

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR




LAS GALECTINAS DE MAMÍFERO EN EL DESARROLLO DE LOS
AXONES *IN VITRO*

PAPEL DE LAS GALECTINAS 3 Y 4

TESIS DOCTORAL DE:
NATALIA DÍEZ REVUELTA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
JOSÉ ABAD RODRÍGUEZ

Madrid, 2013



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**Las galectinas de mamífero en el
desarrollo de los axones *in vitro*.
Papel de las galectinas 3 y 4.**

Natalia Díez Revuelta
Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**Las galectinas de mamífero en el desarrollo
de los axones *in vitro*.
Papel de las galectinas 3 y 4.**

**Memoria de investigación para optar al grado de doctor en
Bioquímica y Biología Molecular presentada por**

Natalia Díez Revuelta

Bajo la dirección del doctor
José Abad Rodríguez

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2013

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de biología de membrana y reparación axonal, a cargo del Doctor José Abad Rodríguez, en el Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo. Desde marzo del 2008 hasta junio del 2013. Ha sido financiado por una beca y posterior contrato a través del Programa para la incorporación de nuevos grupos de investigación por el Sistema Nacional de Salud, por medio de un acuerdo entre el Instituto de Salud Carlos III de Madrid y la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha (EMER07/026).



A mis padres

"Hay una grieta en todas las cosas, así es como la luz entra"

LEONARD COHEN.

"Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes"

SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL

Agradecimientos

Al echar la vista atrás para recordar y evaluar cada paso dado o cada decisión tomada, me ha resultado sorprendente comprobar la gran cantidad de personas que, de una u otra forma, han tenido un papel durante la elaboración de este trabajo. He podido comprobar que las cosas se extienden más allá de lo que concierne al hospital donde he pasado los últimos 5 años de mi vida, más allá de la gente que ha pasado por allí; mi historia con la investigación se remonta más allá de la primera vez que vi una pipeta, y son muchas las personas a las que me gustaría decir *gracias*. Pero para no extenderme demasiado, estas líneas van a estar dedicadas a aquellas personas a las cuales de verdad creo que les debo un especial agradecimiento.

En primer lugar, le doy las gracias a mi director de tesis, Pepe, por brindarme la oportunidad de “entrar en el juego” y conocer este mundo. Confiaste en mí, me diste tu apoyo, pusiste en mis manos los medios de los que disponías y me enseñaste que las principales herramientas de las que disponemos son la dedicación, la paciencia y la pasión por la ciencia. A pesar de mis errores siempre has sabido cómo darme otro empujón más para que siguiera adelante. Gracias Pepe.

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio por lo que me han aportado en todo este tiempo. Gracias Alonso ante todo por tus correcciones, tus comentarios y tus consejos sobre mi tesis, pero también por ser una auténtica “Wikipedia de la ciencia” y tener siempre respuestas para todo, por tener un GPS que localiza cualquier cosa en el laboratorio y por tu disposición a echar un cable cuando ha hecho falta, tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias María por tu dedicación y tu eficacia gestionando el laboratorio, y también por compartir conmigo esa obsesión por el orden y la limpieza.

No puedo dejar de darle las gracias a Lucía, uno de mis grandes apoyos más allá de las puertas del hospital. Te agradezco no sólo que me enseñaras a hacer las inmunos dobles y que siempre estuvieras atenta a mi trabajo por si me podías ayudar de alguna forma, sino también que supiste acercarte a mí y brindarme tu amistad. Aunque la mayoría del tiempo estabas fuera del laboratorio, no sé cómo encontraste la forma de estar pendiente de mí, hacerme reír cuando más lo necesitaba y buscar salidas cuando necesitaba un respiro. Gracias, sobre todo, porque siempre has tenido (y sigues teniendo) las palabras oportunas en los momentos oportunos.

Gracias a mi otro gran apoyo y mi complemento en el laboratorio, Silvia. Has sido fundamental para mí en estos últimos años. Me has enseñado todo lo que sabías, me contagiaste (aunque sea un poquito) tu dedicación y tu disciplina, compartiste todo conmigo y siempre con cariño y una sonrisa. Fuiste mi otra mitad, todo lo que necesitaba ahí dentro. Gracias por ofrecerme tu casa, por las noches toledanas, los viajes, las risas y todos los grandes momentos que, junto con Lucía, hemos vivido. Has sido mi compañera y mi amiga, y sigues siéndolo a pesar de la distancia. Te debo muchísimo, pero eso ya lo sabes porque no me he cansado de decírtelo en todo este tiempo. La mitad de esta tesis es tuya.

Fuera del contexto del trabajo tengo que dar las gracias a Eva, esa amiga que siempre ha estado ahí cuando he necesitado desconectar de todo. También a mi gran familia, que siempre ha confiado en mí y me han mostrado su orgullo. Tengo que mencionar en especial a mi hermano Álvaro, que ha sido una grandísima fuente de inspiración; no conozco a nadie con mayor fuerza de voluntad y mayor pasión por la investigación que tú, y me has mostrado que el sacrificio tiene grandes recompensas.

Y una mención especial se merecen, como no, mis padres Eulogio y Petri, a los cuales he dedicado con todo mi corazón esta tesis. Me inculcasteis valores y disciplina, sacrificasteis muchas cosas para que vuestros hijos tuvieran una educación, y me enseñasteis que por encima de todo, tenía que ser yo misma, buscar mi vocación y dedicarme a ello en cuerpo y alma. Vosotros sois el origen de todo lo que soy, y fruto de ello, es la tesis que tenéis ahora mismo en vuestras manos.

Y por último, pero no por ello menos importante, gracias a Sergio, mi pilar fundamental. Gracias por escucharme, por sorprenderme continuamente, por hacerme feliz y por quererme tal y como soy. Has estado conmigo en lo bueno y en lo malo, con sinceridad me has hecho ver mis logros y mis errores (dándoles siempre una nota positiva), has sabido lo que me pasa con tan sólo mirarme, has aguantado mis “ataques de estrés” y me has hecho saber que puedo contar contigo. Gracias por recorrer conmigo este camino que no ha hecho más que empezar.

Índice

Resumen	3
----------------------	----------

Introducción	7
---------------------------	----------

1. El desarrollo neuronal.....	9
1.1 <i>La polaridad neuronal. Modelo de las neuronas hipocampales in vitro</i>	9
1.2 <i>Regulación de la formación del axón</i>	11
1.3 <i>La ramificación neurítica</i>	12
2. Las moléculas de adhesión celular (CAMs) durante el desarrollo de las neuronas.....	13
2.1 <i>Cadherinas</i>	14
2.2 <i>Selectinas</i>	15
2.3 <i>Integrinas</i>	16
2.4 <i>Proteoglicanos</i>	17
2.5 <i>Familia de las inmunoglobulinas</i>	17
3. La membrana neuronal: balsas lipídicas o rafts de membrana.....	21
4. Los carbohidratos y su papel durante el desarrollo neuronal	25
4.1 <i>Estructura y función de los carbohidratos</i>	25
4.2 <i>Los glicoconjugados en la neurona</i>	27
4.3 <i>Los glicoconjugados en la matriz extracelular</i>	28
4.4 <i>Estructura y función de las Lectinas</i>	31
5. La familia de las Galectinas	34
5.1 <i>Descubrimiento, antecedentes y definición</i>	34
5.2 <i>Estructura y tipos</i>	35
5.3 <i>Función</i>	37
5.4 <i>Localización y transporte</i>	40
5.5 <i>Las galectinas en la neurona</i>	40
5.5.A <i>La Galectina-3</i>	41
5.5.B <i>La Galectina-4</i>	46

Hipótesis y objetivos	51
------------------------------------	-----------

Materiales y métodos	57
-----------------------------------	-----------

I. Cultivos celulares	59
------------------------------------	-----------

1. Cultivo primario de neuronas corticales e hipocampales.....	59
2. Cultivo primario de astrocitos	61
3. Cultivo de células PC12	62

II. Estudios de biología celular y molecular	63
4. Tratamientos neuronales.....	63
4.1 Galectinas recombinantes y complejos con heparán sulfato	63
4.2 Inhibición metabólica de la sulfatación	65
4.3 Extracción parcial de colesterol	66
4.4 Disrupción del citoesqueleto de actina/tubulina	66
4.5 Inhibición metabólica de la glicosilación	67
5. Inmunocitoquímica.....	67
6. Inmunohistoquímica.....	69
7. Estudios de unión de galectinas en superficie.....	70
8. Estudios cuantitativos de crecimiento y ramificación axonal.....	70
III. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	72
9. Preparación de extractos y fraccionamiento de membrana.....	72
10. Preparación del medio condicionado y extractos celulares para análisis de galectinas.....	73
11. Extractos celulares, entrecruzamiento e inmunoprecipitación.....	73
12. SDS-PAGE y Western Blot.....	74
13. Transfecciones celulares	75
13.1 Dominante negativo de L1.....	75
13.2 Silenciamiento de Gal-4 mediante RNA de interferencia (siRNA) y rescate con Gal-4 recombinante.....	75
IV. ANTICUERPOS Y REACTIVOS	77
Resultados	81
I. La galectina-3 humana, reguladora de la adhesión y el crecimiento axonal, como inductora de la ramificación por redistribución local de las proteínas de membrana L1 y ERM	83
1. La galectina-3 fosforilada presentada como sustrato induce la ramificación axonal.....	83
2. La galectina-3 fosforilada induce la generación de dos tipos de ramificaciones....	88
3. La galectina-3 fosforilada presentada como sustrato interacciona con la proteína de membrana L1.....	89
4. La galectina-3 fosforilada presentada como sustrato induce la relocalización de L1 en los dominios ricos en Thy-1 de neuronas <i>in vivo</i>	90

5.	La galectina-3 fosforilada presentada como sustrato induce la relocalización de las proteínas ERM a las zonas de membrana ricas en Thy-1.	93
6.	La expresión de una forma dominante negativa de L1, así como la perturbación de la formación de las balsas lipídicas de membrana, reducen la ramificación inducida por la galectina-3 fosforilada presentada como sustrato.	96
7.	La unión de galectina-3 fosforilada induce la co-localización de L1 y ERM.	100
II. La galectina-4 de neuronas como mediadora del crecimiento axonal y reguladora de la agrupación y presentación de NCAM-L1 en la membrana axonal.		101
8.	Las neuronas hipocámpales y corticales expresan galectina-4 <i>in situ</i>	101
9.	La galectina-4 se localiza en la membrana axonal desde estadios de desarrollo tempranos, y se distribuye en tractos discretos a lo largo del axón en cultivos de neuronas maduras.	104
10.	El silenciamiento de la galectina-4 mediante RNA de interferencia retarda el crecimiento axonal.	107
11.	El marcaje axonal de la galectina-4 se pierde por inhibición metabólica del proceso de sulfatación.	111
12.	La distribución axonal de galectina-4 requiere de un citoesqueleto de tubulina intacto.	114
13.	La galectina-4 interacciona con L1, y su reducción previene la formación de agregados de L1 sobre la membrana axonal.	115
14.	La inhibición del proceso de N-glicosilación de L1 afecta a la distribución de la proteína, pero no a la distribución segmentada de la galectina-4 sobre la membrana axonal.	119
Discusión		123
Conclusiones		139
Bibliografía		143
Resumen de abreviaturas		159

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción	7
Figura 1. Estadios de desarrollo de neuronas hipocampales en cultivo	11
Figura 2. Representación esquemática de los principales tipos de moléculas de adhesión celular	14
Figura 3. Representación esquemática de la estructura dimérica de NCAM-L1.....	21
Figura 4. Esquema de una balsa lipídica o raft de membrana	23
Figura 5. Isoformas posibles de trímeros en diferentes sistemas biológicos.....	26
Figura 6. Esquema de la estructura y composición de la MEC.....	29
Figura 7. Representación tridimensional del dominio de unión a carbohidrato (CRD) de las galectinas	35
Figura 8. Representación esquemática de las tres subfamilias de galectinas	37
Figura 9. Redes de galectinas y funciones en la membrana plasmática	39
Figura 10. Estructura de la galectina-3 y posibles estructuras derivadas de la misma.....	43
Figura 11. Estructura de la galectina-4; configuración monomérica y dimérica.....	47
Materiales y métodos	57
Figura 12. Esquema del proceso de extracción y cultivo de neuronas hipocampales primarias	60
Figura 13. Esquema del proceso de extracción y cultivo de astrocitos primarios.	62
Figura 14. Control de calidad de la producción de Gal-3 recombinante y fosforilada, y de Gal-4.	63
Figura 15. Esquema de la elaboración de bandas paralelas de galectina conjugada con FITC sobre PLL.....	65
Figura 16. Esquema de elaboración de experimentos de reclutamiento de proteínas sobre la superficie de la membrana inducido por anticuerpos (co-patching)	69
Resultados.....	81
Figura 17. pGal-3 presentada como sustrato induce la ramificación axonal	84
Figura 18. Los complejos de pGal-3-HS se unen preferentemente a los puntos de ramificación.....	86
Figura 19. Gal-3 no tiene efecto sobre la guía axonal in vitro	87

Figura 20. pGal-3 presentada como sustrato induce cambios locales en el citoesqueleto de F-actina	88
Figura 21. pGal-3 presentada como sustrato interacciona con L1	90
Figura 22. pGal3 presentada como sustrato desplaza a L1 hacia balsas lipídicas de membrana que contienen Thy-1.	92
Figura 23. Los complejos pGal3–HS desplazan a L1 hacia balsas lipídicas de membrana ricas en Thy-1	93
Figura 24. pGal-3 presentada como sustrato desplaza a ERM a las balsas de membrana ricas en Thy-1	94
Figura 25. Los complejos pGal3–HS desplazan a ERM hacia balsas lipídicas de membrana ricas en Thy-1	95
Figura 26. Gal-3 presentada como sustrato no desplaza a L1 hacia las balsas lipídicas ricas en Thy-1	96
Figura 27. pGal-3 presentada como sustrato provoca la co-localización local entre ERM y L1	97
Figura 28. La inducción de una forma dominante negativa de L1 y la perturbación de la formación de las balsas lipídicas, impiden la ramificación inducida por pGal-3	99
Figura 29. Gal-4 es expresada en cultivos de neuronas hipocámpales in vitro	102
Figura 30. Gal-4 es expresada en cultivos de neuronas corticales in vitro	103
Figura 31. Gal-4 es expresada en tejido cerebral adulto in situ	104
Figura 32. Marcaje de Gal-4 en cultivos de neuronas a lo largo de los diferentes estadios de desarrollo.	105
Figura 33. Gal-4 presenta un marcaje en tractos discretos sin un patrón definido	106
Figura 34. La disminución en la expresión de Gal-4 retarda el crecimiento axonal	108
Figura 35. La Gal-4 exógena se incorpora al tráfico vesicular de la neurona, y viaja a lo largo del axón hasta zonas restringidas de la membrana	110
Figura 36. La inhibición metabólica de la sulfatación afecta a la distribución de Gal-4 en la membrana axonal.....	112
Figura 37. La extracción parcial del colesterol de la membrana neuronal no afecta a la distribución axonal de Gal-4	113
Figura 38. La correcta estructura del citoesqueleto de tubulina es imprescindible para la distribución de membrana de Gal-4	115
Figura 39. Gal-4 interacciona con L1 en la membrana axonal.....	117
Figura 40. La disminución en la expresión de Gal-4 modifica la distribución de L1 en la membrana axonal.....	118

Figura 41. La reducción en el número de terminales LacNAc en los N-glicanos reduce la capacidad de reagrupamiento de L1 sobre la membrana axonal pero no de Gal-4, mientras que la inhibición de la sulfatación afecta a ambos procesos.....	120
Discusión	123
Figura 42. Modelo propuesto para la inducción de ramas locales promovido por pGal-3	128
Figura 43. Modelo propuesto para el transporte axonal y reagrupamiento de L1.....	135

ÍNDICE DE TABLAS

Materiales y métodos	57
Tabla 1. Reactivos.....	77
Tabla 2. Anticuerpos primarios	78

Resumen

Los glicoconjugados de la membrana plasmática axonal desempeñan funciones esenciales durante la regulación de los procesos de diferenciación, organización y crecimiento, que conllevan a la maduración neuronal. Sin embargo, muchos de los mecanismos que subyacen a estas funciones son aún poco conocidos.

Las galectinas son una familia de proteínas de unión a carbohidratos muy conservadas a lo largo de la evolución, y que participan en diversos procesos biológicos. Se caracterizan por su capacidad de unión a β -galactósidos a través de dominios de unión específicos denominados CRDs (*Carbohydrate Recognition Domain*). En el presente estudio, mostramos que la galectina-3 (Gal-3) en su forma fosforilada (pGal-3) y adherida a la superficie de un sustrato de cultivo, o en forma de complejos solubles con heparán sulfato, promueve la ramificación axonal en neuronas hipocámpales por remodelación local del citoesqueleto de actina subcortical. Para ello, la pGal-3 extracelular interactúa con la molécula de adhesión NCAM-L1, induciendo su asociación a balsas lipídicas de membrana (rafts), lo que recluta las proteínas de acoplamiento membrana/actina ezrin-radixin-moesin (ERM), por unión al dominio intracelular de la L1. Así, presentamos un modelo que explica la regulación del proceso de ramificación neurítica por pGal-3 gracias a la activación local de la vía L1-ERM-actina en puntos concretos de la membrana. Además, proponemos que la fosforilación de esta galectina podría actuar como un interruptor molecular que regula la respuesta del axón a la Gal-3.

Por otra parte, mostramos que la galectina-4 (Gal-4), típicamente asociada a epitelios gastrointestinales e implicada en el transporte polarizado de glicoproteínas apicales, se expresa también en neuronas hipocámpales y corticales, distribuyéndose en segmentos discretos de la membrana axonal. Esta distribución está asociada con el crecimiento axonal y con la presencia funcional de L1 en la membrana de los axones. De hecho, tanto la disminución en la expresión de Gal-4, como la inhibición de la síntesis de sulfátidos por los que esta lectina presenta alta afinidad, retardan el crecimiento axonal, y evitan la localización en la membrana axonal de Gal-4 y L1. Sin embargo, la inhibición de la maduración de los N-glicanos con terminaciones N-acetil-lactosamina (LacNAc) de L1, por las que Gal-4 también presenta alta afinidad, sólo afecta a la distribución axonal de L1, y no a la de Gal-4, pero impide la interacción entre ambas moléculas. Según estos datos, la Gal-4 gracias a su carácter bifuncional (2 CRDs) se une a los sulfátidos de vesículas de membrana asociadas a microtúbulos, y a los terminales LacNAc de los N-glicanos de

la L1 (y quizá de otras glicoproteínas), organizando así su transporte polarizado hacia posiciones concretas de la membrana axonal. Este mecanismo tiene como consecuencia la organización funcional de L1 en la membrana plasmática necesaria, entre otras cosas, para el correcto crecimiento axonal.

Palabras clave: Ramificación axonal, crecimiento axonal, polaridad neuronal, galectina, lectina, glicoproteína, sulfátido, neurona, L1, ezrin-radixin-moesin, actina, tubulina, membrana plasmática, heparán sulfato.

Introducción

1. El desarrollo neuronal.

1.1 La polaridad neuronal. Modelo de las neuronas hipocampales *in vitro*.

La polaridad celular se define por las diferencias morfológicas, estructurales y funcionales que dotan a la célula de distintos compartimentos espaciales capaces de llevar a cabo funciones independientes. La mayoría de las células eucarióticas están polarizadas en mayor o menor medida para controlar la señalización, los movimientos o la proliferación celular. Entre los tipos celulares altamente polarizados están las células epiteliales, que desarrollan una zona apical bien diferenciada de otra basal, o los leucocitos y fibroblastos, que presentan un borde anterior que marca el avance del movimiento (*leading edge*) y una zona posterior de sujeción al sustrato o apoyo (*rear end*).

Pero sin duda, de entre todas las células, las neuronas son el paradigma de la polaridad y la especialización a nivel de membrana. En las neuronas, el alto grado de polarización produce la especificación local, en sitios eventualmente muy lejanos (como por ejemplo en las neuronas del tracto cortico-espinal), de propiedades de recepción y señalización, de organización de la membrana y el citoesqueleto, y en consecuencia, de las funciones fisiológicas de axones y dendritas (Horton & Ehlers 2003). La importancia de la polarización neuronal se refleja en su temprano establecimiento, ya que desde los primeros estadios del desarrollo de la neurona, ésta selecciona a una sola de sus neuritas para crecer y desarrollarse como axón. La polaridad neuronal es por tanto, un requisito ineludible para la integración y el correcto funcionamiento del tejido nervioso.

En el caso de las neuronas hipocampales de rata crecidas *in vitro*, como las utilizadas en el presente trabajo (ver apartado de materiales y métodos), el desarrollo y establecimiento de la polaridad es un proceso perfectamente conocido, estudiado y definido temporalmente (Dotti et al 1988, Calderon de Anda et al 2008, Leach et al 2011). Así, en el transcurso de una semana de cultivo, las neuronas hipocampales desarrollan un axón diferenciado y unas dendritas, que se distinguen por su morfología, su contenido proteico, su citoesqueleto y su función sináptica. Las dendritas se establecen como procesos más cortos, con función postsináptica, y expresan marcadores típicos como las proteínas asociadas a microtúbulos MAP2. Los axones se establecen como procesos mucho más largos y finos, más o menos uniformes en diámetro, con

función presináptica, y que expresan marcadores como la tubulina acetilada, que junto con la proteína asociada a tubulina Tau, dan estabilidad a los microtúbulos; en los axones también encontramos proteínas relacionadas con el transporte axonal como la proteína β -tubulina III (Tuj 1), las proteínas del complejo SNARE o las GTPasas de la familia Rab (Mingorance-Le Meur & O'Connor 2009, Winckler & Yap 2011).

Hasta llegar a su madurez, las neuronas hipocampales en cultivo pasan por 5 estadios diferenciables morfológicamente (figura 1):

- *Estadio 1:* Abarca las primeras 2-4 horas *in vitro* (hiv). La célula redondeada desarrolla una serie de lamelipodios ricos en filamentos de actina distribuidos por toda su periferia. En este periodo la célula puede migrar hasta que, una vez asentada, los lamelipodios comienzan a agruparse en determinados puntos de la superficie celular para convertirse en pequeñas protrusiones que dan lugar a las neuritas.
- *Estadio 2:* Las 4-10 hiv siguientes, la célula se torna bipolar y comienza a desarrollar dos neuritas en polos opuestos. Estas formaciones comienzan a tener un citoesqueleto más rico en microtúbulos, con pequeñas protuberancias laterales ricas en filamentos de actina. Al final de la fase, aparecen otras neuritas (típicamente 4 o 5) y todas crecerán entre 10 y 15 μm de forma simétrica. Aunque en este punto las neuritas son morfológicamente indistinguibles, una de las dos neuritas iniciales comienza a acumular mayor cantidad de material lipídico y proteínas (Calderon de Anda et al 2008).
- *Estadio 3:* Alcanzadas las 48 hiv, la neurita que comenzó a recibir más material biológico, comienza a desarrollar un cono de crecimiento muy activo y a crecer a una velocidad entre 5 y 10 veces superior a la del resto de neuritas, que crecen lentamente en este período. La neurona, por tanto, adquiere polaridad visible.
- *Estadio 4:* En torno a los 4 días *in vitro* (div), las dendritas comienzan también a elongarse a la vez que el axón sigue creciendo algo más lentamente. Es en este período cuando el axón empieza a desarrollar ramificaciones.
- *Estadio 5:* A los 7 div la neurona termina su maduración con la ramificación de las dendritas, la formación de espinas dendríticas y el establecimiento de conexiones sinápticas.

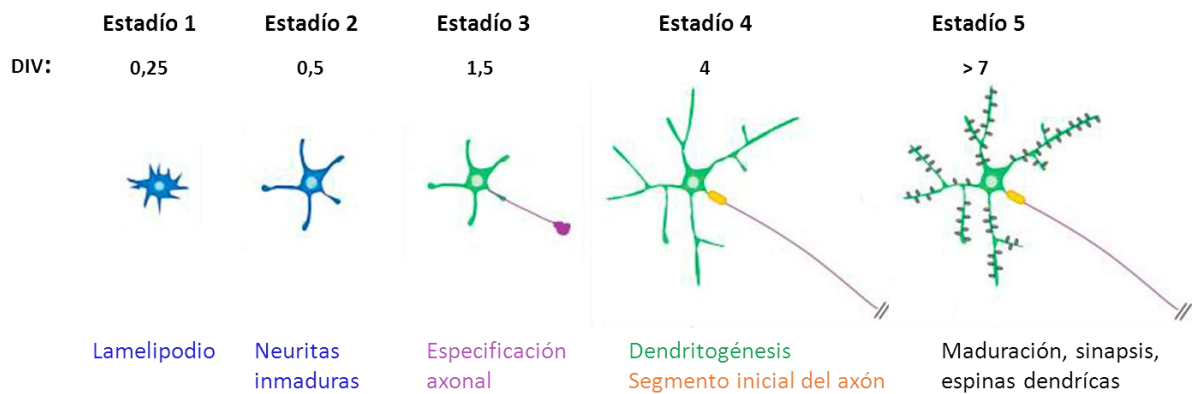


Figura 1. Estadios de desarrollo de neuronas hipocampales en cultivo. Se indica para cada estadio, el tiempo aproximado al cual se puede encontrar cada fase expresado en días *in vitro* (DIV), así como el motivo morfológico característico de cada uno. Figura adaptada de Barnes & Polleux (2009).

1.2 Regulación de la formación del axón.

A nivel intracelular, la maduración y el establecimiento de la polaridad de la neurona se da por una serie de cambios moleculares que incluyen alteraciones en el citoesqueleto. Así, en los estadios tempranos, el citoesqueleto de actina predominante en las neuronas, permite cambios rápidos y una elevada motilidad. Una vez que las neuronas han madurado, desarrollan un citoesqueleto más estable rico en tubulina pero conservando zonas con una mayor cantidad de actina filamentosa, como el cono de crecimiento o las pequeñas espículas que rodean el axón y que permiten a la célula explorar el entorno y realizar cambios en su trayectoria (Gilbert 2005, Barnes & Polleux 2009). Este tipo de cambios suceden a lo largo de toda la vida de la neurona, ya que cada estímulo que recibe así como la respuesta que elabora para el mismo, promueven nuevas modificaciones en su estructura o en su interacción con el entorno, que se traducen en nuevos cambios a nivel de actina y/o tubulina (Schubert & Dotti 2007), así como un transporte molecular activo a lo largo del axón (Barnes & Polleux 2009, Song et al 2009)

Estos cambios están regulados por la interacción y la actividad de varios tipos de moléculas distribuidas asimétricamente en la neurona. Así por ejemplo, la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) o las Ras y Rho GTPasas, marcan el inicio del crecimiento del axón a partir de una neurita en concreto (Barnes & Polleux 2009). También serán importantes la Ankirina-G y las proteínas de adhesión tipo CAM (N-CAM), que delimitan el segmento inicial del axón desde el momento en que éste comienza a formarse, los puntos de reconocimiento de células de

Schwann y por tanto la futura formación de los nódulos de Ranvier, o los terminales pre y postsinápticos (Dzhashvili et al 2007).

