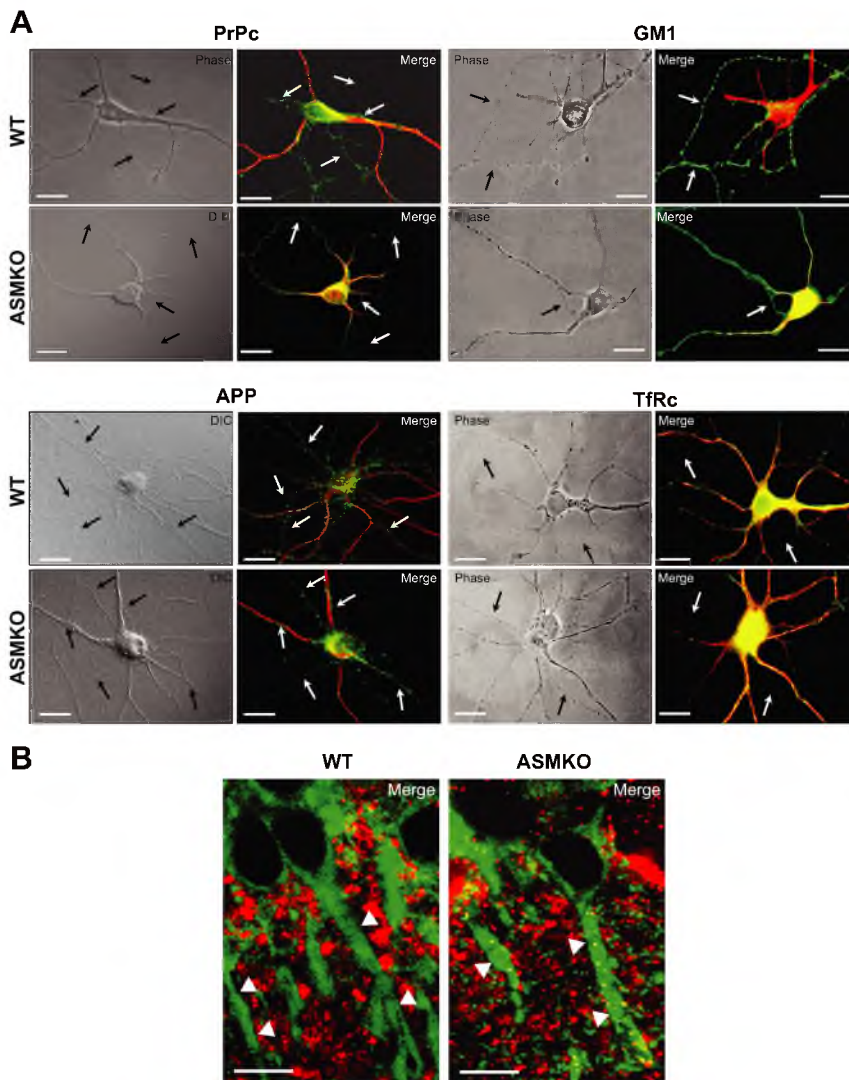
A stock of SM was prepared in 2:1 ethanol/Me<sub>2</sub>SO as described in Puri *et al.* (2003). The stock was added to living 8-d neurons reaching a final concentration of  $40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Thirty minutes before the addition of SM the cells were incubated with 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> that inhibits ASM (Testai *et al.*, 2004). The bacterial SMA from *bacillus aureus* Smase (Sigma) was directly added to living 8-d neurons at 0.1 unit/100  $\mu\text{l}$  medium. After 48 h of SM or Smase treatments cells were collected for biochemical analysis or fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for immunofluorescence. Cell viability was tested by measuring the levels of apoptosis in a total of hundred cells for every treatment in each

independent culture. Apoptosis was scored by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]-mediated nick end labeling) assay as described in Estus *et al.* (1997).

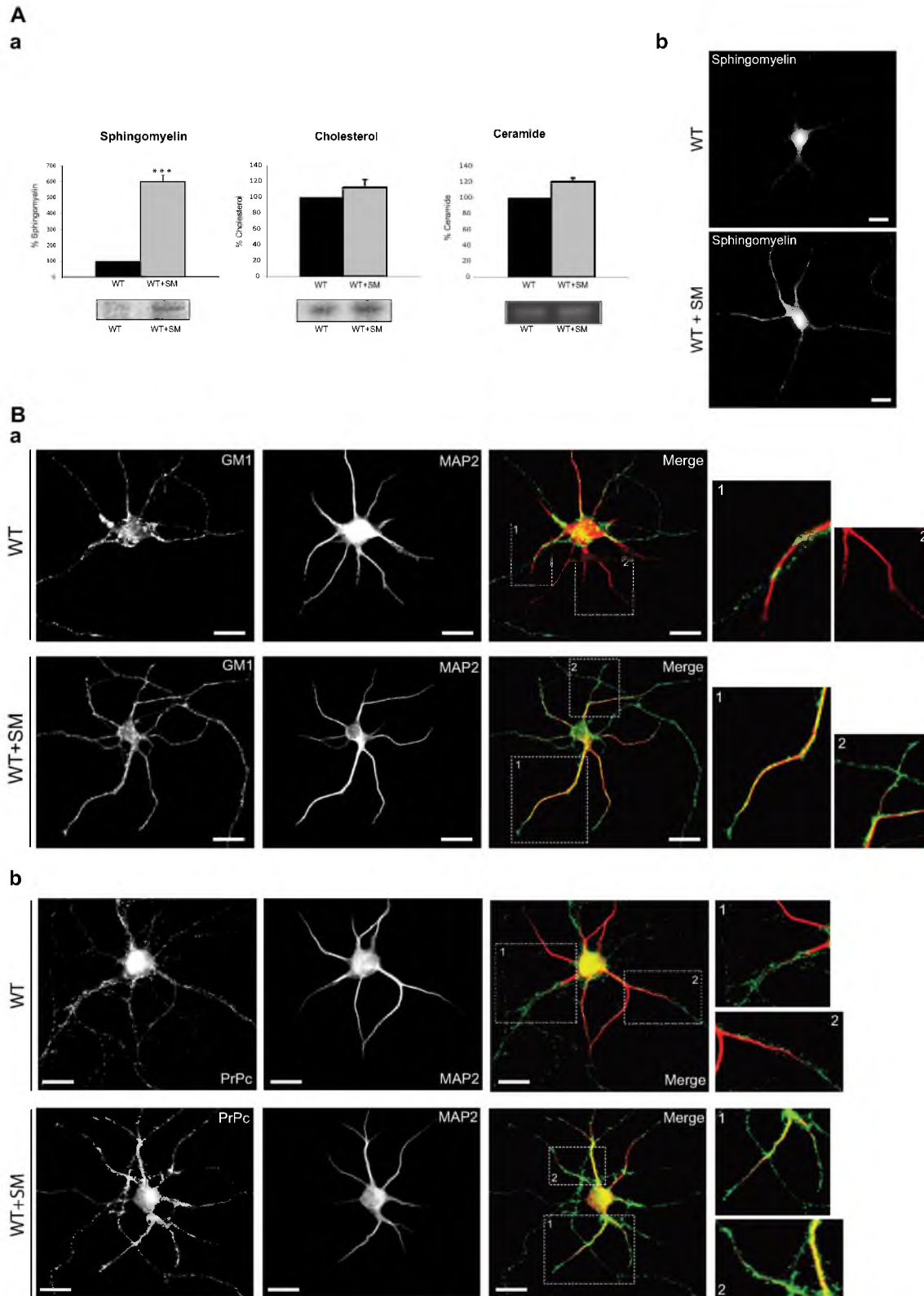
### Immunofluorescence

For surface lipid staining neurons were incubated with either the worm toxin lyserin linked to MBP protein (kind gift from Dr. T. Kobayashi, RIKEN Institute, Saitama, Japan), which binds specifically to SM (Kiyokawa *et al.*, 2004); with filipin (Sigma), which binds to cholesterol; or with cholera toxin subunit B linked to fluorescein (Sigma), which binds with high affinity to GM1 (Orlandi *et al.*, 1993). The same protocol of fixation without permeabilization using 4% PFA for 15 min was used in all cases. To visualize the amount of SM specifically on plasma membrane DRMs, living cells were extracted in 1% Triton X-100 on ice for 5 min (Ledesma *et al.*, 1998) after treatment with lyserin-MBP. Then cells were fixed and incubated with anti MBP polyclonal antibody and anti-rabbit rhodamine.

For the analysis of the polarized distribution of molecules double-labeling immunofluorescences were performed using cholera toxin subunit B fluorescein-linked or monoclonal antibodies against PrP<sup>C</sup>, APP, or transferrin receptor (TfRc) in combination with the polyclonal antibody against MAP2. Cells were fixed as indicated above in 4% PFA and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 3 min in order to detect MAP2. Fluorescein-conjugated anti-mouse and rhodamine-conjugated anti-rabbit antibodies (Alexa, Molecular Probes, Eugene, OR) were used as secondary antibodies. For quantitation, areas were chosen randomly in each neurite. The phase-contrast images and the MAP2 staining were analyzed to unequivocally identify the areas as dendritic or axonal. Pixel intensity of the GM1, PrP<sup>C</sup>, APP, or TfRc labeling in these areas was measured with the ImageJ. The mean intensity was calculated per area unit. Data are given as the average percentage obtained for the axons



**Figure 2.** Aberrant distribution of GM1 and PrP<sup>C</sup> in ASMKO neurons *in vitro* and *in vivo*. (A) Phase-contrast/DIC images and double fluorescence images (merge) of representative examples of mature wt and ASMKO neurons incubated with anti PrP<sup>C</sup>, cholera toxin subunit B to label GM1, anti APP, or anti TfRc (green labeling). In all cases neurons were also incubated with anti MAP2 (red) to label the dendrites. The axons (MAP2 negative) are indicated by arrows. (B) Immunohistochemical analysis using antibodies against PrP<sup>C</sup> (red) and MAP2 (green) of hippocampal slices from wt and ASMKO mice brains. The dendrites (MAP2 positive) are indicated by arrowheads.



**Figure 3.** SM accumulation promotes the unpolarized distribution of GM1 and PrP<sup>C</sup>. (Aa) TLC analysis of SM, cholesterol, and ceramide levels in wt neurons treated or not with exogenous SM. Graphs show quantitative data from three independent cultures as percentage over wt values considered as 100% (\*\*\*)  $p < 0.001$ . (Ab) Fluorescence image of nonpermeabilized wt neurons treated or not with exogenous SM and incubated with Lysenin-MBP to visualize cell surface SM. (B) Representative images of double immunofluorescence analysis for GM1 (a) or PrP<sup>C</sup> (b) and MAP2 in wt neurons treated or not with exogenous SM. Numbered squares are magnified on the right to better show the axonal (MAP2 negative) distribution of the molecules in the nontreated neurons in contrast to their appearance in dendrites (MAP2 positive) in the treated neurons.

(MAP2 negative) versus dendrites (MAP2 positive). Seventy to 80 dendrites and 50–60 axons were analyzed for each experimental condition. All samples were analyzed in a Leica fluorescence microscope (Deerfield, IL).

**In Situ Immunostaining**

Brains from wt and ASMKO mice were fixed by transcardiac perfusion with 4% PFA followed by cryoprotection in 30% sucrose. Fifteen-micrometer cryostat sections were obtained, washed in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min, and then incubated in blocking solution (2% fetal calf serum, 2% bovine serum albumin, 0.2% fish skin gelatin solution in PBS) and 0.5% Triton X-100 for 30 min. Incubation with primary antibodies at 4°C overnight was followed by washings in PBS and incubation with fluorescein- and rhodamine-conjugated secondary antibodies for 1 h at RT. Samples were analyzed in a Leica fluorescence microscope.

**GPI-GFP Expression and Trafficking**

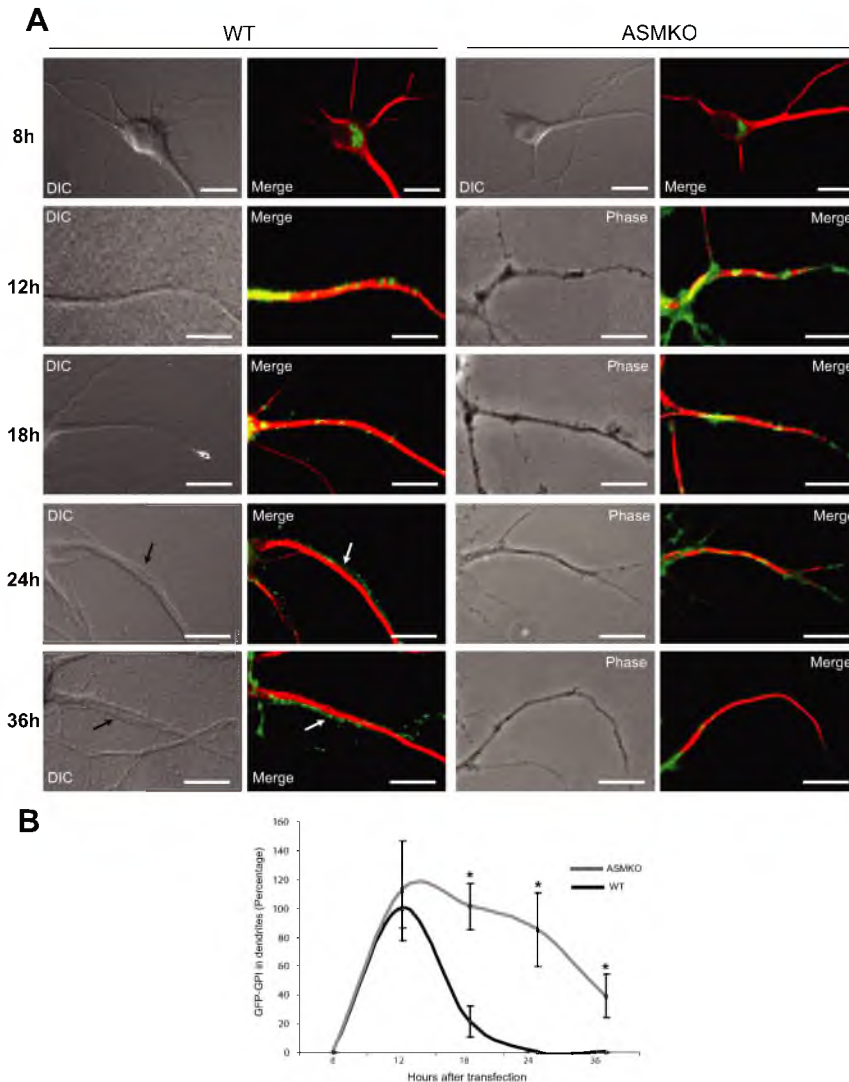
Cultured mature hippocampal neurons (more than 8 d in vitro) from wt and ASMKO mice were transfected with the GFP-GPI plasmid DNA using calcium phosphate, as described in Köhrmann *et al.* (1999). The cells were fixed in 4% PFA at different time points after transfection and were incubated with the antibody against MAP2 to determine the polarized distribution of the GFP-GPI. Samples were examined in a Leica fluorescence microscope. The phase-contrast images and the MAP2 staining were analyzed to unequivocally identify the areas as dendritic or axonal. For quantitation the mean pixel intensity of the GFP-GPI labeling in the proximal segment of dendrites (maximum 20 μm away from the cell body) and in the axons was measured per area unit with ImageJ. Thirty different neurons from two independent experiments were analyzed in each condition.

**Internalization Assays**

Living neurons were incubated for 10 min with cholera toxin subunit B fluorescein-linked, styryl dye FM 4-64 (Molecular Probes, T3166) or the mAb against PrP<sup>C</sup>. Cells were then extensively washed, fixed with 4% PFA, and permeabilized with 0.1% Triton X-100. After blocking anti-mouse secondary antibodies rhodamine- or fluorescein-linked (Alexa) were used to label the anti PrP<sup>C</sup> antibody. Samples were analyzed in a confocal scanning microscope (LSM 510 on an Axiovert 100M platform). Fifteen different neurons from three independent experiments were analyzed in each condition. To evaluate the internalization the following parameters were quantified for FM 4-64, PrP<sup>C</sup> and GM1: number of clusters, total fluorescence associated to all clusters, fluorescence, and size of each cluster. The measurements were performed using the ImageJ software and are given per area unit in the cell body (excluding the clusters at the periphery, as determined in the phase-contrast image, which were considered cell surface staining). Data represent the average numbers from all the intracellular stacks (at least 4) analyzed in each cell.