1.3 La ramificación neurítica.

Como ya se ha mencionado, la formación de la compleja red neuronal y su correcto funcionamiento, requiere que las neuronas conecten entre ellas y con otras células por diferentes puntos. Para lograrlo, la neurona genera un gran número de ramificaciones gracias a las que multiplica las posibilidades de conexión con sus múltiples dianas.

El proceso de formación de una nueva ramificación (dendrítica o axonal) depende directamente de sutiles cambios en la membrana y de la reorganización del citoesqueleto en el punto donde aparece la nueva rama. Estos cambios implican la fragmentación de los microtúbulos, y la acumulación local de filamentos de actina. El aumento en la concentración de estos microfilamentos, inducen la aparición en la zona de pequeñas protrusiones, filopodios y lamelipodios, que maduran y se desarrollan para dar lugar a una nueva rama. Más tarde, estas nuevas ramas se consolidan al polimerizarse nuevos microtúbulos (Mingorance-Le Meur & O'Connor 2009).

La regulación de todo este proceso depende de moléculas que estimulan la formación de nuevas ramas como la enzima proteína-quinasa A (PKA) o el factor de crecimiento BDNF, así como de otras proteínas que consolidan las conexiones establecidas por la neurona, como Calpaína (Mingorance-Le Meur & O'Connor 2009). La acumulación local de la proteína de adhesión L1 y su maquinaria de señalización, y del complejo multiprotéico ERM, son fundamentales en el establecimiento de nuevas ramificaciones, como se verá más adelante.

2. Las moléculas de adhesión celular (CAMs) durante el desarrollo de las neuronas.

Las moléculas de adhesión celular o CAMs (*cell adhesion molecules*), son proteínas con diversos papeles a lo largo de la vida celular. Median el establecimiento de uniones reversibles o irreversibles entre una célula y otra, o con el medio que la rodea. Las CAM forman parte de un amplio y complejo conjunto de proteínas cuyas funciones van más allá del simple reconocimiento y la adherencia de la célula. Son importantes en el correcto desarrollo de múltiples procesos biológicos como el desarrollo y el mantenimiento celular, la migración, la formación de tejidos, o asegurando la correcta funcionalidad de las células (como es el caso de procesos inflamatorios e inmunológicos), etc. Es por esto que su desregulación puede suponer serios problemas para la homeostasis celular, o incluso dar lugar a cuadros patológicos. En este sentido, las desregulaciones de las CAMs han sido asociadas a situaciones fisiopatológicas como la metástasis de las células cancerosas y algunas neoplasias, la pérdida de adhesión de eosinófilos en la mucosa bronquial que interviene en el asma y en inflamaciones pulmonares agudas, con enfermedades reumatológicas como la artritis o la esclerosis sistémica progresiva, así como con patologías relacionadas con alteraciones en la coagulación como el lupus eritematoso sistémico (Long & Lemmon 2000).

Las CAMs son proteínas transmembrana de un solo paso, que dejan su extremo C-terminal en el lado citoplasmático, y su extremo N-terminal en el lado extracelular. A partir de esta estructura básica, cada familia de CAMs presenta ligeras diferencias que les confieren una funcionalidad concreta y distinta a las demás. Todas pueden formar homo o heterodímeros, o pueden unirse más de dos unidades para formar polímeros u oligómeros, pudiendo ser homofílicas o heterofílicas en función de si se unen a ellas mismas o a otras CAMs diferentes. También se diferencian como homotípicas o heterotípicas, según se unan a receptores ubicados en el mismo tipo de célula en que se encuentran o células diferentes.

La clasificación más extendida para las CAMs se basa en su dependencia de iones Ca^{2+} (Hynes 1999), (figura 2):

- Dependientes de Ca^{2+} :

Cadherinas.

Selectinas.

Integrinas.

- Independientes de Ca^{2+} :

Proteoglicanos.

Familia de las inmunoglobulinas.

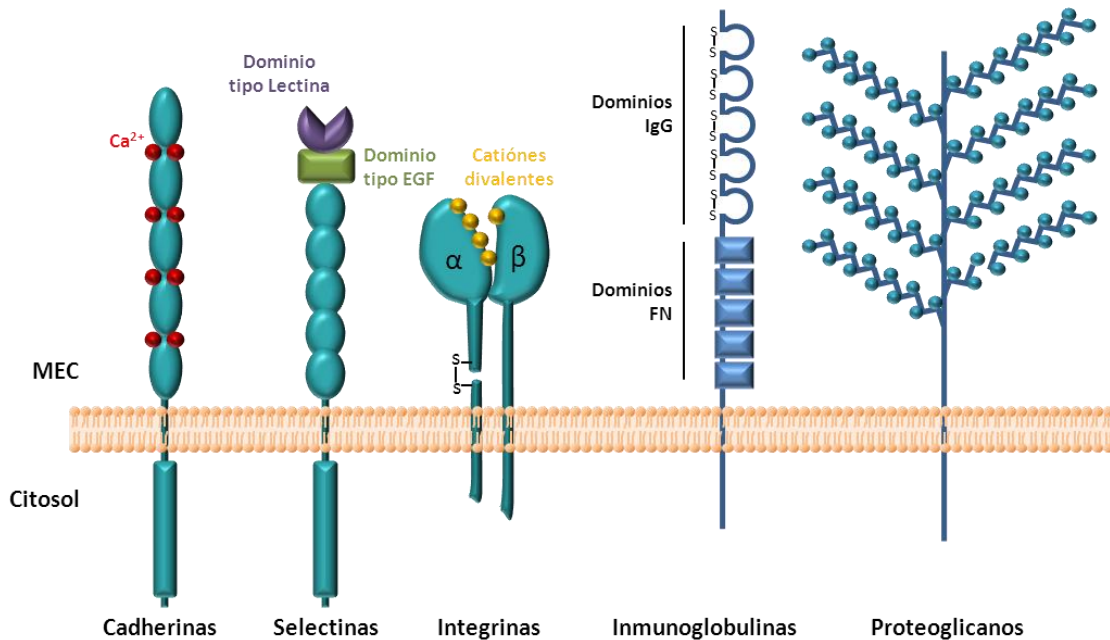


Figura 2. Representación esquemática de los principales tipos de moléculas de adhesión celular. La figura muestra la estructura típica de cada tipo de CAM. Las **cadherinas** presentan un extremo N-terminal compuesto por 5 o 6 dominios con capacidad para unir Ca^{2+} . Las **selectinas** presentan en su extremo N-terminal un dominio de tipo lectina (de unión a carbohidratos), unido a un dominio de tipo EGF y a una serie de dominios similares a las proteínas reguladoras del complemento. Las **integrinas** se componen de una subunidad α unida de forma no covalente a una subunidad β , cuyos extremos N-terminales unen Ca^{2+} o Mg^{2+} . Las **inmunoglobulinas** se dividen en un dominio de tipo inmunoglobulina (IgG) compuesto por subunidades antiparalelas unidas por puentes disulfuro, seguido de un dominio compuesto por una cadena de subunidades de tipo fibronectina tipo III (FN). Los **proteoglicanos** presentan una estructura compleja compuesta por una o varias cadenas laterales de glicosaminoglicanos unidas a un péptido central.

2.1 Cadherinas.

Son proteínas monoméricas y transmembranales, de entre 700 y 750 aminoácidos (aa). La parte extracelular se compone de un conjunto de 5 o 6 dominios similares a las inmunoglobulinas los cuales tienen capacidad de unir Ca^{2+} , hecho que protege a la proteína de la

acción de enzimas de degradación, a la vez que favorece la formación de homodímeros funcionales.

Están presentes en todas las células, aunque existen subclases exclusivas de ciertos tipos celulares. Aunque se conocen varios tipos de cadherinas, las más conocidas y estudiadas son:

Cadherina E: Expresada principalmente en células epiteliales.

Cadherina N: Presente en células nerviosas. Muy expresada en el cerebro, aunque también está presentes en el músculo cardíaco y en la retina.

Cadherina P: Presente en la placenta y en epidermis.

Las cadherinas desempeñan papeles mediadores de la adhesión celular y el mantenimiento de la integridad de los tejidos, y son especialmente importantes durante el período embrionario regulando la segregación de las diferentes poblaciones celulares en los distintos tejidos, y el reconocimiento entre células epiteliales (Tepass et al 2000, Wanner & Wood 2002).

2.2 Selectinas.

Estructuralmente las selectinas se caracterizan por la presencia en la región extracelular de un dominio con capacidad de unión a carbohidrato similar a los de las lectinas (de ahí su nombre). En esta región se encuentran además un dominio denominado *EGF-like* debido a su similitud con el factor de crecimiento epidérmico EGF, y varias estructuras similares a las proteínas reguladoras del complemento. Por este motivo, también se las conoce como **LECAMs** (*Lectin-EGF-Complement CAMs*).

Según la célula en la que se encuentren, se diferencian entre:

Selectina L: Presente en leucocitos.

Selectina P: Presente en plaquetas y células endoteliales.

Selectina E: Presente en células endoteliales.

Las selectinas son glicoproteínas de membrana que intervienen en fenómenos transitorios de adhesión intercelular dependientes de Ca^{2+} , a través de la interacción con los carbohidratos. Estas interacciones transitorias son especialmente importantes en el torrente circulatorio, donde regulan el movimiento de las células sanguíneas o los procesos de

interacción entre los leucocitos y las células del endotelio vascular, necesarios para la extravasación de células implicadas en procesos inflamatorios (Kansas 1996, Bendas & Borsig 2012).

2.3 Integrinas.

Las integrinas son heterodímeros compuestos por dos subunidades de glicoproteínas transmembranales, α y β , asociadas de forma no covalente. Los extremos N-terminales de estas subunidades, presentan dominios de unión a Ca^{2+} o Mg^{2+} , según la integrina de que se trate (Hynes 2002). Presentan una capacidad de unión de baja afinidad, por lo que sus interacciones se caracterizan por tener un carácter reversible.

Existen 8 tipos diferentes de subunidades β y 18 de subunidades α , cuyas combinaciones dan lugar a 24 tipos de integrinas diferentes. Se clasifican en base al tipo de subunidad β que presenten. Entre las más importantes y conocidas cabe destacar (Luo et al 2007, Lau et al 2009):

Integrinas β_1 : Presentes en casi todos los tipos de células, forma dímeros con al menos doce subunidades α diferentes. También conocidas como integrinas VLA (*very late activation antigens*), reaccionan a señales como proteínas G, quinasas o factores de crecimiento, las cuales activan diversas cascadas de señalización celular. Por este motivo, estas integrinas son importantes en procesos de crecimiento, maduración, migración, proliferación, apoptosis etc.

Integrinas β_2 : También conocidas como Leu-CAM o CD11/CD18. Forman dímeros con al menos 4 subunidades α distintas. Son expresadas exclusivamente en los leucocitos, en los cuales median la migración, la interacción con sus dianas, y por tanto, regulan la respuesta inmunológica.

Integrinas β_3 : O citoadhesinas, forma dímeros con 2 tipos de subunidad α . Se encuentran en varios tipos celulares, expresándose más profusamente en las plaquetas. Son importantes por su capacidad de unión al fibrinógeno, al factor de von Willebrand y a fibronectina. Esto facilita la unión de las plaquetas a las paredes de los vasos sanguíneos y, mediante la interacción con el fibrinógeno, la asociación con otras plaquetas para promover la formación del trombo blanco.

Una particularidad de las integrinas es que pueden compartir el mismo ligando, como es el caso del colágeno, la fibronectina y la laminina. También tienen una importante capacidad de unión a actina por medio de la subunidad β (siendo la integrina $\alpha_6 \beta_1$ una excepción, ya que se encuentra en los hemidesmosomas y se une a los filamentos intermedios). Median por tanto uniones entre la matriz extracelular (MEC) y el citoesqueleto de la célula en la que se encuentran, regulando la forma, la orientación o el movimiento de la célula, al tiempo que transmiten señales de activación metabólica (Luo et al 2007). Aunque menos frecuente, también pueden intervenir en procesos de reconocimiento célula-célula (Bendas & Borsig 2012).

2.4 Proteoglicanos.

Son glicoproteínas que forman parte de la matriz extracelular de colágeno, lugar en el que desempeñan sus principales funciones (ver epígrafe 4.3 sobre la MEC), aunque ocasionalmente pueden expresarse en la superficie de la célula permitiendo que actúen como CAMs (Wade et al 2013).

Se caracterizan por presentar una o más cadenas laterales de glicosaminoglicanos (unidades repetidas de disacáridos con grupos carboxilo y sulfatos; GAGs) unidas covalentemente a un péptido central, mediante los cuales interactúa con las proteínas de la matriz extracelular, pudiendo servir también como puntos de reconocimiento de diversos factores de crecimiento (Couchman & Pataki 2012).

2.5 Familia de las inmunoglobulinas.

Dentro de esta amplia familia se encuentran la mayoría de proteínas de adhesión celular independientes de Ca^{2+} . Se caracterizan por compartir una región de entre 60 y 100 aa repartidos entre dos dominios, uno dispuesto como subunidades antiparalelas unidas por puentes disulfuro que van a formar un dominio de tipo inmunoglobulina (dominio IgG), y otro compuesto de una serie de subunidades de tipo fibronectina tipo III (dominio FN). Todos los miembros de esta familia presentan al menos un dominio de estas características, encontrando miembros monoméricos, diméricos o heterodiméricos. Pueden presentar uniones homofílicas o heterofílicas, e interactuar con células homotípicas o heterotípicas. Algunas de ellas pueden

incluso ser secretadas al medio extracelular perdiendo su naturaleza de receptores de superficie (Wai Wong et al 2012).

Entre los integrantes de esta familia encontramos (van Buul et al 2007):

Inmunoglobulinas o anticuerpos.

Receptores de células T (TCR).

Receptores de reconocimiento de linfocitos T del tipo CD-1, CD-3, etc.

Complejo mayor de histocompatibilidad HLA.

N-CAMs neuronales.

PE-CAMs plaquetarias y endoteliales.

Receptor del factor activador de plaquetas (PDGE).

I-CAMs de reconocimiento intercelular y unión heterofílica a integrinas.

V-CAMs de reconocimiento de células vasculares.

Como se aprecia en la lista anterior, su distribución tisular es generalizada y están involucradas en procesos fundamentales de reconocimiento celular y uniones antígeno-anticuerpo. Son muy importantes en procesos biológicos tan relevantes como las reacciones inmunológicas, morfogénesis, desarrollo neural, crecimiento y diferenciación celular, o regulación de los procesos de inflamación.

Dentro de la familia de las inmunoglobulinas, las más importantes en el sistema nervioso son las **N-CAM** (*neural cell adhesion molecules*), expresadas abundantemente en neuronas (Buttner et al 2003). Existen hasta veinte formas distintas de N-CAM, todas ellas con cinco dominios extracelulares homólogos a los de las IgG, y con capacidad para generar uniones de tipo homofílico. Son proteínas con una demostrada importancia en las uniones interneuronales y en procesos de interacción glía neurona (Dolapchieva et al 2002), que también se utilizan como marcadores tumorales (Jensen & Berthold 2007).

Este tipo de moléculas de adhesión se suele co-expresar con otras proteínas de tipo CAM, en especial con las cadherinas. La capacidad de unión de su extremo N-terminal a otras moléculas, está regulada por la presencia y cantidad de ácido siálico, que modula la unión de la N-CAM a sus ligandos actuando como inhibidor competitivo.

Dentro de la subfamilia de proteínas de adhesión del tipo inmunoglobulinas, y por la importancia que tiene en este trabajo, debemos destacar la proteína **NCAM-L1**. Es una CAM ampliamente expresada, también conocida como CAM-L1 o CD171 (clúster de diferenciación 171). Al igual que el resto de glicoproteínas de esta familia, presenta una estructura monomérica y transmembrana de aproximadamente 220 KDa de peso molecular. Se compone de una serie repetitiva de cinco subdominios de tipo inmunoglobulina, junto con otros seis subdominios repetidos de tipo fibronectina, ambos unidos a un dominio transmembrana y un extremo citoplasmático altamente conservado (Jensen & Berthold 2007), (figura 3).

L1 es fundamental en el desarrollo del sistema nervioso, e imprescindible para la formación del tracto corticoespinal. Una vez la neurona se ha polarizado, L1 presenta una distribución típicamente axonal, aunque se desconoce el mecanismo exacto que determina esta localización. Está implicada en la diferenciación celular, el crecimiento neurítico, la ramificación, la guía y la migración del axón, la mielinización y la plasticidad sináptica mediante la activación de diversas cascadas enzimáticas (Itoh et al 2004, Cheng et al 2005, Itoh et al 2005). De hecho, algunas mutaciones en el gen que codifica para NCAM-L1, dan lugar a graves alteraciones neurológicas que conllevan retraso mental. Estas alteraciones incluyen síndromes como el MASA (*Mental Retardation, Aphasia, Shuffling gait, Adducted thumbs*), el SP-1 (*complicated Spastic Paraplegia type 1*) y la ACC (*Agenesis of Corpus Callosum*). Todas estas alteraciones causadas por modificaciones en la expresión de L1 se han agrupado en el denominado síndrome de CRASH, acrónimo elaborado con la sintomatología característica de todas ellas (*Corpus callosum agenesis, Retardation, Adducted thumbs, Shuffling gait and Hydrocephalus*), (Fransen et al 1997).

También ha sido estudiada la implicación de L1 en procesos de dolor neuropático, una alteración sensorial típica que acompaña a la regeneración neuronal tras el daño medular. El dolor neuropático incluye hiperalgesia (respuesta exagerada ante estímulos dolorosos) y/o alodinia (respuesta dolorosa ante estímulos inocuos). Una disminución en la expresión de L1 irá acompañada de un aumento en el grado de ramificación de las fibras corticoespinales rostrales con respecto a una médula no lesionada, promoviendo la aparición del dolor neuropático, a la par que dificulta la ramificación de las fibras sensoriales disminuyendo la respuesta sensorial. Además, puesto que L1 también contribuye al correcto desarrollo y maduración neuronal, niveles bajos de esta proteína se traducen en alteraciones en la plasticidad que dificultan la recuperación tras el daño neuronal (Hoschouer et al 2009).

La actividad de L1 se basa en su capacidad para formar heterodímeros con otras proteínas u homodímeros consigo misma por medio de interacciones con sus dominios FN (Hoschouer et al 2009). Para formar estos dímeros, es necesaria la unión de una proteína activadora a la primera subunidad del dominio IgG, como el **Neurocan** o la **Neuropilina** (en el caso más común), componentes de la MEC, u otras proteínas de adhesión celular como las integrinas $\beta 1$, las cadherinas u otros miembros de la familia de las inmunoglobulinas (Itoh et al 2005, Hortsch et al 2009). L1 posee además una secuencia peptídica específica para la unión de proteínas por el lado citoplasmático, la secuencia RSLE (Arg-Ser-Leu-Glu). Esta secuencia es imprescindible para el reclutamiento de L1 en la membrana de los axones en neuronas de los ganglios dorsales (neuronas DRG), y también para el reciclaje de L1 a nivel del cono de crecimiento (Cheng et al 2005).

La secuencia RSLE está situada junto a una tirosina sensible a la fosforilación por la enzima quinasa-Src, hecho que da como resultado una secuencia YRSL. Esta última actúa como señal para la unión de otras proteínas, como la proteína adaptadora de clatrina-2 (AP-2), necesaria para la endocitosis de L1. Dicha secuencia fosforilada es también importante para regular el anclaje entre L1 de la membrana plasmática con el citoesqueleto de actina, ya que sirve como punto de unión a otras proteínas adaptadoras como la **ankirina**, o el conjunto de proteínas **Ezrin, Radixin y Moesin (ERMs)** que se unen a los filamentos de actina por medio de la ezrin. La anquirina, cuya interacción está impedida por su fosforilación en el sitio de unión, restringe el movimiento lateral de la L1 en la membrana celular y regula el crecimiento neurítico (Cheng et al 2005), la sinaptogénesis, y el mantenimiento del segmento inicial del axón (Dickson et al 2002, Hortsch et al 2009). Por otro lado, ERM, que comparte sitio de unión con la proteína AP-2, requiere para su activación de la fosforilación de una treonina en el extremo C-terminal de ezrin. Este conjunto de proteínas aumentan su expresión en neuronas hipocámpales durante los primeros estadios de su desarrollo, e intervienen durante la polarización, el crecimiento y la diferenciación de estas células (Dickson et al 2002); ERM también se sobre-expresa puntualmente en estructuras dinámicas, como conos de crecimiento o en zonas de ramificación axonal (Scherer et al 2001, Dickson et al 2002, Cheng et al 2005), o tras lesiones neuronales para promover la regeneración (Haas et al 2004); además, colabora activamente en la mielinización del SNP por parte de las células de Schwann (Scherer et al 2001).

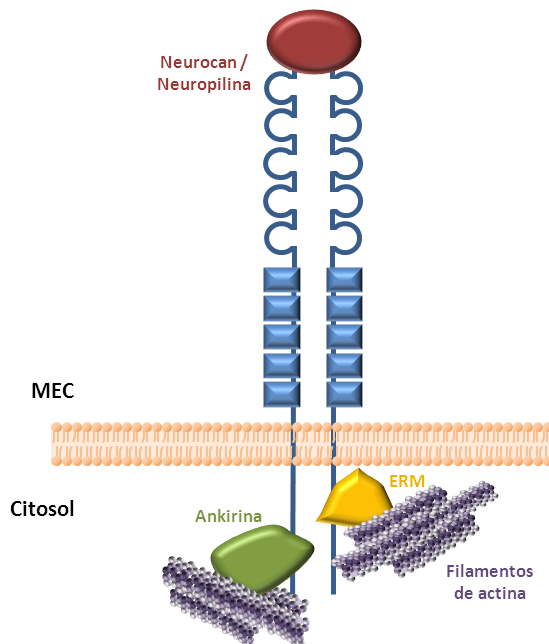


Figura 3. Representación esquemática de la estructura dimérica de NCAM-L1. La formación de este homodímero, está favorecida por la unión al dominio IgG de una proteína activadora del tipo de la Neurocan o la Neuropilina entre otras. Esta estructura favorece la interacción por el lado citoplasmático de proteínas de anclaje como la Anquirina o la ERM, las cuales a su vez se unen a los filamentos de actina, haciendo de puente entre la membrana y el citoesqueleto de la célula.

3. La membrana neuronal: balsas lipídicas o rafts de membrana.

La estructura básica de las membranas biológicas consiste en una bicapa de lípidos anfipáticos, heterogénea y fluida. Su funcionalidad depende de la disposición de sus componentes (fundamentalmente colesterol, proteínas, esfingomiélin y lípidos de tipo glicerofosfolípido, esteroides y esfingolípidos; Sonnino & Prinetti 2013), que interaccionan entre ellos para dar lugar a los múltiples niveles de organización que caracterizan diferentes regiones de la membrana con funciones locales específicas.

En el año 1988, Kai Simons y Gerrit van Meer determinaron la existencia de los **raft de membrana**. Estos raft, también conocidos como **balsas lipídicas** o **balsas de membrana**, fueron definidos entonces como dominios de membrana estabilizados por su alto contenido en colesterol, que difieren de su entorno en su composición molecular y en sus propiedades. Durante las últimas dos décadas, las balsas de membrana han aumentado su popularidad debido a que numerosos estudios las implican en un amplio abanico de funciones biológicas (Sonnino & Prinetti 2013). Durante este mismo período, la existencia de estas balsas lipídicas ha sido ampliamente debatida. Muchos investigadores, debido a la difícil visualización de las balsas en células vivas por su carácter temporal y su pequeño tamaño (por debajo del límite de

difracción de un microscopio convencional), y debido también a la falta de consenso en cuanto a su descripción y catalogación, han considerado que el papel biológico de las balsas aún sea controvertido.

Sin embargo, actualmente disponemos de varios métodos para la visualización y el estudio de las balsas lipídicas (Munro 2003, Sonnino & Prinetti 2013), como por ejemplo la toxina colérica (que se une al gangliósido de membrana GM1, ampliamente distribuido en dichas regiones), colorantes lipófilos como el Laurdan, o técnicas más actuales que además permiten realizar estudios dinámicos como el FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), el FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*), el SFTM (*single fluorophore tracking microscopy*) y el SPFT (*single particle fluorescence tracking*). Aunque estas técnicas permiten un estudio indirecto de las balsas lipídicas (ya que tienen una resolución limitada), recientemente, gracias a la microscopía de alta resolución combinada con técnicas de marcaje mínimamente invasivas en células vivas, se ha conseguido la visualización directa de las balsas (Sonnino & Prinetti 2013), dando pie incluso a la elaboración de simuladores virtuales que interpretan la formación y el funcionamiento de las balsas como herramientas biológicas (Bennett & Tieleman 2013).

Pero sin duda, hoy día los métodos más extendidos para el estudio de las balsas lipídicas son las técnicas bioquímicas que, aunque indirectas, son muy útiles. Estas técnicas se basan en la extracción de las balsas en presencia de detergentes no iónicos (como el Triton X-100) en frío (a 4°C), seguida del fraccionamiento de la muestra en un gradiente de densidad. Las muestras obtenidas han sido denominadas **DRMs** (*detergent-resistant membrane fractions*; Martín-Belmonte & Millan 2001, Lingwood & Simons 2010). A partir de estos DRMs, se pueden obtener determinadas proteínas asociadas a las balsas lipídicas, y de esta manera, es posible determinar la sensibilidad de las balsas a variaciones en la composición de la membrana (como la extracción de colesterol mediante el uso de ciclodextrinas, como la metyl- β -ciclodextrina; Pucadyil & Chattopadhyay 2006, Hebbar et al 2008), o la formación de agregados de proteínas de las balsas de membrana inducida por anticuerpos (Lingwood & Simons 2010).

Actualmente, las balsas lipídicas se clasifican como microdominios de membrana especializados tanto en su composición como en su funcionalidad. Esta definición está basada en el concepto establecido en el año 2006 durante el *Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function*: "las balsas lipídicas de membrana son pequeños dominios (de entre 10 y 200 nm), heterogéneos y muy dinámicos, enriquecidos en esfingolípidos 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".

Estructuralmente, gracias al alto contenido en ácidos grasos saturados de las balsas lipídicas, éstas se diferencian como una zona más ordenada y menos fluida, con una temperatura de fusión más alta que otras zonas de la membrana en las que haya más glicerofosfolípidos no saturados (Harder et al 1998); ese alto grado de empaquetamiento de las cadenas aciladas es esencial para la organización de la balsa lipídica pues hace que estas regiones ricas en esfingolípidos 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), (figura 4).