**RhoA and Cdc42 Activity Assays**

The EZ-Detect Rho Activation Kit (Pierce, Rockford, IL) was used to determine the affinity of RhoA to its downstream effector Rhotekin and thus its activity. The EZ-Detect Cdc42 Activation Kit (Pierce) was used to determine the binding of cdc42 to the p21-binding domain (PBD) of p21-activated kinase 1 (Pak1), which only occurs when Cdc42 is active. Fresh brain homogenates from age-matched wt and ASMKO mice containing 500 μg of protein were processed, in parallel, following the manufacturer’s instructions.



**Figure 4.** Normal exocytosis but delayed endocytosis of the GPI-moiety occur in ASMKO neurons. (A) Phase-contrast/DIC and merged fluorescence (red, MAP2; green, GFP-GPI) images of representative examples of the cell body and/or initial segment of dendrites from wt and ASMKO neurons at 8, 12, 18, 24, and 36 h after transfection with the GPI-GFP construct. Arrows indicate axons that run in parallel to dendrites. Bars, 10 μm. (B) Graph shows the mean values and SD of the GPI-GFP associated fluorescence/area unit in the initial segment of dendrites from wt and ASMKO transfected neurons. Data correspond to the analysis of 20 cells from each of two independent cultures (\*p < 0.05).

### RhoA Overexpression

ASMKO neurons were transfected at day 8 in vitro with the active form of RhoA (L63) cloned into the BamHI-EcoRI site of the pmRFPC1 vector using the Effectene kit (Qiagen, Santa Clarita, CA). At 15 h after transfection living neurons were incubated for 10 min with the mAb against PrP<sup>C</sup>. Transfected neurons were identified by the red fluorescence signal from the red fluorescence protein (RFP) encoded by the vector. Levels of PrP<sup>C</sup> internalization were compared in transfected and nontransfected neurons by confocal scanning microscope as described above.

### Statistical Analyses

The Student's *t* test was used to analyze the data.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### The Plasma Membrane of ASMKO Neurons Presents High Levels of SM in DRMs

To determine to which extent ASM deficiency affects the lipidic composition of neuronal DRMs we quantified the levels of SM, cholesterol, and GM1 in DRMs from ASMKO and wt mice brains. To discriminate between the contribution of lysosomal membranes, which are expected to have increased SM in ASMKO conditions, and the rest of cellular membranes, we set a protocol in which these organelles remain in the initial fractions while they were absent from the others (see *Materials and Methods* and Figure 1Aa). This experimental approach revealed that although the lysosomal-enriched ASMKO membranes indeed contained 6.1-fold more SM than the wt nonlysosomal membranes also presented a significant, 4.8-fold, SM increase in ASMKO conditions (Figure 1Ab). It is important to note that the amount of other lipids (i.e., triglycerides, phospholipids, gangliosides, cholesterol, cholesteryl esters, and ceramide) analyzed by TLC and a series of analytical/biochemical assays (see *Materials and Methods*) was similar in lysosomal and nonlysosomal membranes and in total brain extracts from wt and ASMKO mice, except for a slight decrease and increase of phosphatidylserine and ceramide, respectively, in ASMKO conditions (Supplementary Figure A). On the other hand, analysis of less abundant lipids (see *Materials and Methods*) revealed that not only the levels of SM were drastically increased in ASMKO brains but also those of its N-deacylated derivative (sphingosylphosphorylcholine) and of sphingosine (Supplementary Figure A). To analyze whether the rise in SM found in ASMKO intact membranes affected DRMs, the nonlysosomal membranes were extracted in Triton X-100 at 4°C followed by sucrose gradient centrifugation. DRMs were obtained in fractions 4 and 5 of the gradients according to the accumulation of the DRM-enriched proteins flotillin1 and PrP<sup>C</sup> (see Supplementary Figure B). TLC and slot-blot analyses of these fractions revealed similar levels of cholesterol and slightly higher amounts of GM1 ( $116 \pm 20$  and  $127 \pm 3.1\%$ , respectively) in ASMKO membranes with respect to wt membrane values (considered as 100%; Figure 1Ba). In contrast, a strong, 4.1-fold, increase in SM was found in DRMs from ASMKO mice brains (Figure 1Ba).

To assess to which extent the SM increase in whole brain membrane reflects that of neuronal membranes, these were obtained from mature hippocampal neurons grown in primary culture from wt and ASMKO mice. These cultures contain <5% of glial contamination (Goslin and Banker, 1991). Lipidic measurement performed as above revealed that the DRM fractions of ASMKO-derived hippocampal neurons present similar levels of cholesterol and GM1 ( $95.5 \pm 12$  and  $90 \pm 3.3\%$ , respectively, with wt values

considered as 100%) yet significantly high SM levels ( $460 \pm 50\%$ ; Figure 1 Bb).

DRMs are formed in the Golgi apparatus, where SM is obtained from both de novo synthesis and from ceramide recycled from lysosomes due to the action of ASM on SM. To test whether ASM deficiency affects DRM formation in the Golgi apparatus, we measured the levels of cholesterol, SM, and GM1 in DRMs derived from Golgi-enriched membrane fractions of wt and ASMKO mice brains (obtained as described in Figure 1Aa). TLC/slot-blot analysis revealed that cholesterol, GM1, and SM are at similar levels in both conditions ( $87 \pm 11$ ,  $101 \pm 4.2$ , and  $108 \pm 7.2\%$ , respectively, in ASMKO with respect to wt brains; Figure 1Bc). DRM alteration in nonlysosomal total membranes but not in Golgi-derived membranes was also supported by the DRM protein profile obtained in sucrose gradients after cold detergent extraction. Thus, although flotillin1 and PrP<sup>C</sup> are predominantly found in fraction 5 in wt mice total membranes (6.6- and 4.8-fold more than in fraction 4, respectively), they are enriched in the lighter fraction 4 in ASMKO membranes (1.7- and 1.9-fold more than in fraction 5, respectively; Supplementary Figure B). In contrast, no density shift was evident for these proteins when DRMs from Golgi-derived membranes were analyzed, appearing similarly enriched in fraction 5 in both wt and ASMKO conditions (Supplementary Figure B).

Given that a small pool of ASM had been described at the plasma membrane (Grassme *et al.*, 2001), we hypothesized that this cellular site could contribute to the SM increase observed in nonlysosomal/non-Golgi membranes. To test this directly, we visualized cell surface lipid levels by adding to nonpermeabilized neurons, specific fluorochrome-conjugated, lipid-binding probes: lysenin-MBP for SM, filipin for cholesterol, and cholera toxin subunit B for GM1. In agreement with SM accumulation in the plasma membrane, the staining for SM was 3.8-fold higher in ASMKO-derived hippocampal neurons compared with wt neurons, whereas cholesterol and GM1 staining appeared at similar levels ( $106 \pm 24$  and  $105 \pm 37\%$ , respectively; Figure 1C). Furthermore, addition of cold Triton X-100 to ASMKO neurons (Ledesma *et al.*, 1998) labeled with lysenin-MBP resulted in the retention of a much stronger SM labeling than in wt, confirming the elevated content of this lipid in cell surface DRMs of ASMKO neurons ( $398 \pm 22\%$  with respect to wt; Figure 1D). Altogether, the data obtained by microscopy and biochemical means confirm that the lack of ASM activity produces a dramatic increase in SM on plasma membrane-derived DRMs of neurons.

### Aberrant Distribution of DRM-enriched Molecules in ASMKO Neurons

Accepting the notion that DRMs are required for the proper sorting of certain types of proteins of the neuronal surface such as those that are GPI-anchored (Ledesma *et al.*, 1998; Galvan *et al.*, 2005), the above results would be consistent with alterations in their spatial distribution. To test this, we determined the localization of DRM (GPI-anchored PrP<sup>C</sup> and GM1) and non-DRM (TfRc and APP) constituents. In wt mice-derived, fully mature, hippocampal neurons in culture  $90 \pm 5.5\%$  of PrP<sup>C</sup> was found on the axonal domain as revealed by surface immunofluorescence microscopy (Figure 2A). Similar axonal enrichment ( $95 \pm 6\%$ ) was observed for GM1 (Figure 2A). In contrast, in ASMKO neurons PrP<sup>C</sup> and GM1 were also found in the dendritic surface ( $45 \pm 18$  and  $51 \pm 4\%$ , respectively; Figure 2A). To rule out that morphological alterations could account for the changes in molecular distribution, the overall morphology, number,

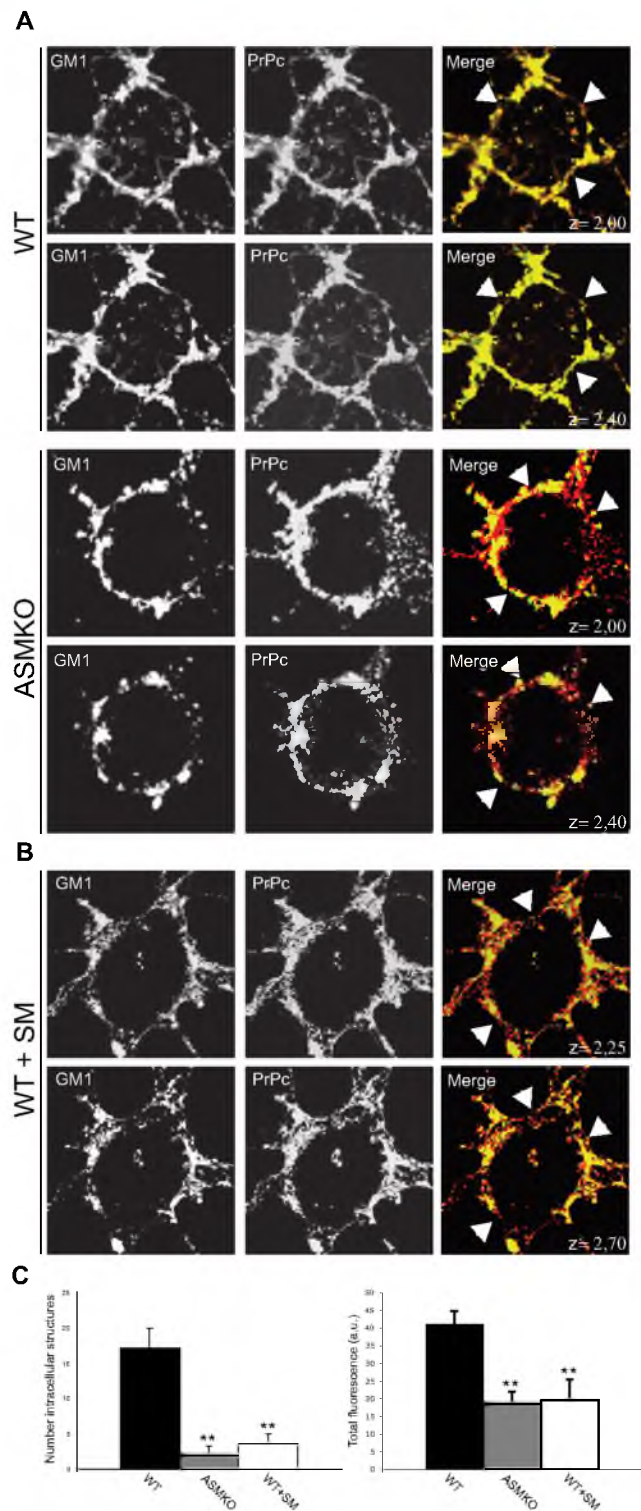


thickness, and length of neurites were compared in ASMKO and wt neurons (see Supplementary Figure C for quantitative data), and no major differences were found. Importantly, the perturbation in the distribution of PrP<sup>C</sup> observed in cultured neurons was also evident in situ in sections of ASMKO mice brains (Figure 2B). On the other hand, the non-DRM proteins APP and TfRc, which in cultured hippocampal neurons are markers for axons (Yamazaki *et al.*, 1995) and dendrites (West *et al.*, 1997), respectively, presented a similar axonal or dendritic enrichment, respectively, in wt and ASMKO neurons (Figure 2A). This last result further supports that DRMs are more affected by the lack of ASM activity than more fluid membranes occupied by APP or TfRc. This is consistent with the fact that the vast majority of SM is present in DRMs in mature neurons (Galvan *et al.*, 2005) and that the pool of ASM at the plasma membrane has been described in these kind of membranes (Grassme *et al.*, 2001).

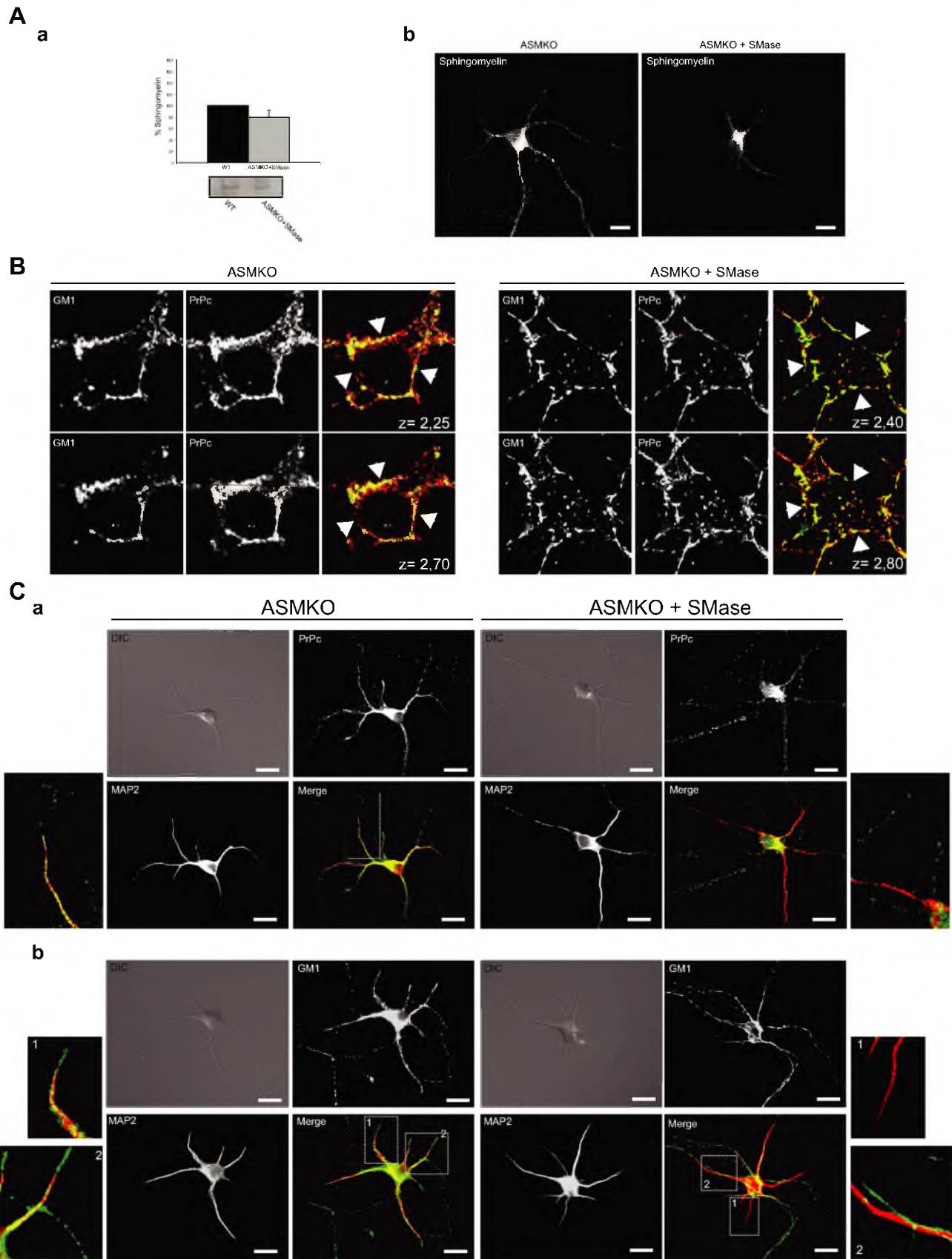
To test if the abnormal distribution of PrP<sup>C</sup> and GM1 in the ASMKO neurons is the direct consequence of the excess of SM, this lipid was experimentally augmented in hippocampal neurons from wt mice through the addition of purified SM (see *Materials and Methods*). Incubation with 40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  exogenous SM in the presence of phosphate ion, an inhibitor of ASM (Testai *et al.*, 2004), for 48 h resulted in 5.9-fold increase in plasma membrane SM without a noticeable effect in cholesterol and a slight increase (1.2-fold) in ceramide content (Figure 3Ab). In our experimental conditions a slight increase in the SM-derivative sphingosine (0.22 and 0.32 pmol/nmol PC in nontreated and treated wt neurons, respectively) but not in sphingosylphosphorylcholine (0.071 and 0.073 pmol/nmol PC in nontreated and treated neurons, respectively) were also detected (see *Materials and Methods*). Noteworthy, the increase produced in SM is similar to that observed in ASMKO-derived neurons (see Figure 1 and Supplementary Figure A). Immunofluorescence microscopy evidenced that the treatment resulted in abnormally high PrP<sup>C</sup> and GM1 amounts on the dendritic surface ( $46.5 \pm 2.7\%$  of PrP<sup>C</sup> and  $51 \pm 5\%$  of GM1 appear in dendrites; Figure 3B, a and b). Because the exogenous SM did not perturb neither cell viability ( $2.9 \pm 1.1$  and  $3.1 \pm 0.9\%$  of apoptotic cells in treated and nontreated cultures, respectively) nor the normal morphology of axons and dendrites (see Figure 3 and Supplementary Figure C) this last series of results suggest that altered spatial distribution of DRM-enriched molecules in ASMKO neurons is a direct consequence of high SM levels.