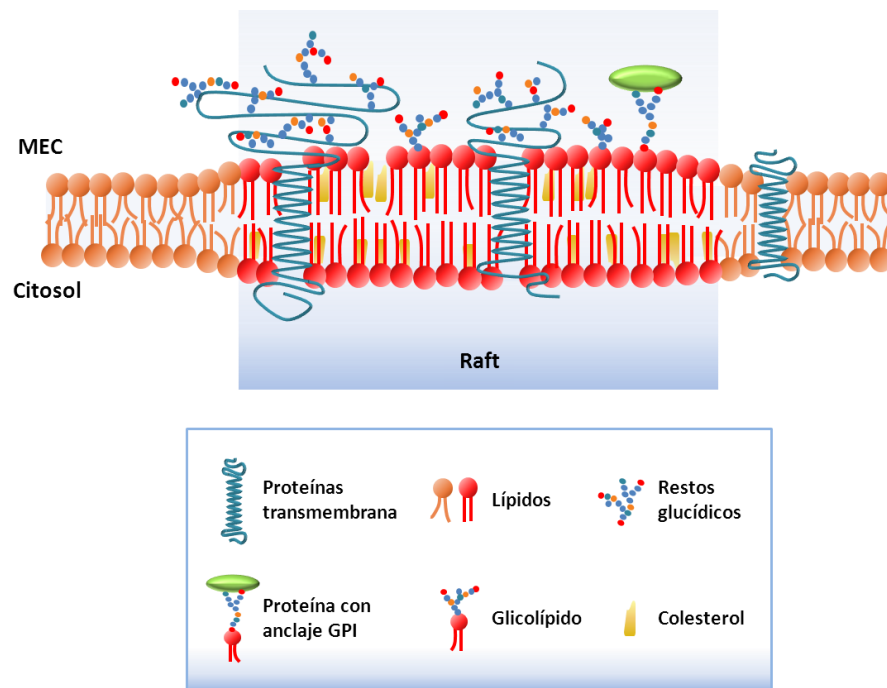


Figura 4. Esquema de una balsa lipídica o raft de membrana. En la figura se muestran algunos de los principales componentes de la membrana plasmática, y cómo éstos se organizan, interaccionan entre ellos y forman las balsas lipídicas.

Las balsas de membrana están implicadas en muchos procesos celulares, fundamentalmente en la dinámica (y por tanto en el tráfico) de membranas y sus componentes, en la señalización celular, en procesos de adhesión celular y migración, en transmisión sináptica y en organización del citoesqueleto (Sonnino & Prinetti 2013). También presentan otras funciones como la formación de puntos de unión para la entrada y salida de bacterias y toxinas, para la adhesión vírica, el mantenimiento de la homeostasis del colesterol, la angiogénesis, el reconocimiento de receptores de células T, de células B, de factores neurotróficos, factores de crecimiento, interleuquinas, insulina, etc. (Harder et al 1998, Martín-Belmonte & Millan 2001, Munro 2003).

Al ser zonas de la membrana muy diversas y dinámicas en cuanto a su tamaño y composición, pueden concentrar localmente proteínas citoplásmicas miristoiladas o palmitoiladas, o proteínas de la superficie celular con anclajes GPI (glicofosfatidil-inositol), que en muchos casos están implicadas en la transducción de señales (como proteínas G, receptores de factores de crecimiento, distintas quinasas como Src, TK, PKC, MAPK, etc.), que en las balsas co-localizan e interaccionan con otros componentes de los sistemas de señalización celular, confiriendo a la balsa unas propiedades y funciones particulares (Gomez-Mouton et al 2004).

La variedad de componentes que puede formar una balsa lipídica, sumada al dinamismo de estas zonas, permite que se formen interacciones entre diferentes componentes de balsas próximas entre sí, permitiendo así fusionarse entre ellas y crear plataformas de mayor tamaño que se consideran importantes puntos de generación de señales intracelulares (Harder et al 1998, Munro 2003). Esta capacidad de interacción entre rafts, puede dar lugar a balsas de unas características determinadas que algunos autores han denominado **super-rafts** (Braccia et al 2003). Los super-rafts se caracterizan por presentar un mayor grado de organización que las balsas de membrana, y además, una mayor resistencia a su extracción mediante detergentes no iónicos a temperatura fisiológica (y no a baja temperatura como ocurría con las anteriores). Son estructuras particularmente abundantes en la membrana plasmática de las células enterocíticas del intestino delgado (Danielsen & Hansen 2006), donde además, entre su composición cuentan con proteínas que favorecen su formación y les proporcionan mayor estabilidad, como por ejemplo enzimas digestivas como la aminopeptidasa-N o la sacarosa-isomaltasa, o lectinas como la galectina-4 (información ampliada en el apartado 5.5.B sobre esta proteína), (Braccia et al 2003, Lucero & Robbins 2004). Pero también podemos encontrar este tipo de super-rafts en otras estructuras de una forma menos explícita, como en células del sistema nervioso central, donde otro tipo de moléculas como la proteína de unión a colesterol NAP-22 hacen la función de estabilización y servirán se marcadores específicos para estos tejidos (Khan et al 2003).

4. Los carbohidratos y su papel durante el desarrollo neuronal.

4.1 Estructura y función de los carbohidratos.

Los carbohidratos son, en su forma más simplificada, unidades de azúcares o glúcidos llamados monómeros. Estos carbohidratos simples pueden unir otra o más unidades de azúcar de forma covalente para formar otros carbohidratos mayores como oligosacáridos (entre 2 y 9 monómeros) o polisacáridos (a partir de 9 monómeros). En sistemas biológicos, los carbohidratos pueden aparecer aislados o unidos a otras biomoléculas para formar glicoconjugados como las glicoproteínas o los glicolípidos. Los procesos de glicosilación y deglicosilación que dan lugar a unas u otras moléculas, están regulados por enzimas glicosiltransferasas y glicosidasas respectivamente (Gabiús et al 2002).

Los polisacáridos son los polímeros naturales con mayor capacidad para almacenar información biológica. Esto se puede ilustrar comparando la cantidad de variaciones posibles, por ejemplo, de distintas estructuras triméricas. Así, en el caso del código genético, únicamente serían posibles 64 permutaciones de trinucleótidos con los 4 ácidos nucleicos que forman el ADN (4^3); en las proteínas, son posibles 8000 combinaciones diferentes de los 20 aminoácidos que se encuentran en la naturaleza, para formar un tripéptido (20^3) (Rüdiger & Gabiús 2009). Sin embargo, tendríamos un total de 38.016 posibles combinaciones para un trisacárido, según se calculó en Laine 1997 (figura 5). Esta versatilidad que caracteriza a los carbohidratos, es el resultado de la suma de las diferentes variables estructurales que pueden intervenir durante la formación de los isómeros (Laine 1997, Rüdiger & Gabiús 2009):

- *Tamaño del anillo*: dependiendo de si el anillo está formado por cinco o seis átomos de carbono (formas furanosa y piranosa respectivamente).
- *Estado anomérico*: El carbono anomérico (el que contiene el oxígeno carbonilo dentro del anillo), puede situarse a un lado o a otro dentro del anillo, dando lugar al anómero- α o al β .
- *Posición de sus enlaces glicosídicos*: pueden ser del tipo α (1 \rightarrow 2), α (1 \rightarrow 4), α (1 \rightarrow 6), β (1 \rightarrow 4) o β (1 \rightarrow 6), dependiendo de los carbonos cuyos grupos hidroxilo (-OH) intervengan en la formación del enlace.
- *Rafimifacimientos*: número y posición de otros sacáridos ramificados dentro del glúcido.

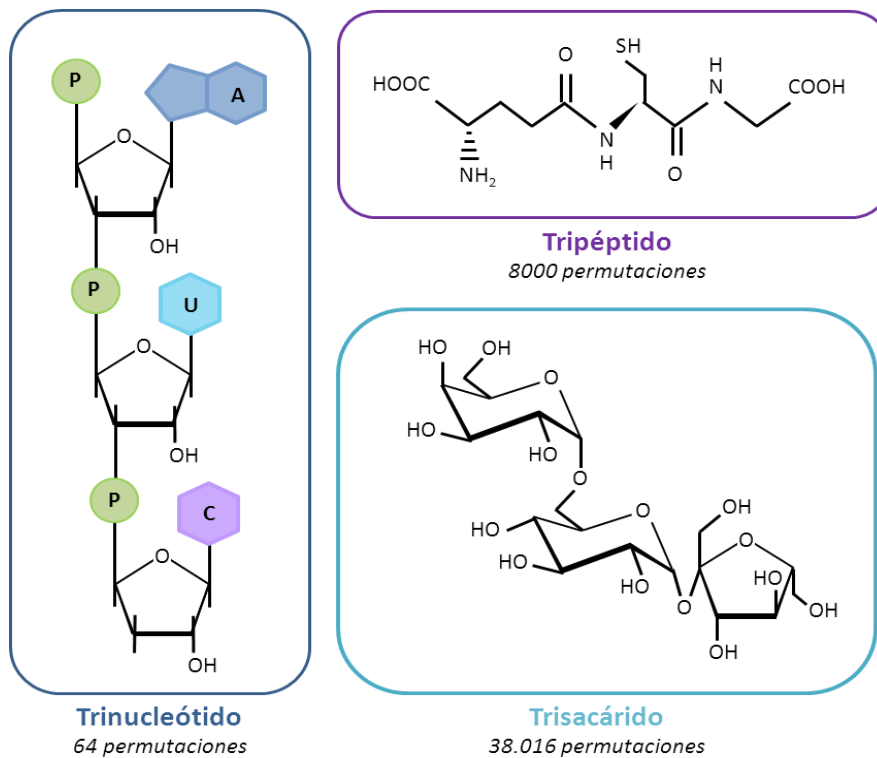


Figura 5. Isoformas posibles de trímeros en diferentes sistemas biológicos. En el esquema se proponen 3 ejemplos de trímeros en diferentes sistemas. El **trinucleótido** (en el ejemplo de adenina, uracilo y citosina), se genera combinando las 4 bases que constituyen el ADN de hasta 64 formas diferentes. Un **tripéptido** (en el ejemplo se representa la estructura del glutatión, compuesto por L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina) surge de la combinación de 3 de los 20 aa que existen, la cual se puede presentar de 8000 formas distintas. Por último, un **trisacárido** (en el ejemplo la rafinosa, un oligosacárido característico de plantas), mediante la combinación de monómeros de azúcar y teniendo en cuenta las distintas variables como el tipo de anillo, anómero, posibles enlaces y posibles ramificaciones, podemos encontrarlo como un total de 38.016 isómeros diferentes.

Si a todo lo anterior le sumamos las sustituciones específicas que pueden darse en cada molécula (fosforilación, acilación, sulfatación, reducción, oxidación, etc.), encontramos que a la funcionalidad se le suma una gran especificidad. Disponemos de varios ejemplos de moléculas que dependen de la especificidad de, por ejemplo, grupos sulfato o fosfato situados estratégicamente en su estructura para llevar a cabo su función biológica, como es el caso de la manosa, cuya fosforilación en el C6 (carbono 6) determina que actúe como activador de cascadas enzimáticas; también tenemos la sulfatación del C3 del epítipo GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc de las células HNK (*human natural killer*), el cual está involucrado en el proceso de adhesión y migración de estas células en el sistema nervioso; o en el caso de la heparina, un grupo O-sulfato en el C5 del monómero central es esencial para su actividad anticoagulante (Rüdiger & Gabius 2009).

Esta compleja red de azúcares conocida como “*glicoma*”, es característica de cada tipo de célula y se puede considerar como una firma de glicosilación celular (*glycosilation signature*), (Laderach et al 2010). Por todo esto, en los últimos tiempos ha habido un continuo crecimiento en el interés por la **glicobiología**, en concreto por el estudio de su papel como un gran almacén de información biológica substanciada en el nuevo concepto del **código de azúcares** (*sugar-code*; Gabius et al 2002). Este campo ha dado pie a la elaboración de nuevas aproximaciones a los mecanismos de reconocimiento inter-celular, o la unión de ligandos a receptores a nivel intra o extracelular (Gabius et al 2002). También se ha demostrado la importancia de los sacáridos a nivel tisular, donde el cambio o la pérdida de carbohidratos puede afectar a sus propiedades celulares, e influir en el correcto funcionamiento del sistema inmune, la capacidad operativa de varios agentes infecciosos, o incluso la progresión de un cáncer (Gabius 1997, Ramstrom et al 2002, Rabinovich et al 2007).

4.2 Los glicoconjugados en la neurona.

No se conoce en detalle la función de los polisacáridos y de los glicoconjugados en la fisiología de las neuronas, aunque se ha descrito que su presencia en la superficie neuronal incide directamente en las interacciones con la glía circundante y en el desarrollo del sistema nervioso (Yanagisawa & Yu 2007). En el desarrollo neuronal, la síntesis de glicoconjugados está regulada espacial y temporalmente desde sus primeras etapas. La concentración y la distribución de los glicanos asociados a lípidos y proteínas de la membrana celular, son importantes en las interacciones entre las células del sistema nervioso y su entorno (Gabius 2006, Nagae & Yamaguchi 2012). Así por ejemplo, se ha comprobado que la mielina que contacta directamente con la membrana axonal, presenta un aumento en su composición de glicanos de tipo N o N-glicanos (un tipo de azúcares unidos a residuos de aspargina de las proteínas), en especial los de tipo N-acetilgalactosamina (GalNAc), con respecto al resto de mielina compactada que no contacta con la neurona. Este hecho determina que de alguna forma que aún se desconoce, los N-glicanos están jugando un papel fundamental durante el proceso de mielinización (Ishii et al 2007).

En esta línea, las proteínas de adhesión celular N-CAM tienen una especial importancia, así como las lectinas de tipo I (información ampliada en el epígrafe 4.4), o la proteína MAG (*myelin-associated glycoprotein*), que interviene en el reconocimiento entre oligocendrocitos y neuronas, paso previo a la mielinización axonal (Gabius 1997). Algunos miembros de las CAMs

que presentan N-glicanos en su estructura, son fundamentales para el correcto reconocimiento de estas proteínas con sus dianas, y sus alteraciones dan lugar a situaciones patológicas (Zhao et al 2008). Así, la correcta N-glicosilación de las integrinas influye directamente en su papel mediador de la adhesión celular y la motilidad pudiendo dar lugar a la aparición de fenotipos tumorales, o incluso puede modificar el papel que la proteína desempeña durante la neuritogénesis impidiendo el correcto desarrollo de la neurona (Zhao et al 2008). También ha sido estudiado el caso de la cadherina-E, en la que un fallo en el proceso de N-glicosilación de la misma impide la unión de su ligando específico (la β -catenina) y modifica la capacidad de formar uniones intercelulares y, por tanto, la correcta formación de tejidos (Zhao et al 2008).

En paralelo a lo anterior, resulta obvio pensar que la distribución y función de las lectinas que se unen específicamente a estos carbohidratos sea, al menos, igualmente importante. Entre ellas, las galectinas objeto de este trabajo, comienzan a ser piezas fundamentales como se detalla más adelante en el epígrafe 5.5.

4.3 Los glicoconjugados en la matriz extracelular.

La MEC es un entramado tridimensional de proteínas y carbohidratos dispuesto en el espacio intercelular. Entre sus múltiples funciones, aporta propiedades mecánicas a los tejidos, mantiene la forma de la célula, permite su adhesión, la comunicación intercelular y regula procesos como el crecimiento y la diferenciación celular entre otros (Porcionatto 2006).

Su composición y su cantidad son muy variables en función del tejido que se considere, siendo poco abundante en el caso del tejido nervioso (Barros et al 2011). Pero independientemente del tejido que se trate, las moléculas que la componen suelen ser las mismas: colágeno, elastina, GAGs y diversas glicoproteínas asociadas a la membrana o integrales de la misma, que son las más importantes a la hora de mediar uniones entre la célula y su entorno (Hynes 1999, Luo et al 2007), (figura 6). Es un espacio moldeable gracias a la continua formación y destrucción de conexiones entre sus componentes y con las células del tejido. Esta dinámica está mediada por la acción de enzimas proteolíticas como proteopeptidasas de colágeno, metaloproteinasas de la membrana plasmática, elastasas, serín estererasas, etc. También intervienen enzimas encargadas de hidrolizar los carbohidratos, las glicosidasas.

De esta forma, la matriz cambia y se adapta en función de los requerimientos del tejido en cada situación (Lu et al 2012).

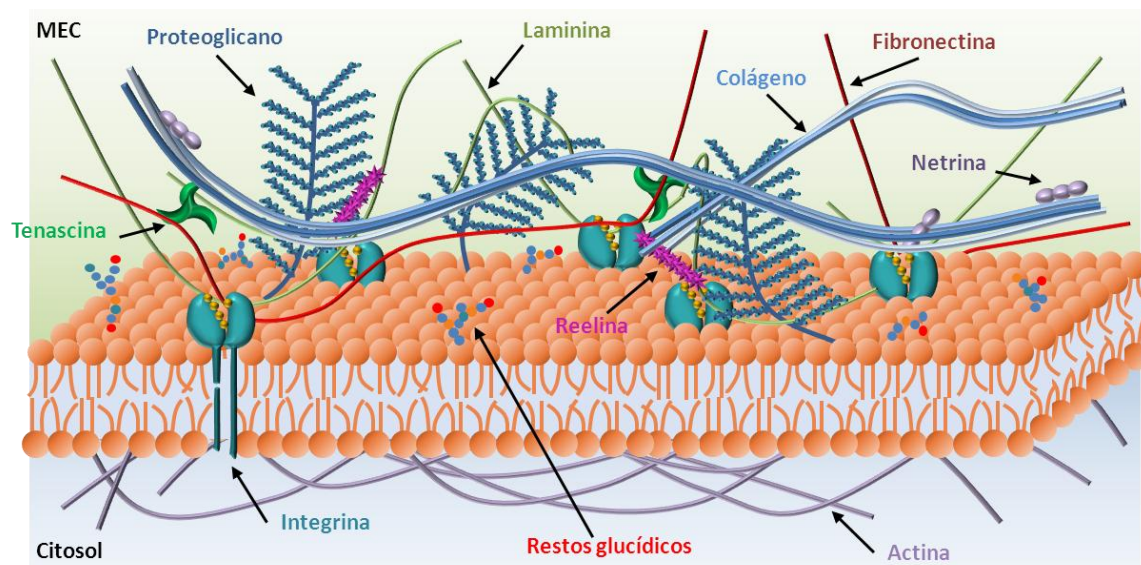


Figura 6. Esquema de la estructura y composición de la MEC. En la figura se representan algunos de los principales componentes de la MEC, incluyendo las integrinas, que interconectan el medio externo de la célula con los filamentos de actina dentro de ella.

El **colágeno** es el componente más abundante de la MEC, y se encarga de proveer de estructura y elasticidad a la misma. Está compuesto por 3 cadenas polipeptídicas enrolladas entre sí en forma de triple hélice, que da lugar a fibras flexibles que se distribuyen por la matriz. Forma uniones con otras glicoproteínas como laminina, elastinas, fibronectina y fibrinógeno (Porcionatto 2006, Dityatev & Schachner 2006).

La **laminina** es una glicoproteína compuesta por 3 cadenas polipeptídicas (α , β y γ) unidas por puentes disulfuro, que incluyen diversos puntos de unión a integrinas. Es el principal componente de la MEC en tejido nervioso, y tiene un papel fundamental en la formación y mantenimiento de la lámina basal. Además, promueve la diferenciación y migración de células durante el desarrollo del sistema nervioso, y permite la interacción con glicoproteínas (en especial integrinas) potenciando el crecimiento neurítico, atrayendo los axones para regular la guía axonal y promoviendo la diferenciación de oligodendrocitos y por tanto la mielinización (Porcionatto 2006, Dityatev & Schachner 2006).

La **fibronectina** es una molécula fibrilar compuesta por 3 pares de cadenas de polipéptidos unidas por enlaces disulfuro, con cargas negativas en sus extremos que regulan su

capacidad de agregación y por tanto su solubilidad. Al igual que la laminina, actúa mediante su interacción con integrinas. Además de regular la solubilidad de la MEC, es fundamental como mediadora de la regeneración axonal (Tonge et al 2012).

Los **proteoglicanos** son el segundo componente más abundante. Se encargan también de dar estructura a la par que estimulan o inhiben diversos procesos biológicos como el desarrollo y la migración neuronal, mediante su interacción con otras moléculas de la MEC (Hynes & Naba 2012). Son glicoproteínas cuya parte glicosídica está formada por unidades repetidas de GAGs. La unión de los GAGs confiere al proteoglicano unas características estructurales y funcionales particulares según el tipo, actuando como moduladores de señales gracias a su reconocimiento por proteínas de unión a carbohidrato de tipo lectina. En el caso particular del sistema nervioso, los dos GAGs más abundantes son el sulfato de heparina y el sulfato de condroitina, aunque podemos encontrar otros tipos como sulfato de queratina, ácido hialurónico, etc. El sulfato de condroitina o **condroitín sulfato** se compone de unidades repetidas de ácido D-glucorónico (GlcA) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) sulfatada en las posiciones 4 o 6; su principal función en el sistema nervioso se lleva a cabo durante el desarrollo, ejerciendo un efecto inhibitor del crecimiento y de repulsión de los axones (al contrario que la laminina). El sulfato de heparina o **heparán sulfato** se compone de GlcA unido a residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) sulfatada en la posición 6; es un componente importante de la MEC en el sistema nervioso, y aunque resulta inocuo para el crecimiento y la guía neuronal (Porcionatto 2006), desempeña un importante papel en el reclutamiento de varios tipos de factores de crecimiento como el bFGF (*basic fibroblast growth factor*), actuando como un cofactor que media la unión del bFGF con su receptor específico (Yanagisawa & Yu 2007).

Las glicoproteínas son fundamentales para mediar las interacciones de la célula con la MEC, o entre los propios componentes de la matriz. Además de las ya mencionadas (laminina, fibronectina, proteoglicanos, etc.), como ya se ha mencionado anteriormente, las **integrinas** juegan un papel especialmente importante al interconectar la MEC con proteínas del citoesqueleto o mediadoras de diversas cascadas de señalización (Yurchenco 2011), (figura 6). Otras glicoproteínas abundantes en el sistema nervioso son las moléculas extracelulares tenascina, reelina y netrina. Las **tenascinas** se expresan durante la neurogénesis, regulan la orientación, adhesión y migración de las neuronas durante el desarrollo embrionario, y son fundamentales durante el proceso de diferenciación de oligodendrocitos e inhibición del crecimiento axonal, favoreciendo por tanto la mielinización. La **reelina**, ampliamente expresada durante los procesos de migración de neuronas, es muy importante para el correcto desarrollo

embrionario del sistema nervioso, ya que regula la formación del citoesqueleto de actina y el tráfico vesicular mediante la activación de la enzima Rap1 GTPasa y la cadherina N (Jossin & Cooper 2011). La **netrina**, es secretada y asociada a la MEC a fin de dirigir el crecimiento axonal como moléculas atrayentes o repelentes del cono de crecimiento, en función de los receptores que éste presente en su superficie (Porcionatto 2006, Hynes & Naba 2012).

4.4 Estructura y función de las Lectinas.

Las lectinas son las moléculas encargadas de decodificar la información contenida en los carbohidratos; de hecho, su nombre deriva del latín *legere*, que significa seleccionar. Se trata de glicoproteínas de origen no inmune con capacidad de unión específica y reversible a mono u oligosacáridos, pudiendo unir cada una de ellas uno o más carbohidratos a la vez. Su estructura se basa en una cadena polipeptídica que además, puede llevar unido o no, uno o más residuos de carbohidrato (normalmente de 2 a 5 monosacáridos). Todas ellas se caracterizan por la presencia de, al menos, un dominio de reconocimiento y unión específica a carbohidratos denominado CRD (*Carbohydrate recognition domain*), cuya estructura se explica en profundidad más adelante. Las interacciones proteína-carbohidrato por medio del CRD, aunque relativamente débiles (fundamentalmente puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals con una constante de disociación de 10^{-4} M; Rabinovich et al 2007), son extremadamente específicas y selectivas, y ocasionalmente están reguladas por la presencia de otros carbohidratos que actúan inhibidores competitivos.

Las lectinas median en fenómenos de reconocimiento tanto a nivel molecular como celular (Gabius et al 2002). Un ejemplo bien conocido es su papel durante la aglutinación celular, gracias a su capacidad de unir carbohidratos de la superficie de las células (Gabius et al 2004). Esta capacidad de aglutinación resulta hoy día una herramienta muy útil para un procedimiento tan habitual como es la caracterización e identificación de grupos sanguíneos humanos, gracias a que cada grupo presenta una composición en azúcares única, detectada mediante hemaglutinación empleando lectinas (Gabius et al 2004). También, han sido ampliamente estudiada su utilidad como marcadores tumorales debido a su capacidad para regular la adhesión celular, y su activación o inhibición de la apoptosis en células cancerígenas (Danguy et al 2002).

Las lectinas se clasifican en subfamilias en función de su estructura y del tipo de polisacárido que reconocen:

- **Tipo C (C-type):** Presentan un dominio CRD muy conservado a lo largo de la evolución, y su unión a residuos de tipo carbohidrato depende de la presencia de iones Ca^{2+} . Se caracterizan también por su capacidad de unirse entre sí de forma no covalente y formar multímeros con varias unidades de CRD. Estas disposiciones específicas son importantes para el reconocimiento tridimensional de determinados tipos de ligandos que se presentan como acumulaciones de cadenas de carbohidrato.

Unen diferentes tipos de azúcares como manosa, galactosa, fucosa o heparín tetrasacáridos. Según el ligando que unan y la estructura que adquieran, podremos encontrar diferentes miembros dentro de la familia de las C-type, entre los cuales destacan las proteínas tipo **Selectinas-L, -P y -E**, que reconocen leucocitos, plaquetas y células endoteliales respectivamente (Gabius 1997, Gabius et al 2002, Gabius et al 2004).

- **Tipo I (I-type):** Debido a su estructura con un único CRD, dos láminas plegadas tipo β y un interior con carácter hidrofóbico, fueron clasificadas inicialmente “tipo inmunoglobulina” (de ahí su nombre). Unen diferentes tipos de polisacáridos ricos en residuos de manosa (*high-mannose*; $\text{Man}_6\text{GlcNac}_2$), epítomos tipo HNK-1 (*human natural killer-1*), ácido hialurónico y $\alpha 2,3/\alpha 2,6$ -sialolactosa (Gabius et al 2002, Gabius et al 2004).

Dentro de esta familia cabe destacar a las proteínas de adhesión celular tipo **ICAM-1, PECAM-1 y N-CAM** (Gabius 1997). Esta última, actúa durante la adhesión de células de los sistemas nerviosos central y periférico. Otro componente de esta familia, con relevancia en el desarrollo del sistema nervioso, es la proteína **MAG**, que mediante su unión a gangliósidos de membrana ricos en ácido siálico, media la interacción entre las neuronas y los oligodendrocitos o las células de Schwann, manteniendo así la estabilidad del contacto entre la membrana de los axones y la mielina que los recubre (Gabius 1997).

- **Tipo S (S-type) o galectinas:** Presentan uno o dos CRDs evolutivamente conservados cuya unión a ligando es independiente de la presencia de cationes divalentes. Se denominan tipo S debido a que inicialmente se les atribuyó un carácter soluble, cuestión que ahora se torna imprecisa, debido a que otras lectinas presentan esta misma propiedad. Su principal ligando son los glicoconjugados tipo β -galactósido (un glucósido conteniente en galactosa, cuyo enlace glicosídico es de tipo β). Algunas de ellas presentan capacidad de formar dímeros o multímeros. En el apartado 5 a continuación, se tratan con detalle las

características y funciones de esta familia de lectinas (Gabius 1997, Gabius et al 2002, Gabius et al 2004).

- **Pentaxinas:** Se caracterizan por su capacidad de formar estructuras pentaméricas a partir de sus CRD. Unen glúcidos de tipo β -galactosa, galactosa, y monosacáridos sulfatados o fosforilados. Su función está relacionada con la inmunidad innata, y también con la respuesta inflamatoria (Gabius 1997, Bottazzi et al 2006).
- **Tipo P (*P-type*):** Con un dominio CRD aún poco conocido, algunos miembros de ésta subfamilia se unen a sus ligandos de forma dependiente de cationes divalentes, mientras que otros lo harán de forma independiente a éstos.

Reconocen estructuras ricas en manosa-6-fosfato presentes en algunas glicoproteínas, como es el caso de algunas enzimas lisosomales, que gracias a su interacción con estas lectinas, son activadas y guiadas hacia los lisosomas para ejercer su función. Este hecho se ha relacionado con la capacidad de reconocimiento de diversas enzimas de degradación de proteoglicanos en la superficie celular, en colaboración con lectinas de tipo C que reconocen específicamente residuos de manosa (Gabius 1997, Gabius et al 2002, Varki & Kornfeld 2009).

Como se puede comprobar en el anterior listado, estas cinco subfamilias de lectinas son en su conjunto fundamentales para el correcto funcionamiento celular debido a que intervienen en procesos de señalización (selectinas y pentaxinas), e interacciones célula-célula (reconocimiento entre la neurona y la glía), o en el mantenimiento de estructuras celulares (como veremos más adelante en el caso de las galectinas), (Brewer et al 2002). La pérdida o baja expresión de algunas de estas proteínas puede conllevar severas patologías, como es el caso de la pérdida de alguno de los tipos de selectinas, que afectan al correcto funcionamiento del proceso de reconocimiento leucocitario y por tanto, de la respuesta inmunitaria. En otros casos, como en el de las lectinas de tipo I, pueden suceder alteraciones embrionarias graves, como un desarrollo incorrecto del bulbo olfatorio (al disminuir la expresión de N-CAM), o baja mielinización (al disminuir MAG). La pérdida de lectinas de tipo P conlleva la pérdida de enzimas lisosomales, resultando un fenotipo letal (Gabius 1997).

5. La familia de las Galectinas.

5.1 Descubrimiento, antecedentes y definición.

Aunque su descubrimiento se llevó a cabo durante los años 70 a raíz de numerosos estudios de embriogénesis y desarrollo, las galectinas como tal, fueron descritas por primera vez por Samuel H. Barondes en el año 1994 (Barondes et al 1994a, Barondes et al 1994b), gracias al seguimiento de trabajos basados en la hipótesis de que los carbohidratos de la superficie de la membrana plasmática deberían tomar parte en la adhesión de la célula (Leffler et al 2004). En su inicio, estas lectinas fueron descritas como proteínas independientes y nombradas de diversas formas en base a su función y a su descubrimiento, como es el caso de la electrolectina, CLL-I y II, L-14, L-29, L-31, CBP35, galaptina, etc. (Leffler & Barondes 1986, Leffler et al 1989). Todas estas proteínas pasaron a formar parte de la numerosa familia de las galectinas, descrita en los años 90, adquiriendo la nomenclatura que hoy conocemos, que abarca desde la Gal-1 hasta la 15 (en el caso de los mamíferos), y su distribución en tres subfamilias con estructuras comunes entre sí (Cooper & Barondes 1999). Al igual que ha ocurrido con la glicobiología, el estudio de las galectinas como herramientas para decodificar la información contenida en los glicoconjugados de las células, también ha derivado en una rama de estudio de estas proteínas denominada **galectinómica** (Cooper 2002, Kuno et al 2005, Rabinovich et al 2007, Andre et al 2007).

Actualmente se definen las galectinas como una familia de proteínas de unión a carbohidrato (lectinas), con una alta afinidad por la unión de polisacáridos del tipo β -galactósido. Entre sus principales características, encontramos que son proteínas muy conservadas a lo largo de la evolución (Houzelstein et al 2004), y que tienen un carácter soluble. Una vez sintetizadas por la célula, pueden ser almacenadas, transportadas e incluso secretadas. Ejercen, por tanto, funciones no solo desde la MEC (como reconocimiento intercelular) o a nivel de la membrana plasmática (como señalización, adhesión e inmunidad; Rabinovich et al 2007), sino también a nivel intracelular (como regulación del ciclo celular; Liu et al 2002). Aunque su mayor afinidad de unión sea por los β -galactósidos, también pueden unir con diferentes afinidades otros sacáridos complejos u otros ligandos intracelulares, como es el caso de algunas proteínas relacionadas con procesos de traducción de RNA y apoptosis, como por ejemplo los miembros de la familia Ras a las que se une la galectina-1 (Gal-1), o las proteínas Bcl-2 o Gemin4 a las que se une la galectina-3 (Gal-3), (Liu et al 2002).

5.2 Estructura y tipos.

Las galectinas reconocen específicamente unidades repetitivas de disacáridos como la N-acetilglucosamina (Gal β 1 \rightarrow 4-GlcNAc o LacNAc), unidades de disacáridos ramificados del tipo N-acetilgalactosamina (GalNAc), ambos presentes en los N-glicanos, o bien otro tipo de formaciones repetitivas de disacáridos del tipo cadenas de poly-N-acetilglucosamina presentes en N- y O-glicanos (glicanos unidos a proteínas por residuos de asparagina o de serina respectivamente), (Hirabayashi et al 2002). La afinidad de unión de las galectinas a este tipo de sacáridos, es directamente proporcional a la cantidad de LacNAc y GalNAc que contengan los N-glicanos (Hirabayashi et al 2002, Rabinovich et al 2007).

Estas uniones se efectúan a través de un dominio de 135 aa y aproximadamente unos 15 kDa de peso molecular (peso variable entre los CRDs de las distintas galectinas). Este dominio altamente conservado desde los invertebrados inferiores hasta los mamíferos, se conoce como **dominio de reconocimiento de carbohidratos** (*Carbohydrate recognition domain; CRD*). Presenta una estructura β -láminar compuesta por 11 láminas β ligeramente dobladas y situadas de forma antiparalela, 5 de ellas forman un lado convexo (F1-F5), y las otras 6 un lado cóncavo (S1-S6). Es ésta última, la parte encargada de unir carbohidratos (Cooper 2002, Leffler et al 2004, Laderach et al 2010), (figura 7).

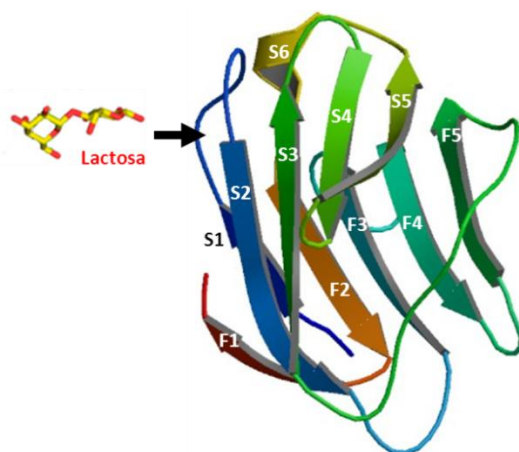


Figura 7. Representación tridimensional del dominio de unión a carbohidrato (CRD) de las galectinas.

La estructura en β -lámina antiparalela está formada por 6 láminas nombradas desde la S1 a la S6 que forman un lado cóncavo, y 5 láminas nombradas desde la F1 a la F5 que forman un lado convexo. El lado cóncavo alberga la hendidura donde se unirán los carbohidratos (como por ejemplo la lactosa representada en la figura).

Figura adaptada de la original, representación del CRD de las galectinas, disponible en la web:

<<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2JJ6>>

Hasta el momento se han identificado 15 miembros diferentes de la familia de las galectinas de mamífero, que se clasifican en base a su estructura en tres subfamilias denominadas prototipo, quimera y de repetición en tándem (figura 8).

La subfamilia de galectinas **prototipo** (*proto-type*), incluye a las galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -13, -14 y -15. Sus componentes están formados por un único dominio CRD que, en algunos casos, pueden formar homodímeros bivalentes por unión no covalente como en la Gal-1, al contrario que la galectina-5, que solo ejerce su función como monómero (Cooper 2002).

Dentro de la subfamilia de tipo **quimera** (*quimera-type*), hasta ahora sólo se conoce a la Gal-3. Está formada por un único CRD en su extremo C-terminal, un dominio N-terminal mediante el cual pueden formar homodímeros u oligómeros por unión no covalente o covalente, y un dominio central de unión entre ambos extremos, el cual es susceptible de escisión, dando lugar por tanto a la liberación de una forma truncada compuesta exclusivamente por el dominio CRD. El dominio N-terminal es además rico en serinas fosforilables y puede dar lugar a una forma fosforilada y activa de Gal-3 (Cooper 2002).

La familia de las galectinas con repetición tipo **tándem** (*tándem-repeat*), incluye a las galectinas -4, -6, -8, -9 y -12. Se caracterizan por la presencia de dos dominios CRD dentro de la misma cadena polipeptídica, de forma que presentan una estructura bivalente, aunque cada CRD pueda reconocer estructuras sacarídicas sutilmente diferentes. Los dominios CRD se conectan por dominios de unión (*linker*), que aunque de función desconocida, se encuentran ampliamente conservados evolutivamente, lo que sugiere que su estructura y su disposición están íntimamente ligados al correcto funcionamiento de la proteína (Cooper 2002, Nishi et al 2005).

Dada la especial importancia de las galectinas-3 y -4 en este trabajo, su estructura y función se describen exhaustivamente en los apartados 5.5.A y 5.5.B a continuación.

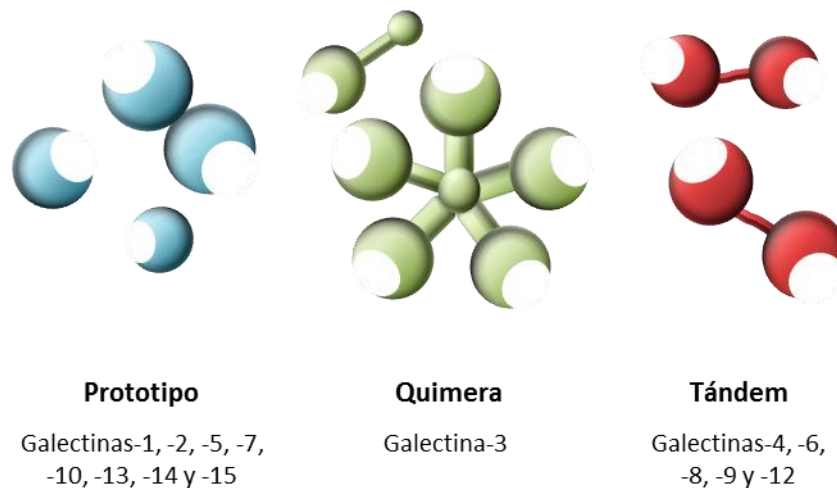


Figura 8. Representación esquemática de las tres subfamilias de galectinas. La figura muestra los principales miembros de cada subfamilia de galectinas, así como la estructura típica de cada una de ellas. La subfamilia **prototipo** se componen de un CRD que puede formar homodrímeros. Las **quimera**, compuestas por un CRD en su extremo C-terminal, un extremo N-terminal, fosforilable, por medio del cual pueden unirse y formar dímeros o pentámeros, y un dominio de unión o dominio R entre ambos extremos. Por último, las de tipo **tándem** compuestas por dos dominios CRD, uno en cada extremo N y C-terminales, conectados por un dominio de unión o *linker*.

5.3 Función.

Las galectinas son moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Su secuencia de aminoácidos conservada filogenéticamente (hasta un 80% de homología entre las galectinas de ratón y las humanas; Houzelstein et al 2004), junto al hecho de que se encuentran ampliamente expresadas en múltiples órganos y tejidos, sugieren que estas proteínas podrían cumplir funciones fisiológicas esenciales (Cooper 2002, Leffler et al 2004, Laderach et al 2010).

A día de hoy se han estudiado los diversos papeles que estas proteínas ejercen sobre diferentes procesos biológicos desde el interior o el exterior de la célula. A nivel intracelular, está el caso ya mencionado la regulación de la traducción de RNA y la apoptosis por unión de la Gal-1 a las proteínas Ras, o la unión de Gal-3 a Bcl-2 y Gemin4 (Liu et al 2002). También pueden mediar el ciclo celular mediante la regulación del reciclaje de receptores pro-apoptóticos (como TGF β R y CTLA-4) y de receptores de crecimiento (como EGFR, IGFR, FGFR y PDGFR), (Hernandez & Baum 2002, Rabinovich et al 2007), (figura 9).

Otro proceso en el que encontramos galectinas involucradas, es la regulación del desarrollo del sistema nervioso; en este caso, la Gal-1 regula el crecimiento de los axones por interacción con proteínas de la membrana como N-CAM (Storan et al 2004), y participa en la proliferación y el desarrollo del sistema nervioso, mediante la regulación de las señales de transducción de la célula, aunque estos mecanismos no son completamente conocidos a día de hoy (Vasta et al 2004, Yanagisawa & Yu 2007).

La capacidad de las galectinas de regulación del destino celular (supervivencia y apoptosis), así como la mediación de la adhesión, migración y proliferación celular, hace que se encuentren involucradas en numerosos procesos patológicos como cáncer y neurodegeneración (Laderach et al 2010). Esto ha hecho que sean consideradas como unos excelentes marcadores de malignidad tumoral (Cooper 2002, Rabinovich et al 2002, Danguy et al 2002, Liu & Rabinovich 2005, Smetana et al 2006, Laderach et al 2010, Stancic et al 2011).

A nivel extracelular, encontramos otras funciones como por ejemplo la mediación durante procesos de inmunomodulación, donde la Gal-3 es capaz de promover la agregación de neutrófilos y fagocitos, y la Gal-1 de estimular la producción del receptor de células-T (TCR) que intervienen en la respuesta inmune (Vasta et al 2004), a la vez que estimula la producción de especies reactivas de oxígeno, proteasas y la secreción de interleukina-8, responsables de los procesos de inflamación (Rabinovich et al 2007).

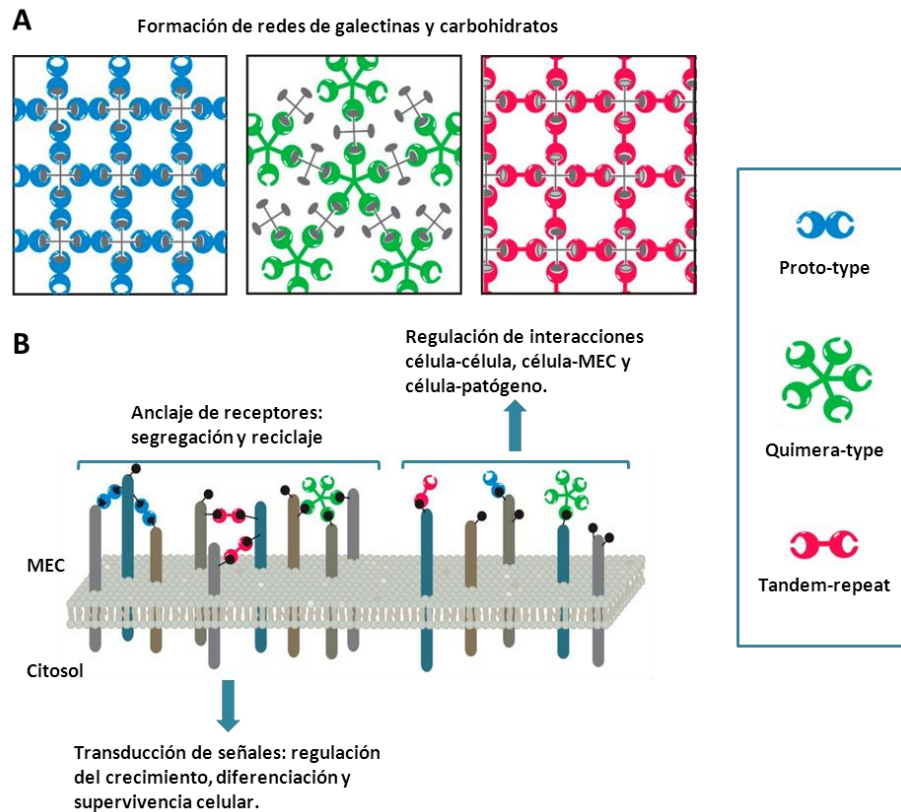


Figura 9. Redes de galectinas y funciones en la membrana plasmática. A) Esquema de la posible formación de redes de galectinas en función de la estructura de las mismas. **B)** Posibles funciones que pueden desarrollar las galectinas adheridas en la superficie de la membrana plasmática. Figura adaptada de Rabinovich et al (2007).

Las galectinas también son importantes durante la regulación de la adhesión de las células a un sustrato y la migración. Cabe destacar el papel de Gal-1, que media la formación de puntos de adhesión celular (conocidos como *focal adhesions*), y el de la Gal-3, que permite la migración de la células interconectando la célula con elementos de la MEC por medio de integrinas (Elola et al 2007). Pero además, la capacidad de las galectinas de unirse entre sí y formar multímeros o de unirse a otras proteínas a la vez (Cooper 2002, Brewer 2002), propicia la creación de redes de proteínas gracias a uniones termodinámicamente favorables entre lectinas y sacáridos en la superficie celular (Brewer 2004). Estas interacciones son una parte integral e imprescindible de la señalización celular y la adhesión de la célula a un sustrato o a otra célula, mediante segregación y reciclaje de receptores de membrana, o actuando como puntos de interacción intercelular o entre la célula y su entorno (Brewer 2002, Rabinovich et al 2007), (figura 9). En este apartado, está bien descrita la función de Gal-3 como intermediario de la unión de proteínas de MEC como laminina y fibronectina, a determinadas proteínas de la superficie celular como integrinas o N-CAM (Elola et al 2007).

5.4 Localización y transporte.

Hasta el momento se han detectado expresión de este tipo de proteínas en diferentes células así como en diferentes compartimentos celulares, y, como ya se ha comentado, se les ha adjudicado diversas funciones tanto intracelulares como extracelulares. Este hecho indica que estas proteínas deben ser externalizadas en algún momento tras su formación en la célula.

Se sabe que las galectinas no poseen péptido líder en su secuencia primaria, hecho que impide su secreción por la vía clásica dependiente de retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (Hughes 1999, Nickel 2003). Además, aunque estructuralmente presentan características típicas de proteínas citoplásmicas, como por ejemplo acetilaciones en el extremo N-terminal o capacidad de glicosilarse, nunca se encuentran en los compartimentos típicos de la vía de secreción clásica (Cooper 2002, Smetana et al 2006).

Actualmente se desconoce el mecanismo por el cual las galectinas son expulsadas al medio extracelular, aunque se barajan diferentes posibilidades. Por este motivo se ha denominado hasta el momento a este proceso como una expulsión por **vía atípica** o **no clásica** (Nickel 2003), denominada por algunos autores como **ectocitosis** (Krzeslak & Lipinska 2004), que se basa en el transporte de lectinas mediante endosomas y exosomas (Leffler et al 2004).

5.5 Las galectinas en la neurona.

Hasta la fecha, se sabe relativamente poco de la función en el sistema nervioso de los glicoconjugados en general, y de las galectinas en particular. Recientemente, tanto los glicoconjugados de la superficie de las células del sistema nervioso (Yanagisawa & Yu 2007) como las galectinas que los reconocen, han sido relacionadas con procesos de crecimiento y neuritogénesis (galectinas 1 y 5 de mamífero, o galectina-16 de pollo; Kopitz et al 2004, Kalovidouris et al 2005, Yanagisawa & Yu 2007) o con la guía de axones en crecimiento (galectina-16 de pollo atrae al axón que crece, mientras que la galectina-5 lo repele; Kopitz et al 2004). También se han encontrado involucradas en procesos de regeneración de axones lesionados (Kopitz et al 2004, Stancic et al 2012) y de protección de las células lesionadas gracias a que ejercen un efecto neuroprotector (Gal-1 en neuronas del SNP; McGraw et al 2005, Chang-Hong et al 2005). También se ha estudiado la presencia de ciertos miembros de la familia en determinadas células del sistema nervioso, como por ejemplo en neuronas primarias olfativas de

rata, donde la Gal-3 aparece como un elemento importante de las células envolventes de la submucosa, y las galectinas-4, -7 y -8, presentan efectos positivos sobre la guía de neuronas en crecimiento axonal desde la cavidad nasal hasta el bulbo olfatorio (Storan et al 2004).

Como se puede comprobar en los anteriores apartados, la mayor parte de estos estudios hacen referencia a galectinas de la familia prototipo, en especial el caso de la Gal-1, y a la galectina de la familia de tipo quimera, Gal-3.

Hasta la fecha no se ha llevado a cabo un estudio sistemático de los efectos y funciones de las distintas galectinas en el sistema nervioso. En vista de recientes trabajos que describen implicaciones de la Gal-3 en procesos de desarrollo neuronal (Goetz et al 2008), y de la galectina-4 (Gal-4) en polaridad epitelial (Stechly et al 2009), micro-organización de la membrana plasmática (Braccia et al 2003) y mielinización (Stancic et al 2012), el presente estudio se centra en un estudio más exhaustivo de estas lectinas.

5.5.A La Galectina-3.

La Gal-3 fue denominada Mac-2 por Bobby J. Cherayl en el año 1990, quien la describió como una lectina de macrófagos con unión específica a galactosa (Cherayil et al 1990). Estudios posteriores la adjudicaron diferentes nombres sin saber que se trataba de la misma proteína, como por ejemplo CBP-35 (proteína ligante de carbohidratos 35), L-29, L-34, IgEBP (proteína de unión a IgE) o LBP (Herrmann et al 1993, Huflejt et al 1993, Krzeslak & Lipinska 2004). Fue en el año 1994, cuando Samuel H. Barondes catalogó la familia de las galectinas, momento en el que incluyó la Gal-3 como un miembro de la misma familia que las galectinas-1, -2 y -4 (Barondes et al 1994a, Barondes et al 1994b).

Como se ha indicado anteriormente, se trata del único miembro descrito de la subfamilia de las galectinas de tipo quimera. Es una proteína no glicosilada, soluble, monomérica y con un peso molecular que oscila según la especie entre los 26 KDa de la galectina de rata hasta los 31 KDa en humanos, con una especial afinidad por la unión a lactosa (Lac) y a N-acetilactosamina (LacNAc), y con menor afinidad por la glucosa (Glc) y N-acetilglucosamina (GlcNAc), así como otros ligandos que contengan residuos de poli-N-acetilactosamina formados por Gal β 1,4GlcNAc, y también por oligosacáridos más complejos que contengan terminaciones no reducidas del tipo

ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc α 2,3, también llamado NANA o ácido siálico), GalNAc (GalNAc α 1,3) o fucosa (Fuc- α 1,2), (Krzeslak & Lipinska 2004).

De la misma forma que otras galectinas su síntesis es citoplasmática y por tanto, se localiza principalmente en compartimentos celulares como el núcleo o el citoplasma, aunque también puede ser exocitada por la vía no-clásica a la MEC y encontrarse asociada a la cara externa de la membrana plasmática (Lindstedt et al 1993). Además, se ha comprobado que la proteína también puede ser endocitada por interacción con microdominios de balsas lipídicas de membrana en las caveolas (Ochieng et al 2004), hecho fundamental para su función moduladora de la adhesión y de la migración celular (Hsu et al 2009).

En el caso de la Gal-3 humana, está codificada por el gen LGALS3 localizado en el cromosoma 14 (14q21-q22). Este gen se compone de seis exones y cinco intrones, con un peso total de 17 Kb (Kuklinski & Probstmeier 1998).

Molecularmente, se compone de tres dominios proteicos (Cooper 2002, Krzeslak & Lipinska 2004):

- Dominio amino-terminal (N-terminal) largo y flexible, compuesto por entre 100 y 150 residuos de aminoácidos, con una secuencia repetitiva de 9 aa ricos en prolina, glicina, tirosina y glutamina. Presenta también una secuencia conservada NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg) equivalente al dominio BH1 de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Takenaka et al 2004). Las serinas 6 y 12 (Ser⁶ y Ser¹²) serán susceptibles de sufrir fosforilación por la enzima caseína-kinasa I (CKI) (figura 8), (Mazurek et al 2000), generando una forma fosforilada y funcional de la proteína denominada **pGal-3**. Éste dominio además, puede ser proteolizado por ciertos tipos de metaloproteasas como MMP-2 o MMP-9. A través de este extremo N-terminal, la Gal-3 puede formar uniones covalentes con ligandos polipeptídicos y polinucleotídicos ricos en glutamina, por acción de la enzima transglutaminasa (TGasa), que generan agregados moleculares consigo misma o con otro tipo de lectinas, los cuales también cumplen funciones biológicas como el mantenimiento de las neuritas (Mehul et al 1995, Mahoney et al 2000).
- Dominio R o dominio de unión, compuesto por 10 aa repetidos ricos en prolina, glicina y treonina. Se trata de una estructura similar a la que podríamos encontrar en

proteínas como la synexina o la synaptofisina, que puede ser proteolizada por la enzima colagenasa, dando lugar a una forma truncada de la galectina pero biológicamente activa, formada básicamente por un dominio C-terminal (Kuklinski & Probstmeier 1998, Elola et al 2007), (figura 8).

- Dominio carboxi-terminal (C-terminal), se trata del dominio CRD encargado del reconocimiento de carbohidratos. Compuesto por 135 aa, presenta una estructura tridimensional similar a la de los dominios CRD de las galectinas 1 y 2, con quienes comparte entre un 20 y un 25% de su secuencia (Krzeslak & Lipinska 2004).

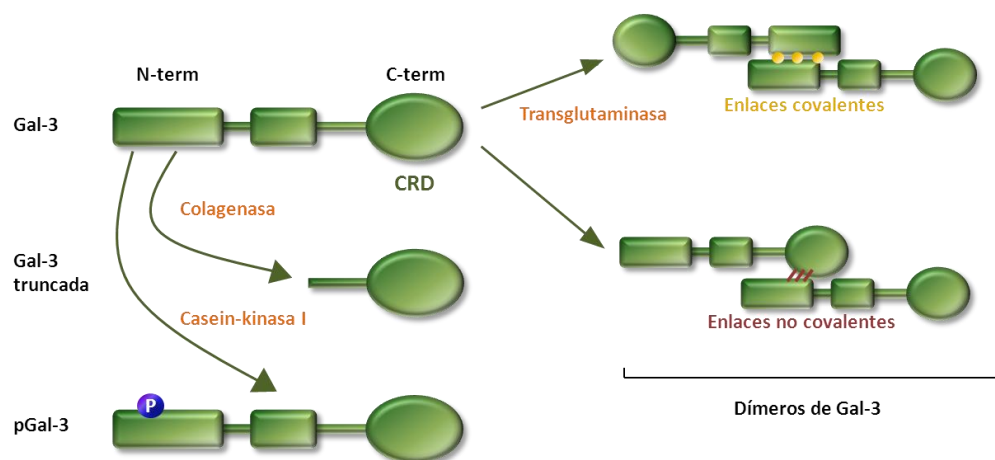


Figura 10. Estructura de la galectina-3 y posibles estructuras derivadas de la misma. En el esquema se muestra el proceso de escisión por colagenasa que genera la forma truncada de la proteína, y la fosforilación en el extremo N-terminal que da lugar a la forma denominada pGal-3. Se muestran también las dos posibles combinaciones que pueden generar estructuras dimericas de la galectina mediante diferentes tipos de enlaces: un enlace covalente entre dos extremos N-terminal formado por acción de la enzima TGasa, o un enlace de tipo no covalente entre un extremo N-terminal y un C-terminal.