#### Exocytic Trafficking of the GPI Moiety Is Not Affected in ASMKO Neurons

Two types of mechanisms have been described for the polarized distribution of axonal membrane proteins in neurons: selective delivery and selective retention (Sampo *et al.*, 2003). In the former the molecules are transported exclusively to the axonal domain, whereas in the latter the proteins are delivered to both axons and dendrites but appear only in the axonal membrane because of rapid endocytosis from the dendritic surface. To determine which of these are defective in the neurons lacking ASM, the distribution of newly synthesized GPI moieties was compared in wt and ASMKO hippocampal neurons by expressing a GFP-tagged GPI cDNA (Figure 4). This construct was chosen because it emulates the intracellular trafficking of endogenous GPI-anchored proteins (Keller *et al.*, 2001). At a short posttransfection time, 8 h, a similar level of GFP signal was detected in tubular structures restricted to the cell body in wt and ASMKO neurons. By 12 h after transfection, both wt and



**Figure 5.** Endocytosis of GM1 and PrP<sup>C</sup> is reduced upon SM accumulation. (A and B) Representative confocal images of the cell body of wt neurons treated (B) or not (A) with SM and nontreated ASMKO neurons (A) after 10-min internalization of the cholera toxin subunit B that labels GM1 (green in merge image) and the PrP<sup>C</sup> antibody (red in merge image). Z values indicate in  $\mu\text{m}$  the depth of the stack in each image. Arrowheads designate the surface of the cell body. (C) Graphs show quantitative analysis of 15 neurons from each of three independent cultures per condition. Data are expressed as mean value and SD of the number of intracellular structures positive for GM1 and PrP<sup>C</sup> per cell body area or as total fluorescence in arbitrary units (\*\* $p < 0.005$ ).



**Figure 6.** Enhancement of SMA activity re-establishes the normal polarized distribution and internalization of GM1 and PrP<sup>C</sup>. (Aa) TLC analysis of SM levels in nontreated wt neurons and ASMKO neurons treated with Smase. Graphs show quantitative data from three independent cultures as percentage over wt values considered as 100%. (Ab) Fluorescence image of nonpermeabilized ASMKO neurons

ASMKO neurons presented intense GFP labeling in the axon, with some GFP signal also evident in dendrites, especially in the initial segment, at a similar extent ( $1.1 \pm 0.3$ -fold higher in ASMKO with respect to wt; Figure 4). Because endogenous GPI-anchored proteins such as PrP<sup>C</sup> are largely confined to the axonal domain (Galvan *et al.*, 2005), the above results suggest that the unpolarized distribution observed in ASMKO neurons may be due to defective endocytosis from dendrites. In support of this we found higher GFP-GPI labeling intensity in the dendrites of transfected ASMKO neurons than in wt at longer times after transfection: 4.7-fold at 18 h and 23-fold at 24 h (Figure 4).

#### ASMKO Neurons Present Reduced PrP<sup>C</sup> and GM1 Internalization

To directly test if ASM deficiency leads to impaired endocytosis of GPI-anchored proteins, wt and ASMKO hippocampal neurons were incubated with the anti PrP<sup>C</sup> mAb followed by chase periods of various lengths of time, to monitor the internalization rate of this protein. Neurons were simultaneously incubated with fluorescein-linked cholera toxin subunit B to follow GM1 internalization as well (Orlandi and Fishman, 1998; Puri *et al.*, 2001). Confocal microscope analysis of wt neurons revealed efficient internalization of both types of probes and their high degree of colocalization within intracellular structures in the cell body (Figure 5, A and C). When the number of intracellular structures positive for PrP<sup>C</sup> and GM1 was analyzed in ASMKO neurons incubated and chased for the same lengths of time as wt neurons, a strong reduction was observed ( $17 \pm 2.9$  and  $2 \pm 1.2$  intracellular structures in wt and ASMKO neurons, respectively). The endocytosed material was further analyzed by monitoring the size, the fluorescence associated with each structure, and the fluorescence associated with all intracellular structures per cell as an indication of the total endocytosed material. Although the individual intensity of the structures was similar ( $1.5 \pm 0.7$  and  $1.7 \pm 0.2$  a.u. in wt and ASMKO neurons, respectively), a tendency to have bigger size was detected in ASMKO neurons compared with wt ( $22 \pm 10$  vs.  $13 \pm 4$  a.u.). Still, and in agreement with the lower number of structures, the total fluorescence associated was clearly reduced in ASMKO conditions ( $41.1 \pm 3.7$  and  $18.5 \pm 3.4$  a.u. in wt and ASMKO neurons, respectively; Figure 5C). This inefficient internalization rate was however not detected for non-DRM constituents. In fact, the endocytic rate of the fluid-phase lipid probe FM4-46 was not different in wt and ASMKO neurons ( $25 \pm 2.6$  and  $23.7 \pm 5.7$  intracellular structures and  $118.8 \pm 13$  and  $121.1 \pm 7.7$  a.u. total fluorescent intensity in wt and ASMKO neurons, respectively; Supplementary Figure D).

To assess if defective endocytosis of DRM components is the consequence of SM excess the internalization of PrP<sup>C</sup>