Esta galectina actúa de forma dependiente o no de la unión a carbohidratos. Puede formar dímeros bien uniéndose de forma no covalente un extremo N-terminal a un C-terminal, o bien, gracias a la enzima transglutaminasa, uniéndose covalentemente dos unidades por su extremo N-terminal (Mehul et al 1995). También puede unir covalentemente más de dos unidades de galectina-3 para formar estructuras pentaméricas, que junto a la monomérica, son las más habituales (Kuklinski & Probstmeier 1998, Mahoney et al 2000, Ahmad et al 2004a), (figura 10). La capacidad de formar dímeros y pentámeros confiere a la proteína diferentes

capacidades de unión y entrecruzamiento de carbohidratos en función de la estructura con la que se presenten (Cooper 2002, Morris et al 2004).

La Gal-3 se ha encontrado ampliamente expresada en células monocíticas, eosinófilos, neutrófilos y macrófagos, así como en una amplia variedad de tejidos tales como colon, mama, estómago, cerebro, ovario, hígado o riñón (Krzeslak & Lipinska 2004). Como ya se ha mencionado, esta lectina se caracteriza por su capacidad de presentar variantes estructurales funcionales. Se ha postulado que la fosforilación de Gal-3 por la enzima caseína-quinasa I se lleva a cabo en el núcleo de la célula, para que posteriormente la molécula pueda ser exportada al citoplasma y exocitada por la llamada vía “no clásica” de secreción de galectinas. Este tipo de modificación actúa como un modulador de la funcionalidad de la proteína. De hecho, se ha demostrado que la defosforilación de la pGal-3 mediante la intervención de la enzima PP1, actúa como mecanismo de regulación intrínseca de la señalización en los diferentes procesos celulares en los que dicha proteína está implicada (Mazurek et al 2000, Yoshii et al 2002), regulando su presencia en núcleo y su exportación al citoplasma (Takenaka et al 2004). También se ha postulado que el balance de la concentración entre la forma monomérica y la forma pentamérica de la galectina llevada a cabo por acción de la enzima TGasa, tiene un efecto regulador de la actividad de la misma a nivel intracelular, debido a que cada estructura tiene unas funciones diferentes (Ahmad et al 2004a).

A nivel intracelular, la Gal-3 nuclear está implicada en la regulación del procesamiento de mRNA y en protección frente a la apoptosis por parada del ciclo celular en la fase G1, mediante su unión a proteínas citoplasmáticas como las citokeratinas, CBP70, Chrp, etc., o a proteínas nucleares del tipo de la Gemin-4 o las ciclinas (Mazurek et al 2000, Yoshii et al 2002). Esta acción tiene que ver con la secuencia de aminoácidos mencionada previamente NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg), idéntica a la secuencia que compone el dominio BH1 de las proteínas de la familia Bcl-2, responsable de la actividad antiapoptótica de las mismas (Takenaka et al 2004). Por todo esto, diversos estudios han relacionado la sobreexpresión de la Gal-3 con una pérdida de la capacidad para regular la muerte celular programada, hecho que está ligado a neoplasias del tipo linfoma o carcinoma (Krzeslak & Lipinska 2004).

Por otro lado, a nivel de la cara extracelular de la célula, se ha comprobado que la forma fosforilada pGal-3 está vinculada a procesos de adhesión y migración celular gracias a su unión a proteínas de la MEC como laminina, fibronectina, MAG o proteínas de la membrana plasmática relacionadas con adhesión celular como integrinas o N-CAMs (Saravanan et al 2009). En este sentido, es importante la conformación pentamérica de la proteína, ya que esto le permite unir

diversos ligandos a la vez. Se ha demostrado, que la Gal-3 desempeña un papel estimulador de la secreción y expresión de las integrinas en la superficie celular, y además, promueve la fosforilación y activación de la caveolina-1 y la activación de la enzima *focal adhesion kinase* (FAK) responsable de la formación de nuevos puntos de anclaje de la célula con su entorno (los denominados *focal adhesions*) y mejorando así su adhesión y migración (Goetz et al 2008). También estimula la secreción del colágeno a la MEC y la formación de lamelipodios ricos en filamentos de actina, que unido a los anteriores factores, mejoran la adhesión y estimulan la migración celular (Ochieng et al 2004, Goetz et al 2008, Saravanan et al 2009, Hsu et al 2009). Otro papel atribuido a la Gal-3 a nivel de la membrana celular, es su papel durante el reclutamiento y posterior clasificación de proteínas de membrana no asociadas a balsas lipídicas que contengan residuos de N y O-glicanos, para anclarlas al dominio apical de células de tipo epitelial y mantener así una estructura diferenciada del dominio basolateral, característica de estas células (Delacour et al 2006, Delacour et al 2007).

Se trata por tanto de una proteína muy ligada a procesos de embriogénesis tales como angiogénesis, adhesión, proliferación celular o regulación de la supervivencia mediante control del ciclo celular, o también a procesos posteriores como la modulación de la respuesta inmune por activación de los linfocitos T y los macrófagos (Mazurek et al 2000, Krzeslak & Lipinska 2004, Ochieng et al 2004).

Hasta la fecha, se ha publicado mucho acerca del papel de la Gal-3 en metástasis y progresión cancerígena, pero también se ha estudiado el papel de dicha molécula en el sistema nervioso. Se ha descrito su papel como potenciador del desarrollo y el crecimiento axonal en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Pesheva et al 1998), y también su efecto inhibitor de la proliferación y estimulador de la degeneración celular por activación de la respuesta inmune tras lesiones en el sistema nervioso periférico (Narciso et al 2009, Venkatesan et al 2010). Se ha presentado como factor clave durante el desarrollo en procesos de migración neuronal hacia el bulbo olfatorio (Comte et al 2011). Además, recientemente se ha comprobado que la galectina tiene un claro papel como potenciador de la diferenciación de oligodendrocitos y activador de la mielinización (Pasquini et al 2011).

5.5.B La Galectina-4.

En 1989, Hakon Leffler aisló del intestino de rata una nueva lectina soluble con un peso molecular de 17 KDa (Leffler et al 1989). Unos años después, en 1992, Yuko Oda consiguió clonar su cDNA y describió esta misma proteína, pero indicó que estaba compuesta de dos dominios de unión a carbohidrato distintos y que tenía un peso molecular de aproximadamente 36 KDa, correspondiendo los 17 KDa anteriormente descritos a cada una de las dos unidades de unión a carbohidrato. Denominó a esta proteína L-36 (Oda et al 1993). Pero una vez más, fue Barondes quien la catalogó dos años más tarde como el cuarto miembro de la familia de las galectinas (Barondes et al 1994a, Barondes et al 1994b).

La Gal-4 en humanos está codificada por el gen LGALS4, localizado en el cromosoma 19 (19q13.1-q2), (Huflejt & Leffler 2004). Pertenece a la familia de las galectinas de tipo tándem. Es una proteína soluble, monomérica, compuesta por un total de 324 aa y con un peso molecular de 36 KDa. Se compone de dos dominios CRD de aproximadamente 140 aa cada uno, que comparten en torno a un 35% de la secuencia entre ellos y con el dominio CRD de la Gal-3, y hasta un 15% con el resto de dominios CRD de otras galectinas. Ambos dominios CRD presentan diferentes afinidades de unión a carbohidrato entre ellos, y diferentes a otras galectinas. Separando ambos CRD, encontramos un tercer dominio de la proteína, el dominio de unión (*linker*), similar al dominio R de la Gal-3. Es un dominio rico en prolina y glicina, y con una flexibilidad estructural limitada a causa de los propios residuos de prolina (Oda et al 1993), el cual se ha demostrado que es imprescindible para el correcto funcionamiento de la proteína, probablemente porque permita a que la lectina adopte una conformación espacial determinada y necesaria para poder llevar a cabo su función biológica (Kopitz et al 2012), (figura 11).

Ambos dominios presentan afinidad por la unión a lactosa (Lac), galactosa (Gal) y glicanos más complejos como tetrosas del tipo lacto-N-tetraosa (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), o lacto-N-neo-tetraosa (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), (Wu et al 2002). Pero lo que caracteriza a esta galectina, es que sobre todo presentan una fuerte afinidad por la unión de glicoesfingolípidos con residuos 3-O-sulfatados (SO₃⁻ → 3Gal β 1 → 3GalNAc) o sulfátidos, como son el SB1a, SM3, SM4s, SB2, SM2a, aunque también puede unir con gran afinidad otros glicoesfingolípidos sin sulfátidos como el GM1 (Ideo et al 2005). Otra característica excepcional de esta galectina, es que presenta alta afinidad de unión a colesterol-3-sulfato (carente de β -galactósidos), pero no es capaz de unir colesterol no sulfatado (Ideo et al 2007). Cabe destacar

que tienen una baja afinidad por la unión de glicoesfingolípidos con otros residuos cargados con ácido siálico, como sLc4Cer, snLc4Cer, GM2, GM3 o GM4 (Ideo et al 2005). Otras dianas son los N-glicanos, especialmente aquellos que ricos en manosa (con entre 5 y 8 residuos de manosa, conocidos como *high-manosa*), que son glicanos complejos formados por N-acetilactosamina (LacNAc) con dos manosas reducidas (Gal β 1,4-GlcNAc) y los glicanos híbridos compuestos por LacNAc junto cinco manosas (solo una de ellas reducidas), (Stechly et al 2009). Pero estas afinidades de unión son diferentes en cada dominio, presentando cada uno diferentes niveles de afinidad por sulfátidos o por residuos no cargados (Ideo et al 2003); de hecho, el CRD I correspondiente al N-terminal, presenta una mayor afinidad de unión a tetrasacáridos lineales o tetrosas que el CRD II o C-terminal (Wu et al 2002; Wu et al 2004), mientras que el CRD II tiene una mayor afinidad para unir sulfátidos que el CRD I (Ideo et al 2005).

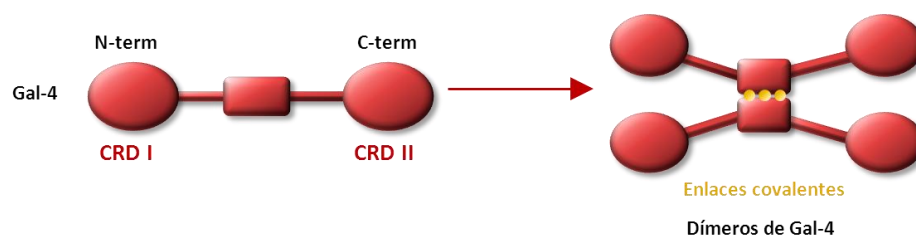


Figura 11. Estructura de la galectina-4; configuración monomérica y dimérica. En el esquema de Gal-4 monomérica, así como el proceso de dimerización que da lugar a una estructura con cuatro unidades CRD.

Aunque por lo general se encuentra en forma monomérica, la Gal-4 también puede dimerizar en solución (aunque aún no se ha descubierto la enzima encargada de la unión), generando una estructura compuesta por cuatro CRDs y con una gran actividad dependiente de la unión a carbohidrato (Ideo et al 2007) .

Al igual que ocurría con las demás galectinas, Gal-4 se sintetiza y se acumula en el citosol de las células, aunque en determinadas circunstancias también puede encontrarse acumulada en el núcleo, en el medio extracelular o sobre la superficie de la célula (Danielsen & van Deurs 1997). En el caso de esta galectina en concreto, se ha postulado que en las células epiteliales, la externalización de Gal-4 depende de su transporte por las rutas de transcitosis o la vía *trans-Golgi Network*; TGN). Esta última ruta se lleva a cabo mediante vesículas de exocitosis ricas en sulfátidos, a los cuales queda unida la galectina hasta llegar a su destino en la

zona apical de las células (Stechly et al 2009). Una vez la galectina llega a la zona, se desconoce de qué forma se transloca para situarse en la cara externa de la membrana plasmática, aunque si se ha comprobado que una vez ha ejercido su función puede ser endocitada nuevamente para ser reciclada y reutilizada (Delacour et al 2005).

Los análisis de expresión del mRNA de la Gal-4, han mostrado que se encuentra ampliamente expresada en las mucosas de intestino grueso, intestino delgado, esófago y estómago, pero no se ha detectado en otros órganos como huesos, hígado, páncreas, músculo liso o músculo esquelético (Oda et al 1993, Danielsen & van Deurs 1997, Gitt et al 1998). Los tejidos intestinales están compuestos por células epiteliales cuyas superficies son ricas en colesterol-3-sulfato y en N-glicanos. Gracias a este hecho, la Gal-4 está muy distribuida en esta zona, donde se asocia a proteínas que intervienen en la formación de uniones adherentes de las células (Danielsen & van Deurs 1997, Huflejt & Leffler 2004). Gal-4 también interviene en el mecanismo de defensa de la mucosa intestinal frente a los ácidos y enzimas digestivos, y en el transporte de glicoproteínas que contengan glicanos de tipo O (Wu et al 2002). Además, se ha comprobado que estas uniones de gran afinidad entre la galectina y los sulfátidos y las glicoproteínas N y O-glicosiladas de la región apical de células endoteliales, juegan un papel esencial en la formación y mantenimiento de un tipo de balsas lipídicas de membrana altamente organizadas a las que se ha denominado *super-rafts* (ver epígrafe 3 sobre las balsas de membrana) (Hansen et al 2001, Braccia et al 2003, Delacour et al 2005, Danielsen & Hansen 2006). Estas balsas de membrana son una característica fisiológica y diferencial de la cara apical de las células epiteliales, y desempeñan un papel fundamental para el reclutamiento y mantenimiento de acúmulos de glicoproteínas apicales en estas zonas (Stechly et al 2009). Además, se ha comprobado que el mecanismo de reciclaje de glicoproteínas mediante exocitosis y posterior recuperación con endosomas es esencial para el correcto desarrollo apical y el tráfico de proteínas de las células epiteliales (Stechly et al 2009), al igual que el transporte y translocación de Gal-4 a las mismas zonas mediante transcitosis. De hecho, la presencia de Gal-4 en las vesículas de transporte hacia estas zonas apicales de la membrana de células epiteliales, es un factor fundamental para que las glicoproteínas que deben situarse en las balsas lipídicas de la membrana lleguen a su destino y se mantengan en su posición (Stechly et al 2009).

Al igual que ocurre con otras galectinas como la Gal-3, la Gal-4 ha sido propuesta como un eficaz marcador tumoral. Esto es debido a que varios trabajos han encontrado un aumento de su expresión en fenotipos malignos ligados a varios tipos carcinomas, como cáncer de colon, de mama, de hígado o de estómago. En todos estos casos, el aumento de esta lectina va siempre

asociado a un exceso de proliferación de células cancerígenas, muy diferenciadas y que forman monocapas polarizadas (Huflejt & Leffler 2004). Este fenómeno cobra sentido teniendo en cuenta las ya mencionadas propiedades de la galectina en la adhesión y la formación uniones intercelulares (Danielsen & van Deurs 1997), así como al mantenimiento de la polaridad de las células (Hansen et al 2001, Delacour et al 2005).

Hasta el momento, se sabe muy poco respecto a las posibles funciones que pudiera desempeñar la Gal-4 en el sistema nervioso. Los primeros estudios de esta galectina a nivel de expresión tanto de proteína recombinante como de su mRNA, indicaban que no existía en tejidos del sistema nervioso central o periférico (Oda et al 1993), aunque esto actualmente está descartado. Recientemente se ha descrito expresión de Gal-4 en células del sistema nervioso central. Esta galectina está asociada al desarrollo de los axones de las neuronas del bulbo olfatorio desde estadios embrionarios, quedando restringida su expresión en la edad adulta a células mitrales, glomerulares y de las capas granulares del bulbo; la función que desempeña la lectina en esta zona está relacionada con su capacidad de unir, mediante su 2 CRDs, dos subpoblaciones de axones que expresen distintos tipos de proteínas N-CAM, o incluso ayudar a dirigir los axones en crecimiento hacia la capa glomerular (Storan et al 2004).

Otros trabajos, describen el papel de Gal-4 como potenciador de la mielinización por parte de los oligodendrocitos por unión a los factores de transcripción de p27 y Sp1, formando un tándem que a su vez promueve la expresión de la proteína básica de mielina MBP (*myelin basic protein*), (Wei et al 2007). También ha sido descrita la implicación de Gal-4 en la mielinización de las neuronas de la raíz de los ganglios dorsales (DRG), donde la lectina es expresada en oligodendrocitos inmaduros y premielinizantes e impide que estos terminen su desarrollo, hasta que una disminución en la expresión de esta proteína desencadena el comienzo de la mielinización (Stancic et al 2012).

Hipótesis y objetivos

Los glicoconjugados juegan un papel central en la regulación de las interacciones moleculares que ocurren durante los diferentes procesos neuronales. Basándonos en el nuevo concepto del código de azúcares (Gabiús et al 2002) y en la actual ausencia de estudios que profundicen en el papel de los carbohidratos en el sistema nervioso, nuestro grupo ha desarrollado un sistema experimental para el estudio sistemático y cuantitativo de los efectos de una importante familia de proteínas que unen carbohidratos, las galectinas, sobre determinados procesos de la fisiología neuronal. Este sistema se basa en el uso de galectinas recombinantes de mamífero combinadas con cultivos primarios de neuronas de rata. Este estudio aborda dos aspectos generales y fundamentales como son, la expresión y localización de estas proteínas en células del sistema nervioso central y periférico, y su función o efecto sobre el desarrollo y la diferenciación neuronal.

Del estudio de las galectinas de mamífero Gal-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 9, incluyendo en algunos casos variantes de algunas de ellas con modificaciones estructurales, se perfilaron varias vías de investigación. De entre ellas, dos de las más novedosas se escogieron para desarrollarse en esta tesis doctoral, planteando las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis 1:

“Las diversas formas de la Gal-3, regulan diferencialmente la maduración de las neuronas del sistema nervioso central”.

Hipótesis 2:

“La Gal-4 se expresa en el sistema nervioso central, y modula el crecimiento axonal”.

Para el abordaje de éstas hipótesis de trabajo, nos planteamos los siguientes **objetivos**:

Objetivos referentes a la hipótesis 1:

1. Estudio de los efectos de las distintas formas de Gal-3 sobre el crecimiento y guía axonal en neuronas hipocampales de rata.
2. Estudio de los efectos de las distintas formas de Gal-3 presentadas como sustrato o como soluto en el medio de cultivo.
3. Determinación del mecanismo bioquímico por el cual Gal-3 controla los efectos observados en neuronas.

Objetivos referentes a la hipótesis 2:

1. Estudio de la expresión de Gal-4 en cultivos celulares y tejido del sistema nervioso central.
2. Estudio de los efectos de la administración de Gal-4 de forma exógena sobre neuronas hipocampales de rata.
3. Estudio de los efectos de la modulación de los niveles de expresión de Gal-4 endógena sobre las células que la expresen.
4. Estudio de los posibles mecanismos bioquímicos del papel de Gal-4 en el desarrollo y crecimiento neuronales.

Materiales y métodos

I. CULTIVOS CELULARES.

1. Cultivo primario de neuronas corticales e hipocampales.

Los cultivos de neuronas hipocampales y de neuronas corticales de rata se obtuvieron a partir de embriones de 18 días de gestación (E18) de rata Wistar (Harlan) a partir del protocolo descrito por Goslin y Banker en 1989 (Goslin & Banker 1989, Kaech & Banker 2006). El motivo por el que se eligieron células de E18 concretamente, es porque a los 18 días de gestación, la gran mayoría de las neuronas hipocampales han finalizado su división celular, pero la diferenciación no ha acabado completamente, encontrándose en el momento ideal para el estudio de su desarrollo (Dotti et al 1988).

Para la obtención de estas células, se extrajo el cerebro de los embriones y se diseccionó el hipocampo y la corteza cerebral; el tejido fue limpiado de restos de meninges y lavado con solución tamponada de Hank libre de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , atemperada a 37°C (HBSS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; compuesto por 137mM NaCl, 5.36mM KCl, 0.34mM Na_2HPO_4 , 0.44mM KH_2PO_4 , 4.2mM NaHCO_3 , 5.6mM glucosa, pH 7.4). Los tejidos limpios, cada uno por separado, fueron disgregados mecánicamente con una pipeta Pasteur de vidrio y tripsinizados durante 15 minutos a 37°C . Se hicieron lavados de nuevo con HBSS con iones Ca^{2+} y Mg^{2+} (HBSS; compuesto por 137mM NaCl, 5.36mM KCl, 1.26mM CaCl_2 , 0.5mM MgCl_2 , 0.4mM MgSO_4 , 0.34mM Na_2HPO_4 , 0.44mM KH_2PO_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).

El material empleado para sembrar las células una vez disgregadas fueron placas Petri de 60 milímetros (Nunc) recubiertas de Poly-L-Lysina (PLL) o bien placas con cubreobjetos (CVs) de vidrio (Marienfeld) también recubiertos con PLL o PLL y galectina para realizar los cultivos de neuronas sobre sustratos específicos (ver epígrafe 2 sobre los tratamientos neuronales). Para realizar este tipo de recubrimientos, se rellenaron las placas de plástico con una suspensión de PLL a 0.1 mg/ml, y se mantuvieron durante 12 horas a 37°C . Para el recubrimiento de los CVs, se utilizaron vidrios preparados con ácido nítrico, lavados con agua destilada y esterilizados por calor seco (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 a una concentración de 1 mg/ml y se mantuvieron durante 12 horas a 37°C . Tras varios lavados con agua destilada estéril, el material quedó listo para los cultivos celulares (figura 12, paso 1).

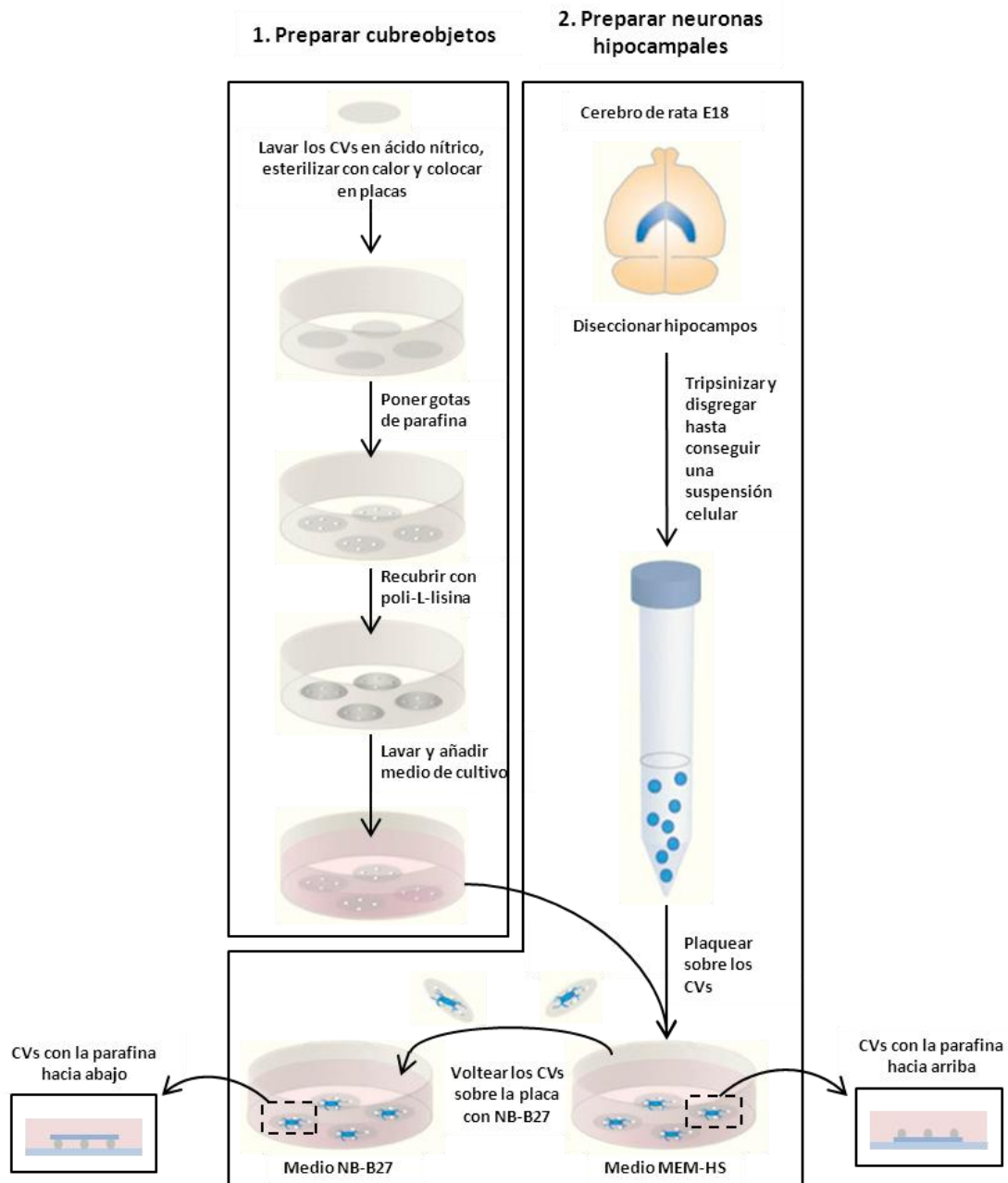


Figura 12. Esquema del proceso de extracción y cultivo de neuronas hipocámpicas primarias. En la parte izquierda de la figura (paso 1), se muestra esquemáticamente la forma de preparación de CVs de vidrio recubiertos de PLL y con gotas de parafina para el cultivo de neuronas. En la zona derecha e inferior de la figura (paso 2), se representa el proceso de extracción de hipocampos, la obtención a partir de los mismos y la siembra de neuronas hipocámpicas sobre los CVs previamente preparados. Figura adaptada de Kaech & Banker (2006).

Las suspensiones celulares se sembraron a una densidad de 15×10^4 células por placa de 60 milímetros en las que se incluyeron o no unos CVs también recubiertos de PLL, 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 CO₂ 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 la parte inferior. Esta placa contenía medio Neurobasal suplementado con 2% de B-27 y 0.5 mM de L-Glutamina (NB-B27), previamente atemperado y equilibrado a 5% de CO₂ (figura 12, paso 2).

Para los estudios bioquímicos, se cultivaron neuronas corticales de embriones E18 de rata, sobre placas Petri recubiertas de PLL o de PLL y galectina, con medio MEM-HS, a una densidad de 2×10^6 células por placa de 60 centímetros. Pasadas las primeras 24 h, el medio se sustituyó por Neurobasal/B27/Glutamina previamente atemperado, y las células se procesaron pasados 5-7 días de cultivo *in vitro*.

2. Cultivo primario de astrocitos.

Para la obtención de cultivos de astrocitos primarios a alta densidad, se siguió el protocolo descrito por McCarthy & de Vellis (McCarthy & de Vellis 1980). Para ello se emplearon ratas Wistar de entre 1 y 3 días de vida (P1-P3), de las cuales se extrajeron las cortezas cerebrales limpiando lo máximo posible de otros tejidos que pudieran quedar adheridos. Se realizaron sucesivos lavados con HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, tras los cuales se dejó un período de 15 minutos a 37°C con HBSS con iones divalentes para favorecer la autodigestión del tejido por activación de las enzimas endógenas. Tras realizar una disgregación mecánica con una pipeta Pasteur de vidrio, el extracto celular obtenido fue filtrado con una maya de Nylon de 70 µm de diámetro de poro (SAATI-Ibérica), se centrifugaron 10 minutos a 1000 rpm, y se plaquearon en frascos de cultivo de 75 cm² (Nunc) previamente recubiertos de PLL (siguiendo el mismo protocolo que para el recubrimiento de placas de cultivo), a una relación de aproximadamente de 7.5×10^6 células por frasco. Se mantuvieron en medio *Dubelcco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bobino (FBS) y 1% de penicilina-estreptomicina, en incubador con atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y 37°C (figura 13).

El medio de los frascos se cambió cada 3 días y, transcurridas entre 1 y 2 semanas de cultivo, los astrocitos alcanzaron su máxima confluencia. A continuación las monocapas se tripsinizaron y se plaquearon las células disgregadas en placas de cultivo de 60 milímetros sin recubrir con PLL para que solo los astrocitos se adhirieran al plástico (2×10^6 células por placa).

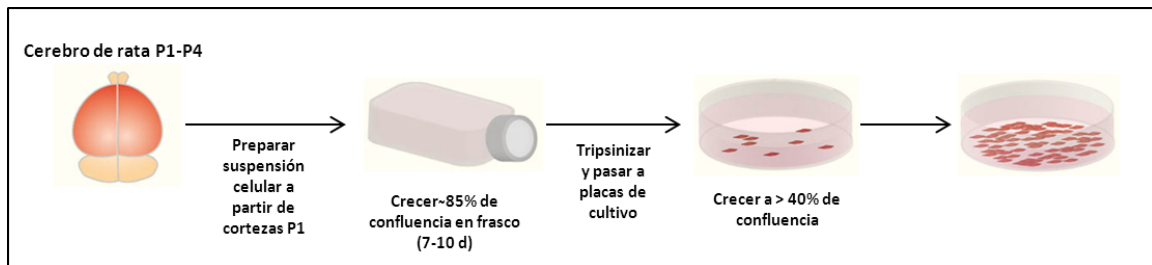


Figura 13. Esquema del proceso de extracción y cultivo de astrocitos primarios. En la figura se representa esquemáticamente el proceso de extracción de cortezas de cerebro de rata y posterior obtención y cultivo de astrocitos a partir de éste tejido. Figura adaptada de Kaech & Banker (2006).

Todos los experimentos con animales cumplieron con las directrices internacionales sobre el uso ético de los animales del Consejo de Bioética de la Comunidad Europea, establecidas a fecha 24 de noviembre de 1986 (86/6091 EEC), así como con las directrices del comité Institucional de bienestar animal del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo (SESCAM).

3. Cultivo de células PC12.

Las células PC12 provenientes de feocromocitoma de rata, se plaquearon sobre placas de cultivo de 90 milímetros recubiertas de PLL, y se mantuvieron con medio DMEM suplementado con 7.5% de FBS, 7.5% de HS y 2mM de glutamina, en un incubador con atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y 37°C.

En los casos en que así se requirió, las PC12 se dejaron crecer hasta alcanzar aproximadamente un 50-60% de confluencia, y se suplementó el medio con factor de crecimiento neural NGF a una concentración final de 50 ng/ml, a fin de promover la expresión de la proteína L1.

II. ESTUDIOS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR.

4. Tratamientos neuronales.

4.1 Galectinas recombinantes y complejos con heparán sulfato.

Las diferentes formas de galectinas humanas se obtuvieron por un proceso de producción recombinante, mediante purificación por cromatografía de afinidad en Sefarosa-4B-lactosilada. Su pureza se controló mediante electroforesis en gel de una y dos dimensiones y con espectrometría de masas (Andre et al 2006, Kubler et al 2008, Andre et al 2008, Martin-Santamaria et al 2011, Andre et al 2012), (figura 14).

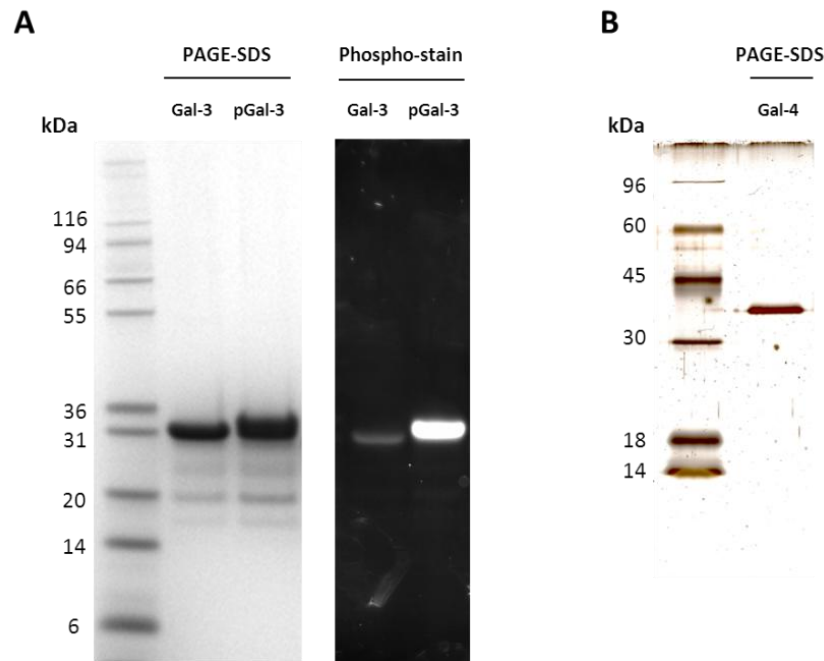


Figura 14. Control de calidad de la producción de Gal-3 recombinante y fosforilada, y de Gal-4.

A) El panel de la izquierda muestra los productos obtenidos de la purificación de Gal-3 y pGal-3 en comparación con un control de peso molecular (carril de la izquierda) analizados mediante electroforesis en gel (PAGE-SDS). Se aprecia un pequeño incremento en el peso molecular de la pGal-3 (carril derecho, ~34 kDa) con respecto a su forma nativa (carril central, 31 kDa). El panel de la derecha muestra la señal positiva de la forma fosforilada producida mediante marcaje de grupos fosfato. **B)** Resultado del análisis de la purificación de Gal-4 por PAGE-SDS, comparando la señal de la Gal-4 (carril derecho, 35.9 kDa) con los controles de pesos moleculares (carril izquierdo). Figura original de Kubler et al (2008).

En el caso de la Gal-3, los procesos de biotilización, el truncado proteolítico con colagenasa y la fosforilación con caseína quinasa-1, se llevaron a cabo bajo controles de calidad y ensayos de actividad de la fase sólida y su unión a células como ya se describió anteriormente (Andre et al 2006, Kubler et al 2008), (figura 14).

Los complejos de las diferentes formas de Gal-3 con el proteoglicano heparán sulfato (HS; Sigma), se prepararon mediante la incubación del proteoglicano con cada lectina a una relación 1:5 w/w, y se mantuvieron durante 1 hora a 37°C en agitación suave.

El punto de aplicación del tratamiento con galectinas en solución fue siempre el momento del cambio de medio de cultivo. En el caso de los estudios con galectinas en solución se añadieron las preparaciones de galectinas (en complejos con HS o no) a 25 µg/ml (concentración final), y se procesaron convenientemente cuando las células estuvieron suficientemente desarrolladas (a 48 o 72 hiv según el experimento). Para realizar los tratamientos con recubrimientos de placas o CVs con galectina, una vez hecho el recubrimiento con PLL se prepararon suspensiones con dicha proteína recombinante a 1 mg/ml y se mantuvieron sobre el material 12 horas a 37°C. Tras sucesivos lavados con agua destilada estéril, el material quedó listo para el cultivo de neuronas de la misma manera que cuando se hicieron recubrimientos con PLL.

En el caso de los ensayos con bandas paralelas de sustratos para el estudio de la guía axonal, se realizó el recubrimiento con PLL en primer lugar, y luego se emplearon matrices de silicona con micro-canales en paralelo comunicados todos ellos a partir de un mismo conducto al cual se puede acceder por un orificio externo (Baier & Klostermann 1994). Los CVs pre-tratados con PLL fueron adheridos a la matriz de silicona sobre los micro-canales, y por el orificio de la matriz se inyectaron las soluciones de las diferentes formas de galectina (1 mg/ml) mezcladas con FITC (1 µg/ml), que sirvió para localizar los canales recubiertos de galectina en el microscopio de fluorescencia (figura 15). Se incubaron las soluciones en las matrices durante 3 horas a temperatura ambiente, y se lavaron con tampón fosfato salino (PBS 1X; 8mM NaCl, 0.2mM KCl, 1.44mM Na₂HPO₄, 0.24mM KH₂PO₄, a pH 7.4). Como controles positivos y negativos, se emplearon recubrimientos en bandas con laminina (1 mg/ml) y FITC, o solo FITC, respectivamente.

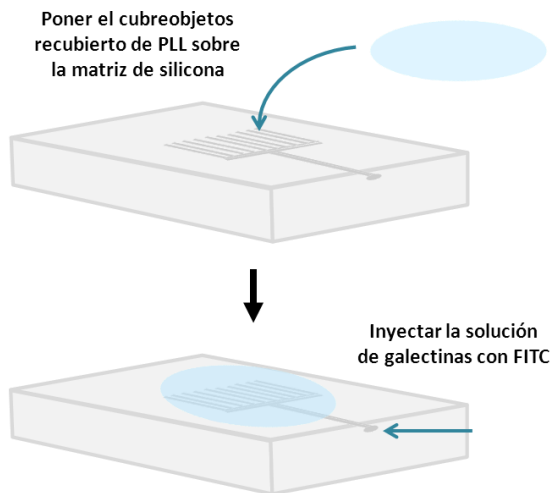


Figura 15. Esquema de la elaboración de bandas paralelas de galectina conjugada con FITC sobre PLL. En la figura se muestra el sistema para elaborar un sustrato en bandas paralelas en CVs mediante el uso de matrices de silicona específicas para este fin.

Para la realización de los ensayos de endocitosis de Gal-4 conjugada con FITC, se incubaron neuronas de 24 hiv con una solución de Gal-4-FITC a 15 mg/ml (concentración final) durante 5 minutos. Las células se fijaron a distintos tiempos tras la incubación, y se marcaron con anticuerpo anti-Rab11 (ver epígrafe 5).

En el caso de los ensayos de endocitosis en células en suspensión, las células antes de ser sembradas en CVs, fueron incubadas con una suspensión de Gal-4-FITC a 50 mg/ml (concentración final) durante 5 minutos a 37°C con agitación suave. Tras una breve centrifugación y un lavado con medio de cultivo, se sembraron de la forma habitual.

4.2 Inhibición metabólica de la sulfatación.

El proceso de sulfatación celular se impidió exponiendo las células a clorato sódico (NaClO_3). Para establecer las condiciones óptimas del tratamiento sobre neuronas cultivadas, se incorporó en el medio de cultivo a neuronas de 24 hiv una solución concentrada de clorato sódico para obtener concentraciones finales de 50, 75 o 100mM, y se mantuvieron distintos tiempos de incubación. De este modo se pudo comprobar que a concentraciones de entre 50 y 75mM de NaClO_3 no se comprometía el correcto crecimiento axonal, pero si a concentraciones superiores a 75mM o tiempos por encima de a las 48 horas de tratamiento. Se eligió como protocolo óptimo que todos los experimentos se harían con 75mM NaClO_3 durante 48 horas de tratamiento. Tras el tratamiento, se procesaron las células para su estudio mediante una inmunocitoquímica para Gal-4 o y F-actina.

Para medir los niveles de expresión de sulfátidos, las células cultivadas durante 2 días se despegaron en agua, se lisaron por ultrasonicación y se centrifugaron durante 10 minutos a 900xg. Tras descartar el precipitado nuclear, se cuantificaron las proteínas del sobrenadante empleando un kit de BCA (ácido biscinoconínico; Bio-Rad). Se extrajeron los lípidos de la muestra con metanol (4 volúmenes) y cloroformo (8 volúmenes). Esta mezcla se centrifugó 1 minuto a 9000xg para precipitar las proteínas. El sobrenadante se dejó secar, y posteriormente se resuspendió de nuevo en cloroformo (2 volúmenes) y metanol (1 volumen). Las muestras se cargaron en una placa de cromatografía en capa fina (TLC) de sílica con fondo de aluminio (Merck, Darmstadt), y los sulfátidos se separaron en una fase móvil de cloroformo (65 volúmenes), metanol (25 volúmenes) y agua (4 volúmenes). Después de secar la placa, se pulverizó con ácido sulfúrico 7% en metanol, y se reveló en un horno a 150°C durante 30 minutos. Las bandas resultantes se cuantificaron por densitometría empleando el software ImageJ (*Image processing and analysis in Java*, NIH, EEUU).

4.3 Extracción parcial de colesterol.

En este caso se empleó Metyl- β -Ciclodextrina (M β C) siguiendo el protocolo descrito previamente (Abad-Rodriguez et al 2004). Neuronas de 24 hiv fueron incubadas con una solución de M β C 500mM (concentración final). Transcurridas 72 hiv de tratamiento, las células se fijaron para hacer inmunocitoquímicas o bien se procesaron para la realización estudios de fraccionamiento de membrana (ver epígrafes 5 y 9 respectivamente).

Los niveles de colesterol se cuantificaron tanto en las células tratadas con M β C como en controles sin tratar mediante colorimetría a 500 nm, con el método enzimático de la colesterol oxidasa siguiendo las instrucciones del fabricante (BioSystems).

4.4 Disrupción del citoesqueleto de actina/tubulina.

Para los estudios de disrupción del citoesqueleto de actina o de tubulina, se emplearon cultivos de neuronas de 72 hiv tratados con nocodazol 7 μ M para despolimerizar microtúbulos, o bien con lantrunculin-A 2.5 μ M para despolimerizar los microfilamentos de actina. Transcurridas 2 horas de cada incubación con el correspondiente tratamiento a 37°C, las células fueron procesadas mediante un análisis por inmunocitoquímica. En el caso de las células tratadas con

nocodazol, se emplearon anticuerpos para Gal-4 y faloidina (visualizándose la F-actina), y en el caso de las células tratadas con lantrunculin-A, se emplearon anticuerpos para Gal-4 y α -tubulina acetilada (visualizándose los microtúbulos).

4.5 Inhibición metabólica de la glicosilación.

Para bloquear el proceso de glicosilación de proteínas se empleó 1-desoxymannojirimicina (DMJ), (McFarlane et al 2000, Delacour et al 2005, Morelle et al 2009, Stechly et al 2009). Neuronas hipocampales de 8 hiv fueron tratadas con una solución 2mM de DMJ (concentración final). Transcurridas las primeras 24 horas de tratamiento, se procesaron para inmunocitoquímica una parte de los CVs con células tratadas, y al resto se le volvió a someter de nuevo al mismo tratamiento de DMJ para procesarlos 24 horas más tarde.

5. Inmunocitoquímica.

Para la realización de las inmunocitoquímicas, las células fueron lavadas con PBS, y fijadas con una solución de paraformaldehído (PFA) 4% y Sacarosa 4% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras otro breve lavado, los grupos aldehído remanentes se enmascararon con una solución de cloruro amónico 50 mM durante 5 minutos. Las células fueron de nuevo lavadas y, cuando procedió, se permeabilizaron las membranas celulares con Triton X-100 0,1% en PBS durante 5 minutos. Las muestras se bloquearon con una solución de 2% FBS, 2% albúmina de suero bovina (BSA), 0.2% gelatina en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron después otra serie de lavados con PBS y se incubaron de nuevo con los correspondientes anticuerpos secundarios anti-especies conjugados con fluoróforos durante 40 minutos a temperatura ambiente. Para los marcajes de F-actina, se añadió faloidina conjugada a un fluoróforo o junto con las incubaciones con anticuerpos secundarios.

Para la realización de marcajes simultáneos de galectinas de membrana junto con α -tubulina acetilada, fue necesario realizar una primera incubación con anticuerpos contra la galectina sin permeabilizar las membranas celulares, seguida de otra incubación con el respectivo anticuerpo secundario anti-especie conjugado con fluoróforo. Una vez concluido este

marcaje, las células fueron fijadas de nuevo y sometidas a una segunda inmunocitoquímica permeabilizando la membrana en esta ocasión para poder marcar con el anticuerpo para tubulina (seguido de su anticuerpo anti-especie).

En el caso de la inmunocitoquímica para anti-Rab-11, las células fueron fijadas en primer lugar con una solución de metanol/EGTA 1mM a -20°C durante 5 minutos, seguido de una segunda fijación con PFA 4%/Sacarosa 4% durante otros 5 minutos. Tras una serie de lavados con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo primario preparado en solución GDB (0.2% BSA, 0.8M NaCl, 0.5% Triton X-100, 30mM buffer fosfato, pH 7.4) durante una noche completa a 4°C. Transcurrido este tiempo se realizaron una serie de lavados con PBS y se añadió el correspondiente anticuerpo secundario anti-especie conjugado con un fluoróforo durante 2 horas a temperatura ambiente (Hoogenraad et al 2010, Eva et al 2010).

En todos los casos, para finalizar la inmunocitoquímica los CVs bien lavados con PBS fueron montados sobre portaobjetos de cristal (Línea LAB) utilizando Mowiol y usando DABCO (1,4-diazabicyclo{2.2.2}octane) como agente anti-apagamiento. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal (Leica SP5), o bien un microscopio de epifluorescencia (Leica DM5000B).

Para los estudios de proteínas de membrana se realizaron experimentos de reclutamiento de proteínas inducido por anticuerpos (*co-patching*). En estos, las neuronas cultivadas durante 72 horas fueron primero lavadas con PBS e incubadas a continuación en medio MEM libre de CO₂ (Air-MEM; NaHCO₃ 3,39mM, hepes 10mM, ácido pirúvico 1mM, glucosa 35,5 mM, L-Glutamina 2mM, MEM 10%), durante 45 minutos a 12°C junto con los anticuerpos primarios correspondientes según el experimento. Después de otro breve lavado, las células fueron incubadas bajo las mismas condiciones con el correspondiente anticuerpo anti-especie conjugado con un fluoróforo. En estas condiciones, los anticuerpos secundarios entrecruzan varias unidades de primario cuando éstas se unen a moléculas suficientemente próximas sobre la membrana, formando acúmulos que llegan a ser visibles en microscopía de fluorescencia convencional o confocal (figura 16). Después, los CVs fueron fijados con PFA al 4% (a excepción de ERM, para el cual se utilizó ácido tricloroacético (TCA) al 10% a 4°C durante 5 minutos; Hayashi et al 1999), y montados sobre portaobjetos.

Se realizaron fotografías con un microscopio confocal y se analizaron con el software ImageJ. Para el análisis del tamaño de los grupos de proteínas y la co-localización entre los mismos, se analizaron diez campos de diez imágenes diferentes para cada experimento. Para

ello, los canales para Thy-1 y L1 se separaron, y se aplicó un umbral para definir los grupos de señal positivos. Las áreas de co-localización se calcularon mediante la superposición de los mapas de puntos positivos (Abad-Rodríguez et al 2004).

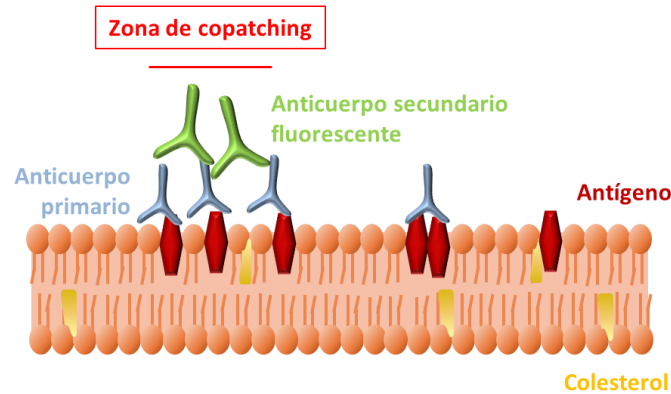


Figura 16. Esquema de elaboración de experimentos de reclutamiento de proteínas sobre la superficie de la membrana inducido por anticuerpos (*co-patching*). En el esquema se muestra la forma en que los anticuerpos secundarios unen varias unidades próximas de anticuerpo primario, consiguiendo la formación de pequeños grupos de proteínas visibles por fluorescencia convencional.

6. Inmunohistoquímica.

Las tinciones de inmunohistoquímica se realizaron sobre muestras de cerebros de ratas adultas para la visualización de las neuronas hipocampales y corticales.

Para la obtención de los tejidos, los animales fueron anestesiados con fentobarbital (40 µg/g) hasta la pérdida total de los reflejos. Se perfundió al animal con aproximadamente 150 ml de suero salino con heparina, seguidos de otros 400 ml de PFA 4% (Casa Álvarez). Una vez bien fijado, se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en solución PFA al 4% durante 24 horas, antes de embeberlos en parafina. Una vez solidificada la parafina, y congelada a -20°C, se realizaron cortes con un micrótopo de precisión (Leica RM2265) de 10 µm de grosor, tanto en sección coronal como sagital.

Los cortes fueron posteriormente desparafinados y rehidratados en un gradiente de alcohol. Tras esto se sometieron a un desenmascaramiento de epítomos inducido por calor, sometiendo los cortes a 99°C durante un minuto. Las secciones fueron después lavadas y

boqueadas con PBS con 0.3% Triton X-100 y 2% albúmina de huevo bovina (BSA), e incubadas con anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras una serie de lavados con PBS, los cortes se incubaron con los correspondientes anticuerpos anti-especies conjugados con fluoróforos, durante 40 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron entonces lavadas y montadas con Mowiol-DABCO que incluía DAPI para marcar los núcleos (Master Diagnostica).

7. Estudios de unión de galectinas en superficie.

Para el estudio de la unión de las galectinas a la superficie celular, se incubaron neuronas de 72 hiv con una solución de la correspondiente galectina biotinilada a 25 µg/ml (concentración final) en su forma recombinante sola, formando complejos con HS o en combinación con las formas no biotiniladas (según corresponda en cada experimento), en Air-MEM durante 1 hora a 12°C para ralentizar la endocitosis. Tras un lavado, las células fueron incubadas en las mismas condiciones con estreptavidina conjugada con Texas-Red o FITC. Los CVs fueron entonces fijados y procesados para inmunocitoquímica, y se tomaron imágenes con un microscopio de epifluorescencia. Para el estudio estadístico se empleó el software Image J con el cual se midió la intensidad de la señal de la galectina de un total de 20 células por condición (3 repeticiones).

8. Estudios cuantitativos de crecimiento y ramificación axonal.

Para los estudios cuantitativos, se excluyeron aquellas células presentadas en grupos y/o cuyos axones se entrecruzaban, debido a la dificultad de poder seguir la trayectoria axonal de manera inequívoca. En el caso de células transfectadas con el RNA de interferencia, se tomaron como silenciadas para Gal-4 aquellas neuronas positivas para GFP que presentaron una media de intensidad de fluorescencia de, como mínimo, un 30% por debajo de la fluorescencia de los controles transfectados con UNC-siRNA (ver protocolo en el epígrafe 13.2).

La medición de longitudes axonales y de intensidades de fluorescencia en axones se realizó en un total de 50 células por experimento, con un total de 3 repeticiones por experimento, empleando el software ImageJ. Los resultados fueron sometidos a análisis

estadístico mediante t de Student, y se expresaron como la media \pm la desviación estándar (d.s.) de los tres experimentos.

Para cuantificar el grado de ramificación de cada axón, se hizo un conteo manual empleando las mismas imágenes que para los estudios de longitud axonal. Se adjudicó el valor 0 de ramificación a la rama principal (axón), el valor 1 a la rama surgida de la principal, el valor 2 a la rama surgida de la anterior, etc. Los experimentos control se realizaron en presencia de lactosa 25 mM (Lac). Los resultados son la media \pm la d.s. de tres experimentos (25 neuronas por experimento).

En los ensayos con sustratos en paralelo para el estudio de la guía axonal, se cuantificaron manualmente el número de axones que crecieron preferentemente por las bandas de galectina, los que crecieron por las bandas de PLL, o que lo hicieron sobre ambos sustratos de forma indiferente. Los resultados son la media \pm la d.s. de tres experimentos (25 neuronas por experimento).

III. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS.

9. Preparación de extractos y fraccionamiento de membrana.

Las neuronas cultivadas de 3 div se levantaron en tampón MBS frío (MES 25mM, NaCl 150mM, pH 6,5) suplementado con CLAP (cóctel de inhibidores de proteasas). Las suspensiones celulares fueron lisadas por ultrasonificación, y homogeneizadas mecánicamente haciendo sucesivos pases a través de una jeringa de 22 *gauge*. El extracto resultante se centrifugó durante 10 minutos a 900xg, y se descartó el precipitado nuclear. Se reservó por tanto el sobrenadante (extracto total), y se volvió a centrifugar a 15000xg durante una hora a 4°C para precipitar las fracciones de membrana (ultracentrífuga Optima Max, rotor TLA 110, Beckman Coulter). Una vez descartado el sobrenadante, los residuos de membrana se resuspendieron en tampón MBS con inhibidores de proteasas y Triton X-100 al 1%. Pasados 60 minutos de incubación a 4°C en agitación, se realizó una cuantificación de la cantidad de proteína empleando un kit de BCA.

Para su fraccionamiento, a cada ml de suspensión de membrana se añadieron 2 ml de sacarosa al 90% (concentración final 60% sacarosa), y 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% y 4 ml más al 5%, cuidando que no se mezclaran entre sí, para formar un gradiente discontinuo de densidad. Los tubos se ultracentrifugaron a 155000xg 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 obtuvieron fracciones sucesivas de 1 ml. Las proteínas de cada fracción se obtuvieron por extracción con metanol (4 volúmenes), cloroformo (1 volumen) y agua (3 volúmenes). Esta mezcla se centrifugó 1 minuto a 9000xg para separar una fase acuosa que se descartó, y otra fase orgánica a la que se añadió metanol (4 volúmenes) y se centrifugó de nuevo 10 minutos a 9000xg. El pellet resultante con las proteínas precipitadas, una vez seco se resuspendió en solución de carga 1X (*Laemmli sample buffer*; 63mM Tris HCl a pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 2.5% β -ME, 0.0025% azul de bromofenol, pH 6.8). Las muestras fueron entonces procesadas por WB.