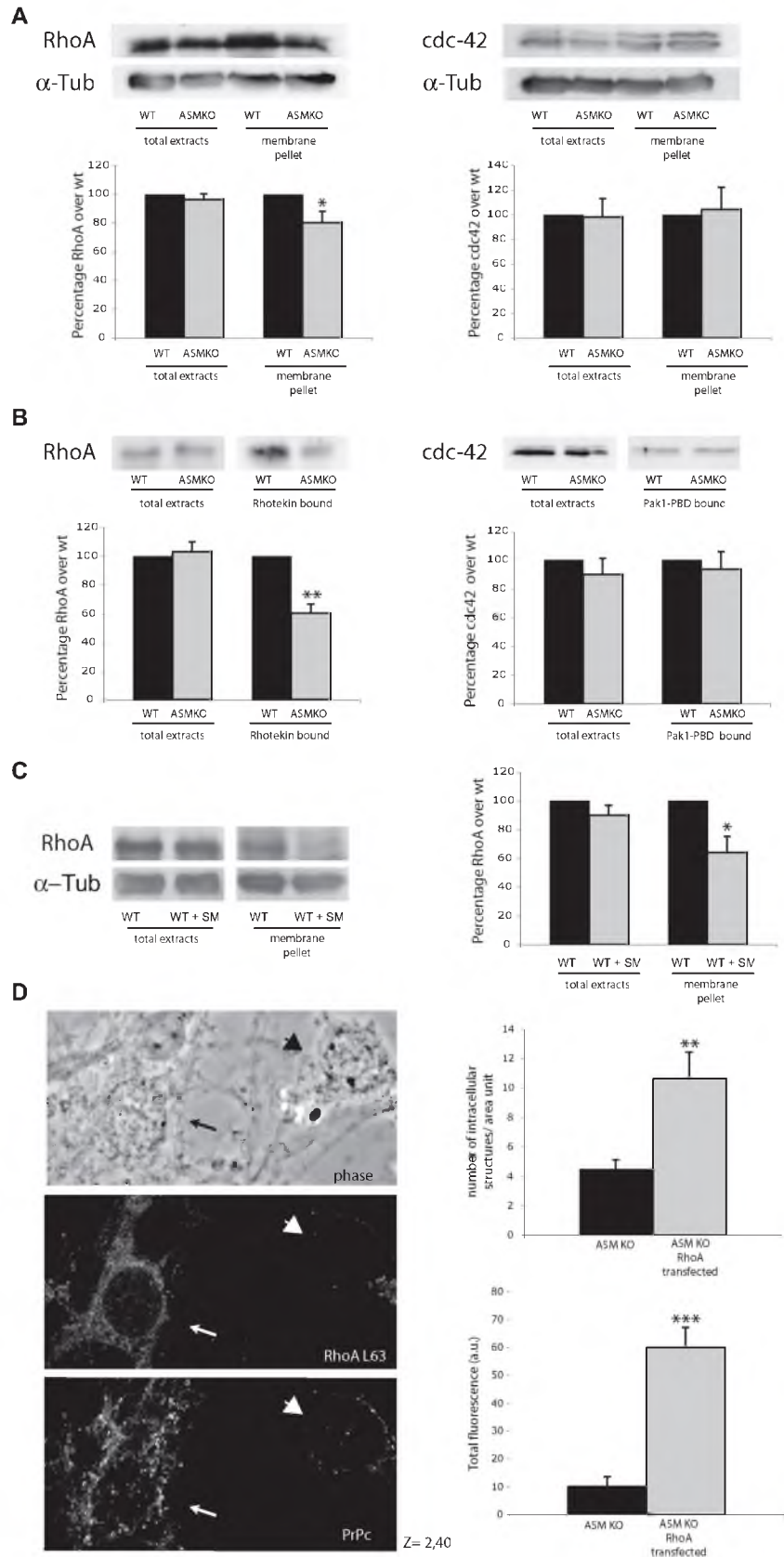
and GM1 was measured in wt neurons with experimentally increased SM (see above and *Materials and Methods*). In these conditions the efficiency of internalization was drastically reduced ( $3.6 \pm 1.3$  positive intracellular structures compared with  $17 \pm 2.9$  in nontreated cells; Figure 5, B and C). Similar to the situation in the ASMKO neurons, the fluorescence intensity of each structure was not significantly altered ( $1.5 \pm 0.5$  in wt;  $1.7 \pm 0.2$  in ASMKO), but the average size was slightly bigger in SM-treated neurons ( $21 \pm 5$  and  $13 \pm 4$  a.u. in treated and nontreated neurons, respectively). The total fluorescence in such conditions was clearly reduced ( $42.1 \pm 2.3$  and  $19.6 \pm 5.7$  in nontreated and treated neurons, respectively).

To further prove the involvement of high SM levels in defective endocytosis, ASMKO-derived neurons were treated with Smase. This treatment resulted in the reduction of plasma membrane SM in the ASMKO neurons to levels similar to that of wt neurons (Figure 6A, a and b). Although the levels of ceramide were increased (70 and 20 pmol/nmol PC in treated and nontreated neurons, respectively), this did not result in diminished cell viability ( $2.7 \pm 0.6$  and  $2.3 \pm 1.5\%$  of apoptotic cells in treated and nontreated neurons, respectively). The morphology of the treated neurons was not significantly affected either (Supplementary Figure C). However, Smase addition led to an improvement of PrP<sup>C</sup> and GM1 internalization in the ASMKO neurons that showed rates similar to those of wt neurons ( $15.6 \pm 3.2$ ,  $17 \pm 2.9$ , and  $2 \pm 1.2$  intracellular structures and  $45.5 \pm 11$ ,  $42.8 \pm 5$ , and  $16 \pm 2.1$  total fluorescence intensity in ASMKO neurons treated with Smase, wt neurons, and nontreated ASMKO neurons, respectively; Figure 6B). Notably, Smase addition also had an effect on the distribution of PrP<sup>C</sup> and GM1. Thus, Smase-treated ASMKO neurons presented a striking axonal enrichment of PrP<sup>C</sup> and GM1, comparable to that of untreated wt neurons ( $87 \pm 4.7\%$  of PrP<sup>C</sup> and  $91.8 \pm 7\%$  of GM1 is in axons of ASMKO neurons treated with Smase; Figure 6C, a and b; compare with Figure 2).

#### High SM Impairs PrP<sup>C</sup> Internalization via RhoA Inactivation

Very recent evidence has shown the requirement of SM for the targeting to the plasma membrane and thus activation of the small GTPases RhoA and cdc42 in fibroblasts (Cheng *et al.*, 2006). In turn, these GTPases have been reported to drive clathrin-independent mechanisms for the internalization of GPI-anchored proteins in nonneuronal cells (Sabharanjak *et al.*, 2002). To gain insight into the molecular alterations that impair endocytosis in ASMKO neurons, we analyzed the levels of membrane attachment of these GTPases in wt and ASMKO conditions. A moderate, still significant, reduction ( $20 \pm 8\%$ ) of membrane-bound RhoA was found in ASMKO-derived membranes, whereas the amount of bound cdc42 was not different from wt membranes (Figure 7A). Total levels of these two proteins were not altered. To confirm that diminished RhoA membrane attachment reflected less activity of the protein a Rhotekin binding assay, which detects specifically the active GTP-bound state of RhoA, was performed (see *Materials and Methods*). In agreement with an impaired activation the amount of RhoA with affinity for its downstream effector, Rhotekin was  $39.8 \pm 6\%$  less in ASMKO brains than in wt (Figure 7B). In contrast and consistent with the normal membrane attachment observed for cdc42, the activity of this GTPase was similar in wt and ASMKO brains (Figure 7B). To determine if SM accumulation is responsible for the reduction of RhoA membrane attachment, exogenous SM was added to wt neurons. In such conditions  $36 \pm 11\%$  less RhoA was membrane bound

**Figure 6 (cont).** treated or not with Smase and incubated with Lysenin-MBP to visualize cell surface SM. (B) Representative confocal images of the cell body of ASMKO neurons treated or not with Smase after 10-min internalization of PrP<sup>C</sup> antibody (red in merge image) or cholera toxin subunit B that labels GM1 (green in merge image). Z values indicate in  $\mu\text{m}$  the depth of the stack in each image. Arrowheads designate the surface of the cell body. (C) Representative images of the double-immunofluorescence analysis for PrP<sup>C</sup> (a) or GM1 (b) and anti-MAP2 of ASMKO neurons treated or not with Smase. Numbered squares are magnified to better show the re-establishment of PrP<sup>C</sup> and GM1 axonal distribution (MAP2 negative processes) in the treated neurons, in contrast to the ASMKO nontreated neurons where these molecules colocalize in dendrites with MAP2. Bars, 10  $\mu\text{m}$  in all panels.



**Figure 7.** RhoA membrane targeting and activation is impaired in ASMKO neurons, and its overexpression restores PrP<sup>C</sup> internalization. (A) Western blot of the total extracts and membrane pellets from wt and ASMKO mice brains using antibodies against RhoA, cdc42, and tubulin. Graphs show mean values from three independent experiments of RhoA or cdc42 levels normalized to the amount of tubulin expressed as percentage over wt values (\*p < 0.05). (B) Western blot of the total extracts, the Rhotekin-bound or the Pak1-PBD bound samples from wt and ASMKO mice brains using the antibody against RhoA or cdc42, respectively. Graphs show mean values from three independent experiments of the levels of RhoA or cdc42 in total extracts and of the amount of Rhotekin-bound RhoA or Pak1-PBD bound cdc42 normalized to the amount of RhoA or cdc42, respectively, in the total extracts. Data are expressed as percentage over the wt values (\*\*p < 0.005). (C) Western blot of the total extract and membrane pellets from cultured neurons treated or not with SM using antibodies against RhoA and tubulin. Graph shows mean values from three independent experiments of RhoA levels normalized to the amount of tubulin expressed as percentage over wt values (\*p < 0.05). (D) Representative confocal image of ASMKO neurons transfected (arrow) or not (arrowhead) with the RhoA active form (L63) after 10-min internalization of PrP<sup>C</sup> antibody. Z value indicates in  $\mu\text{m}$  the depth of the stack shown. Graphs show quantitative analysis of 15 transfected and 15 nontransfected neurons from each of three independent cultures. Data are expressed as mean value and SD of the number of PrP<sup>C</sup> positive intracellular structures per cell body area unit or as total fluorescence intensity in arbitrary units (\*\*p < 0.005; \*\*\*p < 0.001).

compared with nontreated neurons (Figure 7C). Finally, to test whether membrane-bound RhoA reduction and thus

deficient RhoA activation leads to the impaired endocytosis observed in ASMKO neurons, these were transfected with a

constitutively active form of RhoA. In such conditions the levels of PrP<sup>C</sup> internalization was clearly enhanced ( $10.6 \pm 1.8$  and  $4.5 \pm 0.6$  intracellular structures/60  $\pm 7$  and  $10 \pm 3.5$  a.u. total fluorescence intensity, in transfected ASMKO neurons and in nontransfected ASMKO neurons, respectively; Figure 7D).