10. Preparación del medio condicionado y extractos celulares para análisis de galectinas.

Para la preparación de los extractos celulares se emplearon cultivos de astrocitos primarios a alta densidad de aproximadamente 10-12 div. Para ello se eliminó el medio de cultivo de las placas y se realizó un lavado con PBS frío. Se levantaron las células de la placa, y se lisaron durante 20 minutos a 4°C en tampón RIPA (25mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Deoxicolato sódico y 0.1% SDS) suplementado con CLAP. Los extractos de proteínas obtenidos, fueron centrifugados durante 15 minutos a 4°C a 9000xg. Los sobrenadantes se consideraron extractos totales de las células, con lo que se realizó una cuantificación de proteínas totales usando el kit de BCA y se procedió al análisis de la muestra por WB.

Para el análisis de la presencia de galectinas en medio condicionado, se emplearon cultivos de astrocitos semiconfluentes de 72 hiv. Se realizó un lavado del cultivo y se añadió solución de Locke (154mM NaCl, 5.6mM KCl, 2.3mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 3.6mM NaHCO₃, 9.8mM Glucosa y 5mM hepes), que se mantuvo durante 8 horas más a 37°C para que las células pudieran condicionar el medio. Pasado ese tiempo, se recogió la solución sin levantar las células, y se incubó con deoxicolato sódico (25 mg/ml) durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se precipitaron las proteínas del medio con 10% TCA durante 1 hora a -20°C y se centrifugó a 4°C durante 20 minutos a 4000xg. El precipitado resultante se concentró por liofilización y por ultrafiltración (filtros Amicon Ultra-0.5ml, Millipore). La muestra concentrada se resuspendió después solución de carga 1X y se analizó por WB.

11. Extractos celulares, entrecruzamiento e inmunoprecipitación.

Los extractos celulares totales se obtuvieron a partir de cultivos de neuronas corticales o de astrocitos cultivados a alta densidad con fines bioquímicos. Las placas de 60 milímetros fueron lavadas con solución PBS fría, y lisadas durante 20 minutos a 4°C en tampón RIPA suplementado con CLAP. Una vez extraídas las proteínas, las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 9000xg y 4°C. Los sobrenadantes fueron considerados como extractos totales y recuperados en tubos limpios. La concentración de proteína fue cuantificada empleando el método de BCA, y la composición proteica se examinó mediante WB.

Para los estudios de entrecruzamiento e inmunoprecipitación, se cultivaron neuronas hipocámpales o células PC12 en placas de plástico a alta densidad. En aquellos casos en los que fue requerido, las células se incubaron durante 2 horas a 12°C con solución de Locke sobre el cual se incluyeron soluciones de Gal-3 o pGal-3, con o sin complejos con HS, a 25 µg/ml (concentración final de galectina). Transcurrido el tiempo, se eliminó el medio sin levantar las células adheridas a la placa, y se incubó con el reactivo de entrecruzamiento reversible DSP (dithiobis[succinimidyl]propionato; Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras un lavado breve con Tris-HCl pH 7.5, se añadió a la placa una pequeña cantidad de tampón de lisis frío (5mM EDTA, 0,5% Triton X-100 en PBS 1X), se levantaron las células raspando y se centrifugaron 5 minutos a 900xg. Los sobrenadantes fueron incubados con anticuerpos primarios correspondientes según el experimento, se mantuvieron a 4°C en movimiento constante durante 18 horas, y después se precipitaron con proteína A o G-sefarosa (en función del anticuerpo primario). A las muestras precipitadas por centrifugación, se añadió un volumen igual de solución de carga 2X, cuyo β-mercaptoetanol (β-ME), rompe los puentes disulfuro creados por el reactivo de entrecruzamiento y libera las proteínas precipitadas. Estas proteínas se analizaron a continuación por WB.

12. SDS-PAGE y Western Blot.

Las muestras de proteínas totales extraídas de los fraccionamientos celulares o de las lisis totales de células se resuspendieron en solución de carga, y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Estas soluciones fueron entonces procesadas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con SDS (SDS-PAGE), aplicando un campo eléctrico de 100 V a amperaje constante (cubeta de electroforesis de BioRad).

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

La membrana con las proteínas transferidas, fue bloqueada 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 diluido 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 fue revelada con el sistema de detección quimioluminiscente ECL (Western Lightning Plus–ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate, Perkin Elmer) y autorradiografía (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare).

En general, como control de carga, se repitieron los WB sobre las mismas membranas con anticuerpos α -Tubulina acetilada, después de re-acondicionarlas con tampón de extracción (*stripping buffer*; compuesto por 62,5mM Tris-HCl pH 6.7 y 2% SDS) incubándolas durante 1 hora a 42°C.

13. Transfecciones celulares.

13.1 Dominante negativo de L1.

El cDNA de una forma dominante negativa de la L1 (L1-1151Y> A; Cheng et al 2005), clonado en un vector pcDNA3, se obtuvo de Adgene (plásmido 13.269). Las neuronas en suspensión se transfectaron usando el sistema de Nucleofector (Amaxa, Gaithersburg, MD) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se sembraron en placas de 60 milímetros con o sin CVs de vidrio (ver epígrafes 1 y 2 sobre cultivos celulares). Se empleó GFP (incluido con el kit de transfección del propio sistema Nucleofector) como marcador de transfección.

13.2 Silenciamiento de Gal-4 mediante RNA de interferencia (siRNA) y rescate con Gal-4 recombinante.

Para el silenciamiento de la Gal-4 se testaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos obtenidos de Sigma-Aldrich:

- siRNA1: GCACTACAAGGTCGTGGTA(dT)(dT).
- siRNA2: GAACTCCCTTCTACGAATA(dT)(dT).
- siRNA3: TTCGCAACAGCTATATGA(dT)(dT).

Se transfectaron neuronas hipocampales y corticales usando el sistema de Nucleofector siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control, se realizaron nucleofecciones paralelas con el control negativo *Mission® siRNA Universal Negative Control-1* (Sigma). Como control de transfección positiva, tanto los diferentes modelos de siRNAs como el control negativo se co-transfectaron con GFP (*Green fluorescent protein*, pMAX-GFP). Transcurridas 48 horas tras la transfección y la siembra de las células, se realizaron estudios morfológicos y bioquímicos (siguiendo los protocolos anteriormente descritos).

En el caso de los experimentos de rescate de función, tanto las neuronas interferidas como los controles se incubaron en presencia de Gal-4 recombinante (25 µg/ml; rGal-4) desde el momento en que los CVs se transfirieron a medio NB-B27.

La eficiencia de siRNA1, siRNA2 y siRNA3 fue evaluada mediante comparación de su capacidad de reducción de los niveles de Gal-4 en neuronas cultivadas durante 24, 48 o 72 hiv. La reducción más significativa se obtuvo empleando el siRNA1, que se une a los nucleótidos 330-348 de la Gal-4, dentro del primer dominio CRD.

Los efectos de la reducción de la expresión de Gal-4 en las células se corroboraron bioquímicamente. Para ello, neuronas de 48 hiv se lavaron con HBSS sin iones divalentes a 4°C, y se diluyeron en una solución de separación compuesta por 25 mM HEPES pH 7.0, 5 mM EDTA y 2% FBS, en HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, a una densidad final de aproximadamente 4x10⁶ células/ml. Esta solución fue sometida a separación por citometría de flujo, empleando un *FACS Aria cell sorter* (BD Biosciences) en condiciones de baja presión (20 psi y 100 µm *nozzle*), para obtener entre un 90 y un 95% de pureza de células GFP⁺ positivas. Dichas células GFP⁺ fueron recolectadas en solución 25 mM HEPES a pH 7.0 y 20% FBS en HBSS libre de iones divalentes, y cuantificadas. Finalmente, cantidades similares de células GFP⁺ provenientes de cada tipo de transfección, fueron lisadas con RIPA buffer para obtener los extractos totales, y se sometieron a WB para estudiar la expresión de Gal-4.

IV. ANTICUERPOS Y REACTIVOS.

Cultivos:	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM, Glucosa, Hepes, KH_2PO_4, L-Glutamina, MEM, MgSO_4, NaCl, NaHCO_3, NGF, Poly-L-Lisina, Tripsina • CaCl_2, KCl, MgCl_2, Na_2HPO_4 • Neurobasal, Penicilina-Estreptomicina, Suero de caballo, Suero fetal bovino (FBS), Suplemento B-27 	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma-Aldrich • Merck • Invitrogen
Tratamientos:	<ul style="list-style-type: none"> • Desoxymannojirimicina (DMJ), Heparán sulfato (HS), Lantrunculin-A, Metyl-β-ciclodextrina ($\text{M}\beta\text{C}$), NaClO_3, Nocodazol 	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma-Aldrich
Inmunocitoquímica / Inmunohistoquímica:	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido pirúvico ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$), BSA, Cloruro de amonio (NH_4Cl), DABCO, EGTA, Glucosa, Hepes, KH_2PO_4, Lactosa, Laminina, L-Glutamina, NaCl, NaHCO_3, Sacarosa, Triton X-100 • Gelatina 80-100 blooms, PFA • Suero fetal bovino (FBS) • Ácido tricloroacético (TCA), KCl, Metanol, Na_2HPO_4 • Mowiol • Parafina 	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma-Aldrich • Panreac • Invitrogen • Merck • Calbiochem • Fluka
Bioquímica:	<ul style="list-style-type: none"> • Acrylamida/bis-Acrylamida, Azul de bromofenol, CLAP, EDTA, Glucosa, Glicina, Glycerol, Hepes, MES, NaCl, NaHCO_3, NP-40, Sacarosa, Triton X-100, Trizma base, Tween-20, β-mercaptoetanol (β-ME) • Ácido clorhídrico (HCl), CaCl_2, Cloroformo, Deoxicolato sódico, KCl, Metanol, MgCl_2 • SDS • DSP, DTSSP • APS, TEMED 	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma-Aldrich • Merck • GE-Healthcare • Pierce • Bio-Rad

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 inmunocitoquímicos y bioquímicos), y ordenados en función de la casa comercial de la que son originarios.

Nombre	Especie	Concentración	Origen
Anexin-II	Ratón	1:50	BD Biosciences
EEA-1	Ratón	1:100	BD Biosciences
GFAP	Ratón	1:1000 - 1:500	Invitrogen
Nestin (2Q178)	Ratón	1:1000	Sta. Cruz Biotechnology
Neurofilament 200 clon N52	Ratón	1:250	Sigma
TAU-1 clon PC1C6	Ratón	1:1000	Millipore
Thy1 (CD-90)	Ratón	1:100	Serotec
Tuj-1 clon 2G10	Ratón	1:1500	Sigma
Vimentin (IgG2a)	Ratón	1:1000	Sta. Cruz Biotechnology
α -Tubulin acetylated	Ratón	1:2000	Sigma
α -Tubulin	Ratón	1:2000	Sigma
β 1-Integrin (Anti-CD29)	Ratón	1:100	BD Biosciences
NCAM-L1 (C-20)	Cabra	1:100	Sta. Cruz Biotechnology
Neruopilin	Cabra	1:100	Sta. Cruz Biotechnology
ERM	Conejo	1:100	Cell Signaling
Galectin 1/3/4/8	Conejo	1:250	Fabricación casera (testados ante cualquier posible reacción cruzada)

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

Para WB se emplearon los mismos anticuerpos pero con diferentes concentraciones: todos 1:500 exceptuando anti-Thy1 que se usó a 1:250.

Los anticuerpos secundarios empleados para inmunocitoquímica fueron los correspondientes anticuerpos anti-especie todos conjugados con diferentes fluoróforos Alexa-Fluor 488, 594 o 647 (1:1000), o conjugados con HRP (1:2000) para WB (todos de Molecular Probes). Para el ensayo con sustratos en paralelo se empleó Fluoresceína conjugada con Isothiocyanina (FITC; 1 μ g/ml) de Sigma Aldrich. Para el marcaje de F-actina se empleó faloidina conjugada con Isothiocyanina (1:1000, coloración verde) o con Tetramethylrhodamina (1:1000,

coloración roja), ambas de Molecular Probes. Para el marcaje de núcleos se empleó DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol diclorohidrato; Sigma) 1:2000.

Para los experimentos de unión de galectina en superficie con galectinas biotiniladas se empleó streptavidina conjugada con Texas Red o con FITC (Invitrogen) 1:1000. En el caso de los experimentos de reclutamiento de proteínas inducido por anticuerpos, las concentraciones de anticuerpos se redujeron a 1:20 en el caso de los anticuerpos primarios, y 1:250 en el caso de los secundarios.

Resultados

I. LA GALECTINA-3 HUMANA, REGULADORA DE LA ADHESIÓN Y EL CRECIMIENTO AXONAL, COMO INDUCTORA DE LA RAMIFICACIÓN POR REDISTRIBUCIÓN LOCAL DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA L1 Y ERM.

1. La galectina-3 fosforilada presentada como sustrato induce la ramificación axonal.

Durante el estudio de expresión y función de las galectinas sobre cultivos de neuronas hipocámpales in vitro, incluimos la galectina-3 en las 3 formas naturales que podemos encontrar de la lectina: la forma silvestre recombinante (Gal-3), la forma fosforilada (pGal-3) y la forma truncada (trGal-3). Las tres moléculas fueron presentadas en los cultivos de dos formas diferentes, bien disueltas en el medio de cultivo (concentración final 25 mM), o bien adheridas al cubreobjetos como un sustrato sobre el que deben crecer las neuronas. Los datos obtenidos de las mediciones de la longitud axonal mostraron que todas las formas de la galectina tienden a estimular ligeramente el crecimiento de los axones, aunque dicha tendencia no es significativa estadísticamente (figuras 17A y 17B).

Sin embargo, cabe destacar un efecto morfológico observado en las neuronas crecidas sobre un recubrimiento de pGal-3. Dichas neuronas presentaron un incremento significativo en el grado de ramificación axonal en comparación con las neuronas control (figura 17A, detalles 3 y 4). Mediante una cuantificación manual del grado de ramificación, adjudicando el valor 0 a la rama principal, 1 a la rama surgida de la principal, 2 a la rama surgida de la anterior, etc., observamos que mientras que las neuronas control o las crecidas en presencia de las formas recombinante o truncada de Gal-3 presentaban un nivel de ramificación en torno a valores de 1 o 2, las crecidas en presencia del sustrato de pGal-3, marcaron picos de ramificación con valores de entre 4 y 5 (figura 17C).

La repetición de este experimento incorporando como variable la presencia de lactosa 25 mM (Lac) como azúcar competitivo (concentración que ya se sabe es bien tolerada por los cultivos), no varía el resultado con respecto a los cultivos sin lactosa (figura 17C), dato que nos revela que se trata de un efecto independiente a la capacidad de unión a carbohidratos de la lectina.

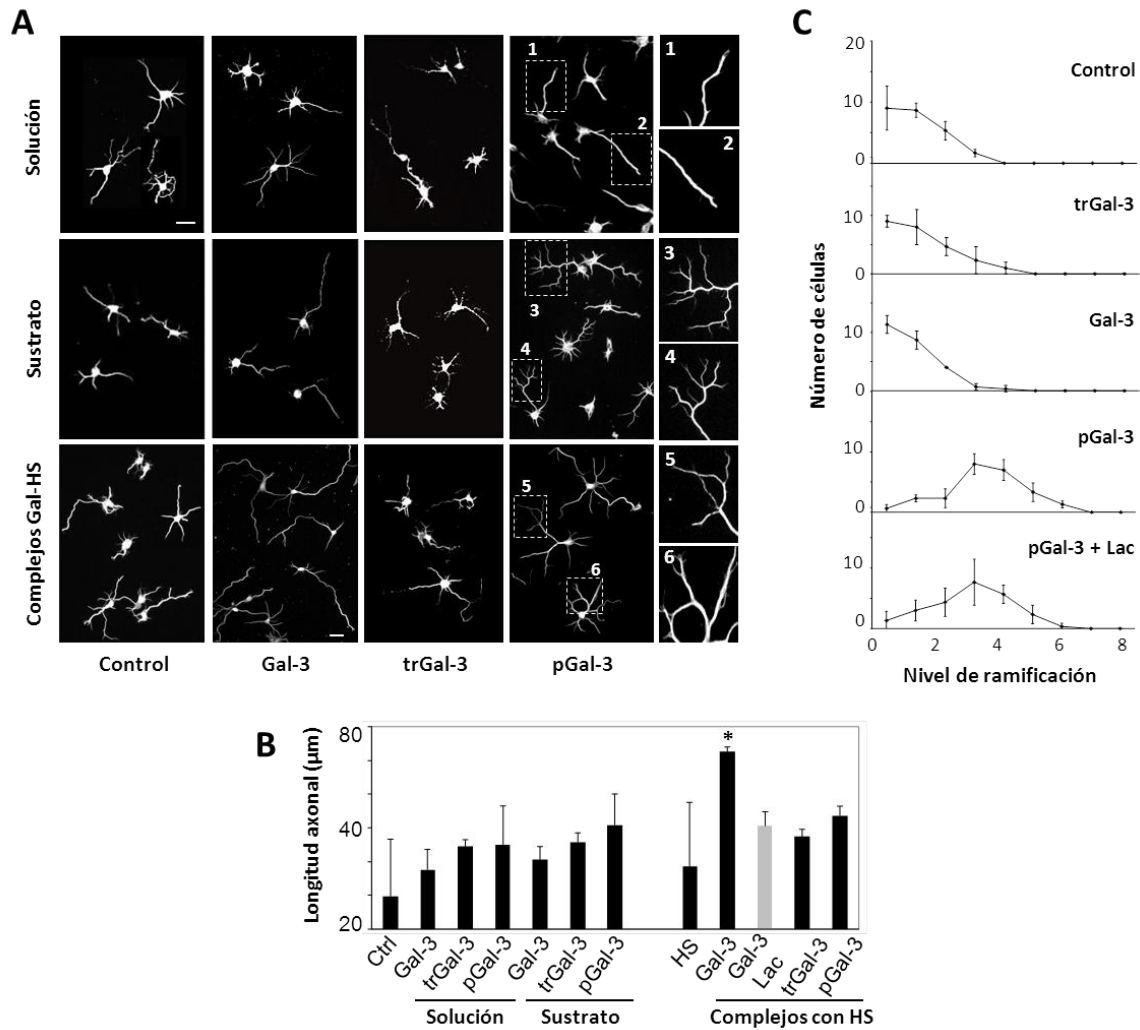


Figura 17. pGal-3 presentada como sustrato induce la ramificación axonal. Neuronas hipocámpales tratadas durante 48 horas con las formas de Gal-3 humana en solución (25 µg/ml), como sustrato o formando complejos con heparán sulfato (HS; 25 µg/ml concentración de galectina final; galectina-HS, 5:1 w/w). Como control se emplearon cultivos crecidos sobre PLL, o bien sometidos a la misma concentración de HS. **A)** Neuronas fijadas y marcadas con anticuerpo anti- α -tubulina. Las regiones ampliadas 3-6 muestran en detalle los axones altamente ramificados. **B)** Gráfico de barras que muestra el efecto de las diferentes formas de Gal-3 sobre la longitud axonal. La barra gris muestra el efecto del tratamiento de las neuronas con Gal-3-HS en presencia de lactosa como inhibidor competitivo de la unión a carbohidrato (media \pm desviación estándar (d.s.), N=3 experimentos independientes; * p < 0,001). La longitud axonal se midió utilizando el software Image J. **C)** Efecto de las diferentes formas de Gal-3 sobre la ramificación neuronal (axón \rightarrow nivel 0, ramas del axón \rightarrow nivel 1, rama desde el nivel 1 \rightarrow nivel 2, etc.). Las ramas se contaron de forma manual. Los experimentos se realizaron en presencia de lactosa 25 mM (Lac) (media \pm d.s., N=3 experimentos (25 neuronas por experimento)). Barras de escala: 10 µm.

Con estos datos podemos concluir que este efecto provocado por la pGal-3 solo es efectivo si la molécula se presenta inmovilizada y no en solución, una forma de presentación que reproduce en cierto modo la situación fisiológica en que la galectina, secretada al medio extracelular, interacciona con la MEC y es presentada así a la membrana plasmática neuronal.

Supusimos que deberíamos tener un efecto similar presentando la pGal-3 adherida a uno de los componentes de la MEC. Para comprobarlo, se crearon complejos de las diferentes formas de la galectina adheridas al proteoglicano heparán sulfato (HS) (ratio galectina:HS 5:1, w/w. Concentración final de galectina 25 mM). El motivo por el que se empleó esta molécula en concreto es su inocuidad sobre el crecimiento de las células, ya que otros componentes de la MEC, como se comentó en la introducción, pueden tener efectos *per se* sobre el crecimiento neuronal, como es el caso del condroitín sulfato que conlleva inhibición del crecimiento, o la laminina y fibronectina que lo incrementan. Los resultados obtenidos con los complejos solubles de pGal-3-HS indicaron que de esta forma también se favorece este fenotipo ramificado (figura 17A, detalles 5 y 6).

Esta actividad sugería que los complejos pGal-3-HS se podrían unir preferentemente a los puntos de ramificación de los axones. De hecho, incubando neuronas vivas con complejos pGal-3-HS preparados con la lectina biotilada, encontramos que ésta se localiza en gran medida sobre las zonas del axón de las que surge una nueva rama (figura 18A, flechas; figura 18C). Utilizando pGal-3 en solución como control, comprobamos que no se une a estos mismos puntos, sino que se distribuye de forma difusa y poco intensa sobre la superficie de la neurona (figura 18B, flechas y figura 18C). Esto refuerza la importancia de la forma de presentación de la molécula a la célula.

De acuerdo a los resultados publicados hasta ese momento sobre estudios de Gal-3 adherida a plástico y con líneas celulares (Pesheva et al 1998), la galectina adherida a HS dio lugar a un incremento estadísticamente significativo de la longitud axonal de en torno a 35 μ m más con respecto a los controles (figuras 17A y 17B). Además, este efecto sí que resultó ser neutralizado con la presencia de lactosa en el medio de cultivo (figura 17B, barra color gris), demostrando que éste, al contrario de la estimulación de la ramificación, si se trata de un efecto dependiente de la unión a carbohidratos.

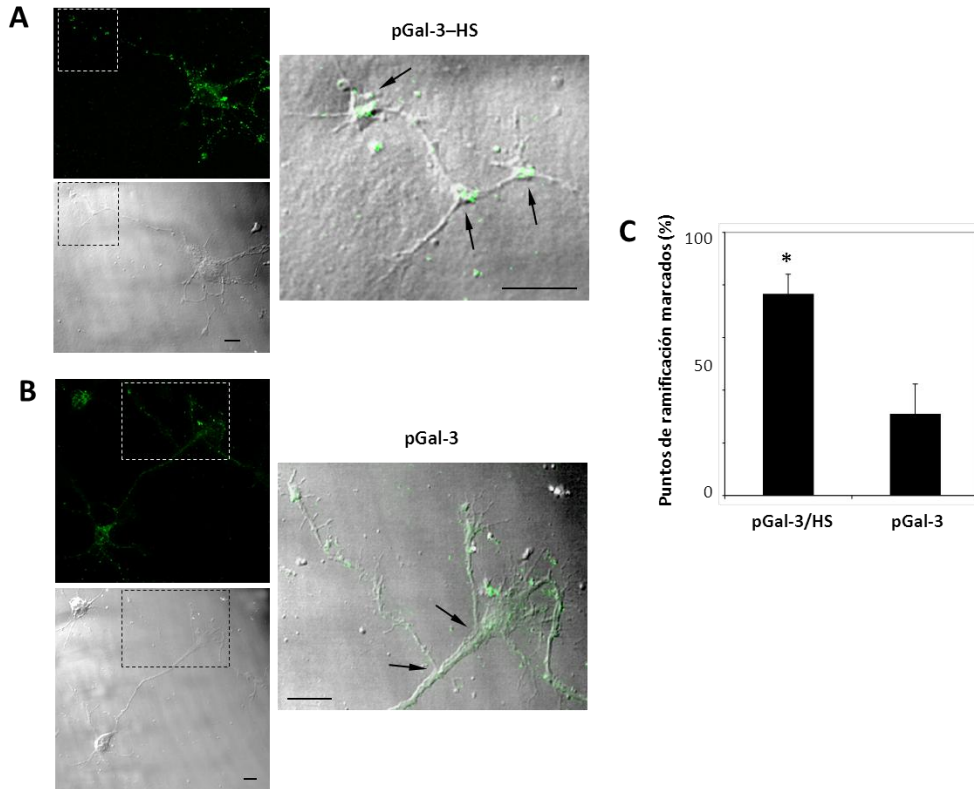


Figura 18. Los complejos de pGal-3-HS se unen preferentemente a los puntos de ramificación.

A,B) Neuronas hipocámpales de 72 horas fueron incubadas durante 1 hora a 12°C en un medio tamponado con pGal-3 biotinilada (25 µg/ml), con complejos de galectina con HS (A) o solo la galectina (B). Después de la incubación y de un lavado, se incubaron con streptavidina conjugada con FITC en las mismas condiciones. Los cubres fueron fijados y montados. Las regiones enmarcadas y ampliadas a la derecha son la combinación de la imagen de campo claro con la imagen de fluorescencia. Las flechas indican los puntos de ramificación, marcados solo tras la incubación con pGal-3-HS. Barra de escala: 10 µm. **C)** Porcentaje de puntos marcados en las zonas de ramificación. Se consideraron positivos aquellos puntos de ramificación que muestren una intensidad de marcaje al menos 3 veces superior al fondo medido en tramos de neuritas adyacentes (media ± d.s., N=3 experimentos (20 campos por experimento), * p <0,005).

Los mecanismos de generación de nuevas ramificaciones comparten ciertos aspectos moleculares con los mecanismos que regulan la guía axonal (Yoshida et al 2008). Encontramos moléculas como semaforinas, TAG-1 (Liu & Halloran 2005) o STAT3 (Conway 2006) que participan en ambos procesos. Además, se ha comprobado que las galectinas pertenecientes a la familia prototipo (en especial la Gal-1), están implicadas en procesos de guía axonal *in vitro* (Kopitz et al 2004) e *in vivo* (Puche et al 1996, Gaudet et al 2005). Esto nos llevó a estudiar si la galectina-3 fosforilada podría tener también algún efecto sobre la guía axonal. Para afrontar esta cuestión, estudiamos si la forma de Gal-3 recombinante o alguna de sus formas fosforilada o truncada eran capaces de guiar a los axones en crecimiento *in vitro*. Para ello, los axones fueron

crecidos sobre sustratos en los que se alternan líneas paralelas recubiertas de galectina combinada con FITC, y líneas recubiertas únicamente de PLL, usando como controles negativo y positivo, líneas paralelas de PLL marcadas con FITC (figura 19, FITC) o líneas paralelas de laminina marcada con el mismo fluoróforo (figura 19, laminina) respectivamente. En el caso de las líneas paralelas recubiertas con cualquiera de las tres formas de la Gal-3, los axones no presentaron ningún tipo de preferencia de seguimiento de ninguno de los sustratos presentados o las líneas de PLL (figura 19, Gal-3, trGal-3, pGal-3. Barras negras y gris claro en el gráfico). De hecho, los axones tendieron a crecer sobre las líneas de trGal-3 o pGal-3 ignorando la transición entre las zonas de galectina y PLL (figura 19, trGal-3, pGal-3. Barras gris oscuro).