## DISCUSSION

A main discovery of this work, based on three different experimental approaches: biochemical lipid quantification, fluorescence microscopy, and protein flotation profile, is that the hippocampal neurons from ASMKO mice have an excess of SM in plasma membrane-derived DRMs. Although ASM is mainly a lysosomal enzyme this novel finding is in agreement with the reported presence of a small pool of ASM in DRMs at the cell surface (Liu *et al.*, 1995; Grassme *et al.*, 2001). The observation that the SM increase in lysosomal and nonlysosomal membranes is in a similar range suggests that nonlysosomal alterations could be of relevance in NPA pathology. A second important finding is that in ASMKO neurons the PrP<sup>C</sup> protein and the glycolipid GM1, which are highly enriched in DRMs, are not restricted to the axonal surface but abnormally enriched in the dendrites, most likely because of their deficient endocytosis from this domain after initial delivery from the Golgi apparatus. In support of this conclusion we observed that 1) ASMKO neurons present defective spatial distribution and internalization of PrP<sup>C</sup> and GM1; 2) reduction of the excess SM in the ASMKO neurons, through the addition of SMase, restored the internalization rate and the axonal polarization of these molecules; and 3) SM increase in wt neurons produced their missorting and deficient internalization. The fact that aberrant distribution and high SM levels were also evident in ASMKO neurons *in situ*, strongly suggest that similar alterations might also exist in the neurons of NPA patients. The observation that the lack of ASM activity leads to impaired endocytosis and misdistribution of GPI-anchored proteins such as PrP<sup>C</sup>, raises the question of which other neuronal functions are affected. We envision that these cells could have survival and differentiation defects. This appears a logical assumption considering that several neurotrophic factor receptors are GPI-anchored proteins (Saarma, 2000). The results here presented pave the way to analyze this possibility.

Our work provides with novel information on how GPI-anchored proteins acquire polarization in neurons. This is a controversial issue in epithelial cells where two opposite views have been raised to explain the apical distribution of GPI-anchored proteins. Either transcytosis from the basolateral to the apical domain (Polishchuk *et al.*, 2004) or direct delivery to the apical surface (Paladino *et al.*, 2006) have been proposed. Our results, showing GPI-GFP in axons and dendrites of fully polarized primary hippocampal neurons at short times after transfection but its exclusive presence in the axons at longer times, support an indirect mechanism based in the selective axonal retention rather than in selective delivery. In such mechanism rapid endocytosis of GPI-anchored proteins from dendrites becomes an essential step to achieve axonal polarization, as has been shown for proteins such as VAMP2 (Sampo and Banker, 2003). In agreement, we show that reestablishment of normal internalization rates in ASMKO neurons restores the axonal distribution of the GPI-anchored protein PrP<sup>C</sup>.

The relevance of lipids in the regulation of endocytic trafficking has been only recently discovered in a series of studies performed in fibroblasts. Pioneer work demon-

strated that cholesterol levels regulate the endocytosis of sphingolipids (Puri *et al.*, 1999) and late endosome motility (Lebrand *et al.*, 2002). Moreover, elevated endosomal cholesterol levels in NPA fibroblasts inhibit Rab4 function, leading to altered LacCer and transferrin recycling (Choudhury *et al.*, 2004). On the other hand, addition of cholesterol and glycosphingolipids, but not that of ceramide or phosphatidylcholine, specifically stimulates caveolar endocytosis (Sharma *et al.*, 2004). By contrast, endosome motility is not affected in Tay Sachs disease (Lebrand *et al.*, 2002), a storage disorder where ganglioside turnover is altered (Futerman and van Meer, 2004). Our data highlight the importance of SM in the regulation of endocytosis in neurons. Interestingly, accumulation of SM at the plasma membrane has an effect opposite of that described for cholesterol and glycosphingolipids (Sharma *et al.*, 2004), leading to the impaired endocytosis of certain molecules instead of having a stimulatory effect. Taken together all the above argue in favor of different roles for specific lipids in the various steps of the internalization process that could also depend on the cell type. How different lipids affect the protein machinery involved in endocytosis is a relevant issue to address. Our work provides insights into the previously unexplored mechanism of endocytosis of GPI-anchored proteins in neuronal cells. In contrast to what happens in other cell types where GPI-APs are internalized in a cdc42-dependent but RhoA-independent pathway (Sabharanjak *et al.*, 2002), the latter seems to be crucial for PrP<sup>C</sup> endocytosis in primary neurons. We show that SM accumulation impairs the membrane targeting and activation of RhoA and that overexpression of a RhoA active form restores PrP<sup>C</sup> internalization rate in ASMKO neurons. Interestingly, impairment of RhoA membrane targeting is also induced by SM depletion in nonneuronal cells (Cheng *et al.*, 2006), suggesting that adequate levels of SM are crucial for the membrane targeting of RhoA and that both an excess or a deficiency of this lipid leads to RhoA inactivation and defects on endocytosis. Different from RhoA, we detect no alterations in the membrane attachment and activity of cdc42 upon SM accumulation. Nevertheless, further work is needed to determine the precise role of this GTPase in neuronal endocytosis.

It has been reported that changes in the levels and/or distribution of one lipid might affect such parameters in other lipids (Marks and Pagano, 2002). Thus, the accumulation of sphingolipids leads to alterations in the intracellular distribution of cholesterol in fibroblasts and macrophages of several storage diseases including NPA (Puri *et al.*, 1999; Leventhal *et al.*, 2001). It was speculated that cholesterol might be trapped within sphingolipid-laden compartments as a result of the affinity of the association between these lipids (Pagano *et al.*, 2000). However, our results show that the levels of cholesterol in the plasma membrane of NPA neurons from ASMKO mice are not higher despite the clear increase in SM. This was also the case when the levels of plasma membrane SM were elevated by exogenous addition of the lipid, suggesting that neurons react in a cell-specific manner to the accumulation of membrane SM. Alternatively, it is possible that neurons without ASM respond with a defective efflux of cholesterol from intracellular stores (i.e., lysosomes) to the plasma membrane, as has been shown in macrophages from patients with Niemann Pick type C disease (Leventhal *et al.*, 2001). This would compensate for the reduced endocytosis, resulting in normal steady-state levels of cholesterol at the plasma membrane of NPA neurons. On the other hand, the data revealing that in hippocampal neurons most of SM accumulates in membranes with the biochemical characteristics assigned to DRMs (Galvan *et al.*,

2005) and that the deleterious consequences observed in this work upon ASM deficiency (i.e., aberrant distribution and reduced internalization) seem to affect DRM-enriched molecules specifically suggest the involvement of a particular membrane microenvironment in the pathology of NPA. However, it is possible that the effects of SM accumulation are independent of its clustering in DRMs. We envision that changes in the thickness and fluidity of the plasma membrane due to SM increase could alter, per se, not only the retrieval of membrane but also the reception and transmission of signals across it. In this regard, it is important to highlight that ASM deficiency not only increases brain SM levels but also those of its metabolites like sphingosylphosphorylcholine, which have been shown to participate in signaling events regulating cellular responses such as differentiation, survival, or cytoskeletal rearrangements (Kostenis, 2004). Taken together all the above, further research appears essential to address how SM metabolism defects influence the trafficking and distribution of other lipids and the functional properties of membranes in neuronal cells.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Vanderhoeven for excellent technical assistance and Dr. C. G. Dotti (Leuven, Belgium) for constant support. We are grateful to Dr. E. H. Schuchman (New York, NY) for kindly providing us with ASMase<sup>±</sup> mice couples and to Drs. A. Aguzzi (Zurich, Switzerland), P. Keller (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology, Dresden, Germany), T. Kobayashi (Tokyo, Japan), and A. Jaffe (Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London, United Kingdom) for the gift of the anti PrP<sup>C</sup> antibody, the GPI-GFP construct, Lysenin-MBP, and the RhoA (LS63) clone, respectively. This work was supported by research grants from the National Niemann Pick Disease Foundation and Telethon-Italy (Grant GGP02245) to M.D.L. and from the "Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek-Vlaanderen; Project G.0405.02" to P.P.V.V.

## REFERENCES

Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Physiol.* *37*, 911–917.

Brady, R. Q., Kanfer, J. N., Mock, M. B., and Fredrickson, D. S. (1966). The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *55*, 366–369.

Cheng, Z. J., Singh, R. D., Sharma, D. K., Holicky, E. L., Hanada, K., Marks, D. L., and Pagano, R. E. (2006). Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3197–3210.

Choudhury, A., Sharma, D. K., Marks, D. L., and Pagano, R. E. (2004). Elevated endosomal cholesterol levels in Niemann-Pick cells inhibit rab4 and perturb membrane recycling. *Mol. Biol. Cell* *15*, 4500–4511.

Dotti, C. G., Sullivan, C. A., and Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* *4*, 1454–1468.

Douglass, A. D., and Vale, R. D. (2005). Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* *121*, 937–950.

Estus, S., Tucker, H. M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E. F., Wogulis, M., and Rydel, R. E. (1997). Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J. Neurosci.* *17*, 7736–7745.

Fath, K. R., and Burgess, D. R. (1993). Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein. *J. Cell Biol.* *120*, 117–127.

Futerman, A. H., and van Meer, G. (2004). Lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 554–565.

Galvan, C., Camoletto, P. G., Dotti, C. G., Aguzzi, A., and Ledesma, M. D. (2005). Proper axonal distribution of PrP<sup>C</sup> depends on cholesterol-sphingomyelin-enriched membrane domains and is developmentally regulated in hippocampal neurons. *Mol. Cell Neurosci.* *30*, 304–315.

Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2001). CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* *276*, 20589–20596.

Goslin, K., and Banker, G. (1991). Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: *Culturing Nerve Cells*, Goslin, K., and Banker, G. (eds.), Cambridge, MA: Massachusetts Institute of Technology.

Horinouchi, K., Erlich, S., Perl, D. P., Ferlinz, K., Bisgaier, C. L., Sandhoff, K., Desnick, R. J., Stewart, C. L., and Schuchman, E. H. (1995). Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat. Genet.* *10*, 288–293.

Keller, P., Toomre, D., White, J., and Simons, K. (2001). Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat. Cell Biol.* *3*, 140–149.

Kiyokawa, E., Makino, A., Ishii, K., Otsuka, N., Yamaji-Hasegawa, A., and Kobayashi, T. (2004). Recognition of sphingomyelin by lysenin and lysenin-related proteins. *Biochemistry* *43*, 9766–9773.

Köhrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C. G., and Kiebler, M. A. (1999). Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* *10*, 2945–2953.

Kostenis, E. (2004). Novel clusters of receptors for sphingosine-1-phosphate, sphingosylphosphorylcholine, and (lyso)-phosphatidic acid: new receptors for "old" ligands. *J. Cell Biochem.* *92*, 923–936.

Kuemmel, T. A., Schroeder, R., and Stoffel, W. (1997). Light and electron microscopic analysis of the central and peripheral nervous systems of acid sphingomyelinase-deficient mice resulting from gene targeting. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.* *56*, 171–179.

Lebrand, C., Corti, M., Goodson, H., Cosson, P., Cavalli, V., Mayran, N., Faure, J., and Gruenberg, J. (2002). Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *EMBO J.* *21*, 1289–1300.

Ledesma, M. D., Simons, K., and Dotti, C. G. (1998). Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 3966–3971.

Lester, R. L., Dickson, R. C. (2001). High-performance liquid chromatography analysis of molecular species of sphingolipid-related long chain bases and long chain base phosphates in *Saccharomyces cerevisiae* after derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Anal. Biochem.* *298*, 283–292.

Leventhal, A. R., Chen, W., Tall, A. R., and Tabas, I. (2001). Acid sphingomyelinase-deficient macrophages have defective cholesterol trafficking and efflux. *J. Biol. Chem.* *276*, 44976–44983.

Liu, P., and Anderson, R.G.W. (1995). Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J. Biol. Chem.* *270*, 27179–27185.

Marks, D. L., and Pagano, R. E. (2002). Endocytosis and sorting of glycosphingolipids in sphingolipids storage disease. *Trends Cell Biol.* *12*, 605–613.

Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* *115*, 377–388.

Orlandi, P. A., and Fishman, P. H. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell Biol.* *141*, 905–915.

Otterbach, B., and Stoffel, W. (1995). Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell* *81*, 1053–1061.

Pagano, R. E., Puri, V., Dominguez, M., and Marks, D. L. (2000). Membrane traffic in sphingolipid storage diseases. *Traffic* *1*, 807–815.

Paladino, S., Pocard, T., Catino, M. A., and Zurzolo, C. (2006). GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* *172*, 1023–1034.

Parton, R. G., and Richards, A. A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* *4*, 724–738.

Polishchuk, R., Di Pentima, A., and Lippincott-Schwartz, J. (2004). Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat. Cell Biol.* *6*, 297–307.

Puri, V., Watanabe, R., Dominguez, M., Sun, X., Wheatley, C. L., Marks, D. L., and Pagano, R. E. (1999). Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat. Cell Biol.* *1*, 386–388.

Puri, V., Watanabe, R., Singh, R. D., Dominguez, M., Brown, J. C., Wheatley, C. L., Marks, D. L., and Pagano, R. E. (2001). Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two golgi targeting pathways. *J. Cell Biol.* *154*, 535–547.

Puri, V., Jefferson, J. R., Singh, R. D., Wheatley, C. L., Marks, D. L., and Pagano, R. E. (2003). Sphingolipid storage induces accumulation of intracellular cholesterol by stimulating SREBP-1 cleavage. *J. Biol. Chem.* *278*, 20961–20970.

Sarma, M. (2000). GDNF—a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur. J. Biochem.* *267*, 6968–6971.

- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R. G., and Mayor, S. (2002). GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev. Cell* 2, 411–423.
- Sampo, B., Kaech, S., Kunz, S., and Banker, G. (2003). Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 37, 611–624.
- Sarna, J., Miranda, S. R., Schuchman, E. H., and Hawkes, R. (2001). Patterned cerebellar Purkinje cell death in a transgenic mouse model of Niemann Pick type A/B disease. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1873–1880.
- Sharma, D. K., Brown, J. C., Choudhury, A., Peterson, T. E., Holicky, E., Marks, D. L., Simari, R., Parton, R. G., and Pagano, R. E. (2004). Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol. Biol. Cell* 15, 3114–3122.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31–39.
- Stoffel, W. (1999). Functional analysis of acid and neutral sphingomyelinases in vitro and in vivo. *Chem. Phys. Lipids* 102, 107–121.
- Testai, F. D., Landek, M. A., Goswami, R., Ahmed, M., and Dawson, G. (2004). Acid sphingomyelinase and inhibition by phosphate ion: role of inhibition by phosphatidyl-myoinositol 3,4,5-triphosphate in oligodendrocyte cell signaling. *J. Neurochem.* 89, 636–644.
- Van Overloop, H., Gijbbers, S., Van Veldhoven, P. P. (2006). Further characterization of mammalian ceramide kinase: Substrate delivery and (stereo)specificity, tissue distribution and subcellular localization studies. *J. Lipid Res.* 47, 268–283.
- Van Veldhoven, P., and Bell, R. M. (1988). Effect of harvesting methods, growth conditions and growth phase on diacylglycerol levels in cultured human adherent cells. *Biochim. Biophys. Acta* 959, 185–196.
- Van Veldhoven, P. P., Swinnen, J. V., Esquet, M., and Verhoeven, G. (1997). Lipase-based quantitation of triacylglycerols in cellular lipid extracts: requirement for presence of detergent and prior separation by thin-layer chromatography. *Lipids* 32, 1297–1300.
- Van Veldhoven, P. P., Meyhi, E., and Mannaerts, G. P. (1998). Enzymatic quantitation of cholesterol esters in lipid extracts. *Anal. Biochem.* 258, 152–155.
- West, A. E., Neve, R. L., and Buckley, K. M. (1997). Identification of a somatodendritic targeting signal in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor. *J. Neurosci.* 17, 6038–6047.
- Yamazaki, T., Selkoe, D. J., and Koo, E. H. (1995). Trafficking of cell surface beta-amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J. Cell Biol.* 129, 431–442.