Estos resultados muestran que ninguna de las formas ensayadas de Gal-3 producen efecto modulador sobre la guía axonal.

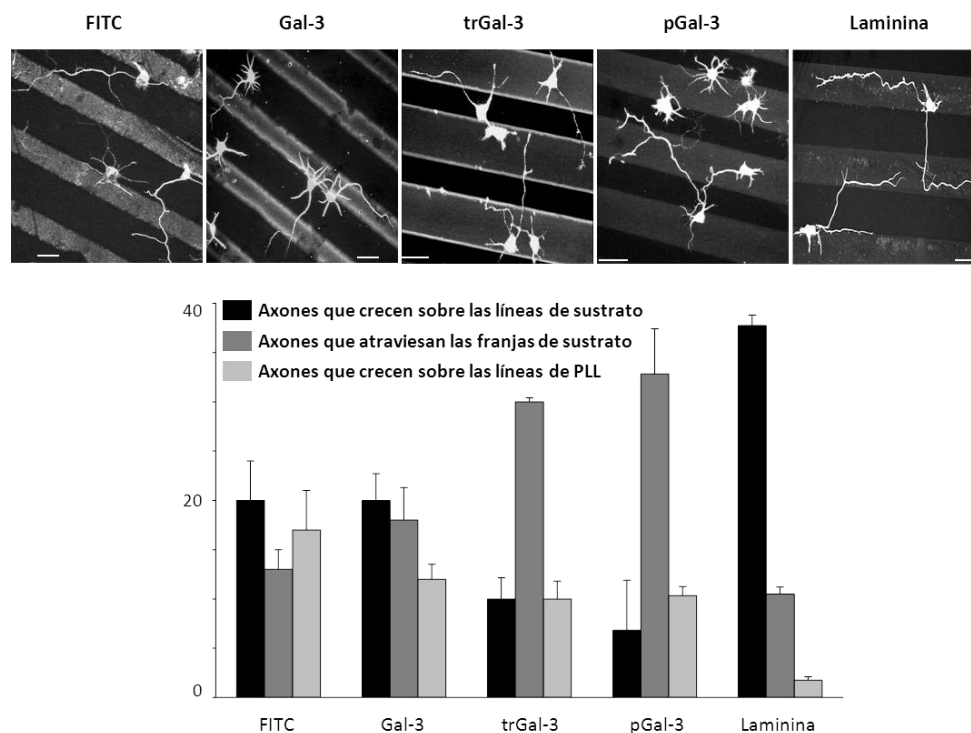


Figura 19. Gal-3 no tiene efecto sobre la guía axonal *in vitro*. Se cultivaron neuronas hipocampales durante 48 horas sobre cubreobjetos recubiertos con franjas paralelas de PLL en alternancia con la forma indicada de galectina conjugada con FITC. Se prepararon franjas de FITC solo como control negativo, y laminina como control positivo (bandas claras). Se realizó una inmunocitoquímica (ICQ) frente a α -tubulina para poder visualizar las células. Los axones neuronales se extienden a lo largo de las bandas de laminina, pero no muestran ninguna preferencia por seguir las bandas de Gal-3 (central) o FITC solo (izquierda). El gráfico de barras muestra el número de axones que crecen a lo largo de cada sustrato (barras de color negro), sobre PLL (barras gris claro) o atravesando las bandas (barras gris oscuro). Valores medios \pm d.s., N=3 experimentos (50 células por experimento). Barras de escala: 10 μ m.

2. La galectina-3 fosforilada induce la generación de dos tipos de ramificaciones.

La formación de una nueva rama neurítica requiere la remodelación local del citoesqueleto para determinar su futura localización, además de para potenciar y mantener el crecimiento de la misma.

Para estudiar la posibilidad de que tal reordenamiento del citoesqueleto sea inducido por los complejos de pGal-3-HS, se trataron cultivos de neuronas hipocampales con los complejos o solo con HS utilizado como control, y se realizaron inmunocitoquímicas para α -tubulina y F-actina. La mayoría de las neuronas tratadas con HS presentaron un fenotipo típico de un estadio 3 (Dotti et al 1988), con axones ramificados con un alto contenido en microtúbulos (figura 20A, flechas). Normalmente los axones presentan también algunas pequeñas protrusiones ricas en F-actina (figura 20A, cabezas de flecha). Nuevamente pudimos observar como el tratamiento con pGal-3-HS promovió la formación de un fenotipo altamente ramificado marcadas con α -tubulina (figura 20B, flechas), pero encontramos que este tratamiento también favoreció la formación de un anormal número pequeñas protrusiones ricas en F-actina (figura 20B, puntas de flecha; cuantificación en la figura 20C). Este hecho mostró que la activación de la ramificación inducida por la galectina, va acompañada de una activación del citoesqueleto, tanto a nivel de microtúbulos como de microfilamentos de actina.

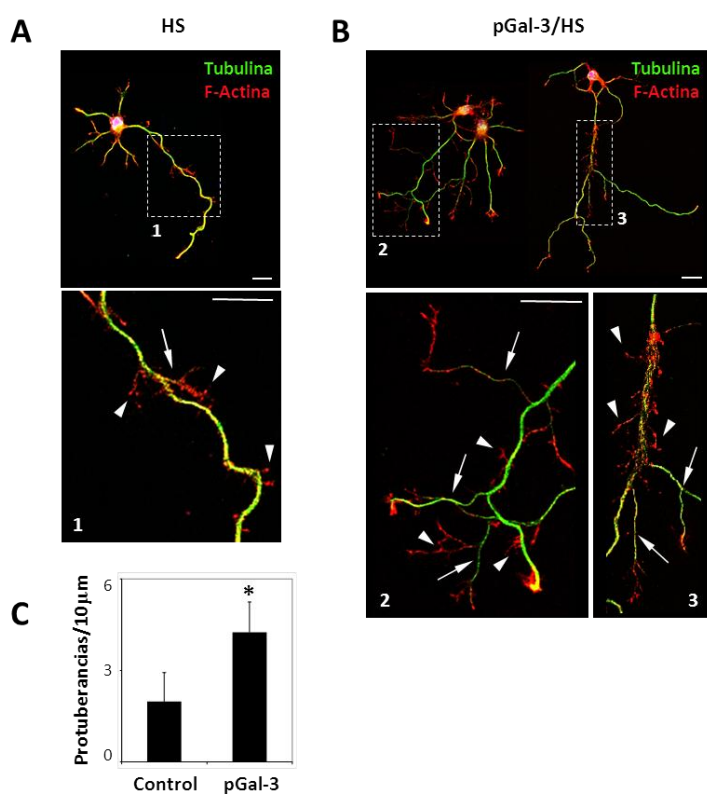


Figura 20. pGal-3 presentada como sustrato induce cambios locales en el citoesqueleto de F-actina. A,B) Neuronas hipocampales cultivadas de 72 hiv en presencia de HS solo (A) o de complejos pGal-3-HS (25 μ g/ml, B), se fijaron y marcaron con anti- α -tubulina (verde) y F-actina (rojo). Los tratamientos con pGal-3-HS dieron lugar a células ricas en ramas con elevada presencia de tubulina (flechas) y una mayor cantidad de protuberancias ricas en F-actina (puntas de flecha) en comparación con las neuronas control. Barras de escala: 10 μ m. **C)** Número de protuberancias marcadas con F-actina a lo largo de 10 μ m de neurita. Las protrusiones fueron contadas manualmente, y la longitud de las neuritas se cuantificó como en la Figura 17. Valores media \pm d.s., N=3 experimentos (20 campos por experimento), * $p < 0,005$.

3. La galectina-3 fosforilada presentada como sustrato interacciona con la proteína de membrana L1.

El siguiente paso fue definir cuál o cuáles podrían ser las posibles dianas de la pGal-3 en la superficie celular. Para comprobarlo, incorporamos a cultivos de neuronas corticales complejos de pGal-3-HS, y las mantuvimos a 12°C con el propósito de que los complejos se adhieran a la superficie de la célula pero manteniendo un nivel bajo de endocitosis. Realizamos además un control en paralelo, al cual añadimos complejos de Gal-3-HS.

Transcurrido el período de incubación, los complejos fueron entrecruzados con una molécula capaz de formar puentes disulfuro entre las proteínas que interaccionan. Tras este paso, se obtuvieron extractos totales con dichos cultivos de neuronas y se inmunoprecipitaron las proteínas extraídas en presencia de anticuerpo anti-Gal-3. Una vez obtenido el inmunoprecipitado, se rompieron los puentes disulfuro que mantenían las proteínas unidas gracias al 2-mercaptoetanol presente en la solución de carga (*laemmli buffer*). Los inmunopreparados fueron entonces analizados mediante western blot (WB), empleando anticuerpos contra la integrina- β 1, la neuropilina-1 y la NCAM-L1, tres proteínas que, según la literatura, estaban involucradas con la ramificación axonal e interaccionaban con la Gal-3 por lo que consideramos posibles ligandos de la pGal-3.

El anticuerpo anti-Gal-3 inmunoprecipitó un 60% más de L1 en neuronas incubadas con complejos de pGal-3-HS frente a las cultivadas con complejos de Gal-3-HS, mientras que no se encontró co-inmunoprecipitación con la Integrina- β 1 y la neuropilina-1 (figura 21A).

Para corroborar el resultado para la proteína L1, realizamos el experimento de co-inmunoprecipitación inversa, es decir, precipitamos con anticuerpo anti-L1, y analizamos por WB con anticuerpo anti-Gal-3. Una vez más, se obtuvo co-inmunoprecipitación exclusivamente en las muestras procedentes de neuronas incubadas con pGal-3-HS (figura 21B).

Esta co-inmunoprecipitación de pGal-3 y L1 constituye una firme evidencia de que existe una interacción entre estas dos moléculas, y sugiere que dicha interacción podría ser el origen del fenotipo altamente ramificado generado por la galectina.

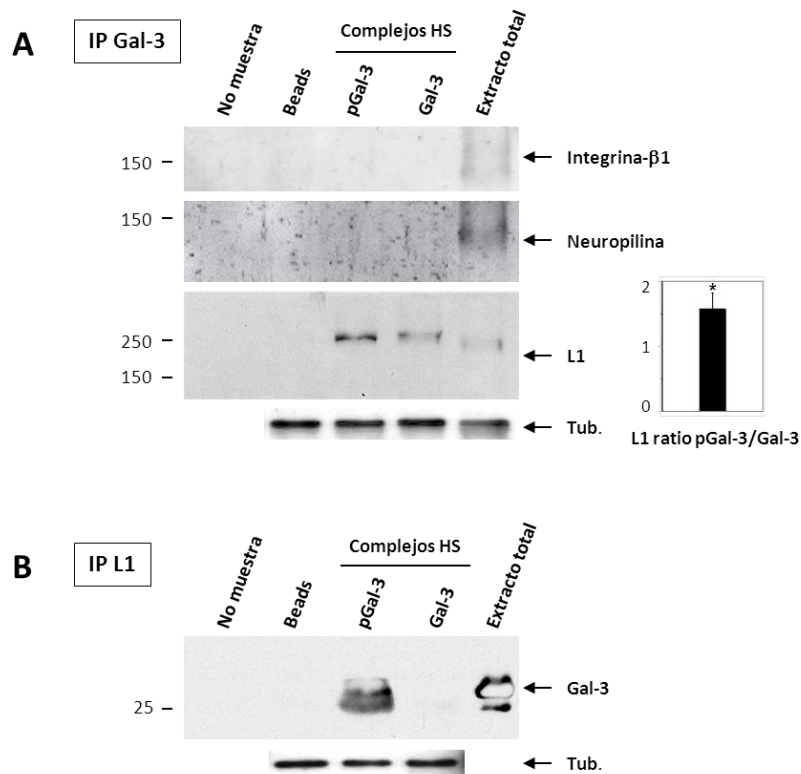


Figura 21. pGal-3 presentada como sustrato interacciona con L1. Neuronas corticales cultivadas durante 7 días fueron incubadas durante 1 hora a 12°C en solución tamponada con Gal-3 o pGal-3 (25 µg/ml) en complejos con HS. Las células fueron entonces tratadas con el reactivo de entrecruzamiento DSP, tamponadas con Tris (pH 7,5) y levantadas en solución de lisis (detalles en materiales y métodos). Después de una centrifugación, los sobrenadantes se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Gal-3 y se analizaron por WB frente a integrina-β1, neuropilina-1 y L1. **A)** Entorno a un 60% más de L1 co-inmunoprecipitó con complejos de pGal-3-HS, en comparación con los complejos de Gal-3-HS (gráfico de barras, media ± d.s., N=3 experimentos. * p < 0,005). **B)** Una segunda inmunoprecipitación con anti-L1 y el análisis por WB frente a Gal-3, confirmó la interacción entre L1 y pGal-3. Las mismas cantidades de tubulina que de extractos fueron cargadas para ser usadas como controles.

4. La galectina-3 fosforilada presentada como sustrato induce la relocalización de L1 en los dominios ricos en Thy-1 de neuronas *in vivo*.

El gran número de ramificaciones y el gran dinamismo del citoesqueleto de actina inducidos por la presencia de la pGal-3 presentada en asociación a una superficie, recuerda al fenotipo producido por la interacción homofílica de la proteína L1 de la membrana celular y la de sustratos recubiertos de la misma (Dickson et al 2002, Cheng et al 2005). Por este motivo, el siguiente paso lógico en nuestro trabajo debía ser comprobar si la interacción de la pGal-3 con la membrana de las neuronas estaba

relacionada con la presencia de L1. A partir de esta idea se consideraron dos posibilidades: por un lado, la proteína L1 podría estar formando una cantidad anormal de agregados o agregados excepcionalmente grandes; por otro lado, dado que la actividad de L1 en el axón de las neuronas depende de su presencia en balsas lipídicas de la membrana neuronal (Nakai & Kamiguchi 2002), estos posibles agregados de la proteína podrían estar asociados a este tipo de regiones de la membrana.

Para comprobar esta última hipótesis, se realizó un estudio de los puntos de agregación de proteínas en la superficie celular inducida por anticuerpos (*co-patching*; Abad-Rodriguez et al 2004). Para localizar la presencia de las balsas lipídicas, se eligió la proteína Thy-1, un marcador de este tipo de regiones de membrana en las neuronas. Neuronas vivas en cultivos, mantenidas a 12°C para ralentizar la endocitosis, se incubaron anticuerpos específicos para L1 y Thy-1, se lavaron, y después se agregaron sus correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos (para más detalle, ver epígrafe 3 del apartado de materiales y métodos). Los agregados de L1 bajo los efectos de la interacción de la pGal-3, no mostraron ningún cambio evidente en cuanto a su cantidad o su tamaño (figura 22A y 22B, L1). De hecho, los porcentajes de los agregados contabilizados y distribuidos en tres grupos en base a su tamaño (de menos de 3 píxeles, de entre 3 y 12 píxeles, o mayores de 12 píxeles de diámetro) fueron similares a los de las neuronas control (figura 22C).

Cuando observamos juntos los marcadores para L1 y para Thy-1, encontramos que ante la presencia de la lectina se promueve un aumento de la co-localización de los agregados de ambas proteínas en comparación a los controles (figura 22A y 22B), quedando siempre un remanente de L1 que no coincide con Thy-1 (figura 22A, flechas). Una cuantificación de los resultados reveló que en torno al 50% de los acúmulos de L1 en las células control coincidían con los acúmulos de Thy-1, mientras que en neuronas tratadas con pGal-3, el porcentaje de co-localización de las proteínas ascendió hasta el 70% (figura 22D). Además, se observó que no solo aumentaba la co-localización de ambas proteínas, sino que ésta parecía más prominente en los puntos donde surgía una nueva ramificación (figura 22B, cabezas de flecha, puntos de co-localización amarillos).

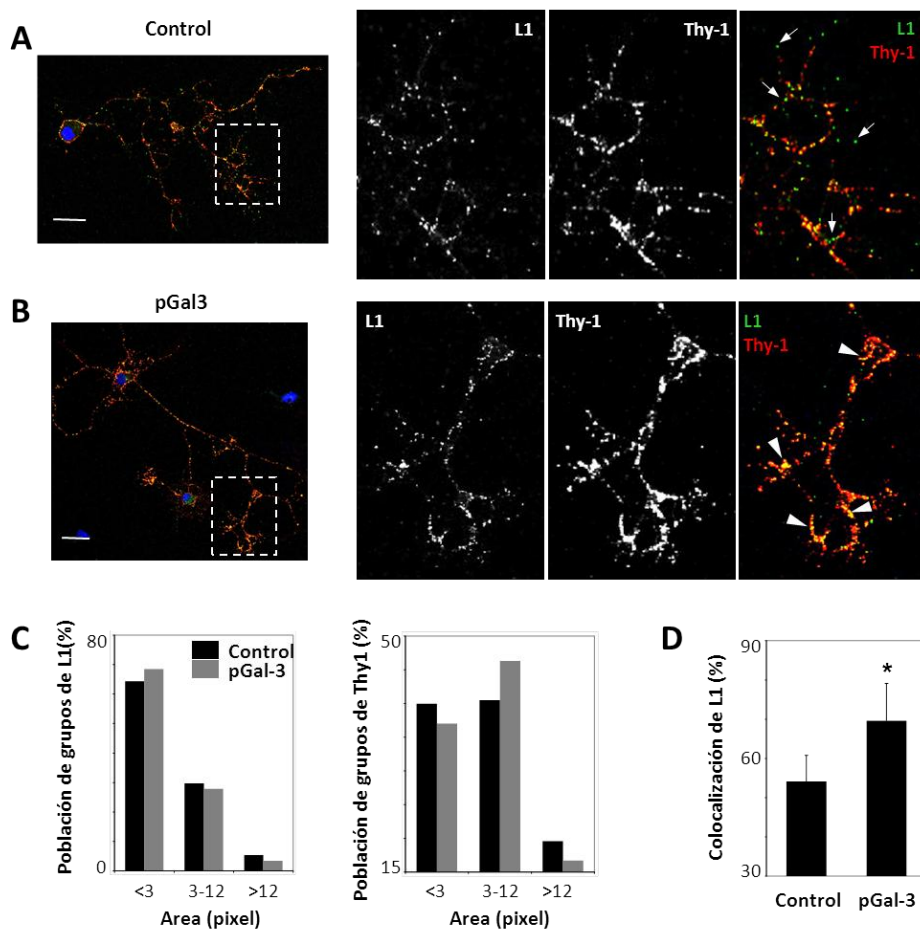


Figura 22. pGal3 presentada como sustrato desplaza a L1 hacia balsas lipídicas de membrana que contienen Thy-1. A,B Se cultivaron neuronas hipocámpicas durante 72 horas sobre PLL (A) o sobre pGal-3 (B). Las neuronas vivas fueron incubadas 1 hora a 12°C en medio tamponado con anticuerpos anti-L1 y anti-Thy-1. Tras un lavado, se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos en las mismas condiciones (detalles en materiales y métodos). Los cubreobjetos fueron fijados y montados. Las puntas de flecha indican los puntos de co-localización; las flechas indican grupos de L1 que no co-localizan.). **C**) Los puntos de L1 y de Thy-1 fueron clasificados en tres familias atendiendo a su tamaño en píxeles (<3, 3-12, >12). Se muestran los porcentajes de cada grupo de agregados, tanto en cultivos control como en los tratados con pGal-3, no mostrando variación en este aspecto en ningún caso. **D**) El porcentaje de grupos de L1 que co-localizan con puntos de Thy-1 es significativamente mayor en neuronas cultivadas con pGal-3 que en los controles. Valores media \pm d.s, N=3 experimentos (20 campos por experimento), * $p < 0,005$. Barra de escala: 10 μ m.

Según estos resultados, una parte significativa de L1 debería estar uniéndose a las balsas lipídicas de membrana, una vez las células son expuestas a la pGal-3 adherida a una superficie o a un componente de la MEC. Para comprobar estos resultados bioquímicamente, se extrajeron las membranas de células previamente cultivadas en presencia de Gal-3 o pGal-3 empleando el detergente Triton X-100 en frío. Estos extractos fueron fraccionados en un gradiente de sacarosa. Las fracciones,

analizadas por WB, mostraron una mayor cantidad de L1 en las correspondientes a balsas lipídicas de membrana (fracciones 4 y 5), en el caso de neuronas tratadas con pGal-3 (figura 23A y 23B).

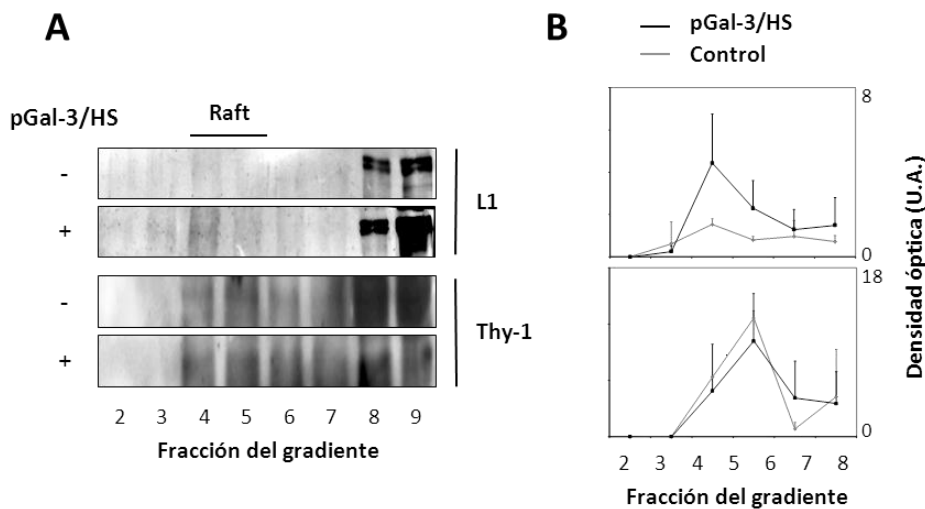


Figura 23. Los complejos pGal3–HS desplazan a L1 hacia balsas lipídicas de membrana ricas en Thy-1.

Se extrajeron las membranas de las neuronas control y de las previamente tratadas con complejos pGal-3-HSGal-3-HS con una solución fría de Triton X-100 al 1%, y se fraccionaron en gradientes de sacarosa por ultracentrifugación. **A)** Las fracciones de membrana obtenidas se analizan por WB frente a L1 y Thy-1. **B)** Los gráficos reflejan la cantidad de proteína presente en cada fracción medida por densitometría. En las células tratadas con complejos de pGal-3-HS, L1 se encuentra enriquecido en las fracciones 4 y 5, correspondiendo con las fracciones de las balsas lipídicas que contienen Thy-1 (panel de Thy-1). Valores media \pm d.s. N=3 experimentos. Barras de escala: 10 μ m.

5. La galectina-3 fosforilada presentada como sustrato induce la relocalización de las proteínas ERM a las zonas de membrana ricas en Thy-1.

Según la literatura, la ramificación inducida por la proteína L1 está mediada por las proteínas citosólicas Ezrin-Radixin-Moesin (ERM), que modulan la interacción entre el citoesqueleto de actina y la membrana celular (Cheng et al 2005). Era lógico pensar por tanto, que en nuestro caso la redistribución de L1 sobre la membrana implicase una redistribución similar de ERM. Así, comprobamos si también coincidía la localización de las ERMs y las balsas lipídicas ricas en Thy-1, realizando experimentos similares a los realizados en el caso de la L1.

En esta ocasión comprobamos que mientras en las neuronas control el patrón de distribución de ERM es independiente al de Thy-1 (figura 24A, flechas), en las neuronas tratadas con complejos de pGal-3-HS, ERM presentó un patrón punteado más o menos continuo y con una especial acumulación sobre

los puntos de ramificación, y coincidente con los agregados de Thy-1 y con las balsas lipídicas (figura 24B). Estos resultados indican que estas proteínas de anclaje entre el citoesqueleto y la membrana plasmática son necesarias para regular el proceso de ramificación dirigido por L1, y que ambas limitan los puntos de interacción de la pGal-3 sobre la célula.

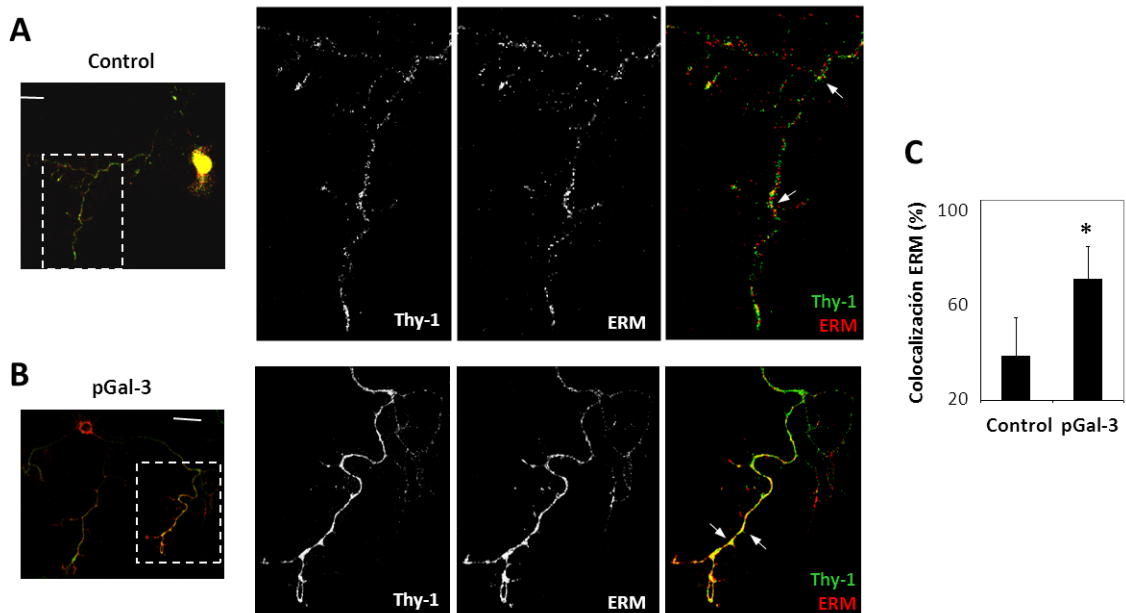


Figura 24. pGal-3 presentada como sustrato desplaza a ERM a las balsas de membrana ricas en Thy-1. **A,B)** Neuronas hipocampales cultivadas sobre PLL (A) o sobre pGal-3 (B), fueron incubadas in vivo con anticuerpos anti-ERM y anti-Thy-1 siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito para el caso de L1 y Thy-1. Las flechas indican los puntos de co-localización entre ERM y Thy-1 (punteado color amarillo). Barras de escala: 10 μ m. **C)** El porcentaje de grupos de L1 que co-localizan con grupos de Thy-1 es significativamente mayor en las neuronas cultivadas sobre pGal-3 que en las neuronas control. Valores media \pm d.s., N=3 experimentos (20 campos por experimento), * $p < 0,001$.

Un análisis bioquímico similar al fraccionamiento de membrana para el estudio de la L1, mostró un aumento de la cantidad de ERM en las fracciones de balsas lipídicas de células crecidas sobre sustrato pGal-3 presentada como sustrato, comparadas con las de muestras control (figura 25).

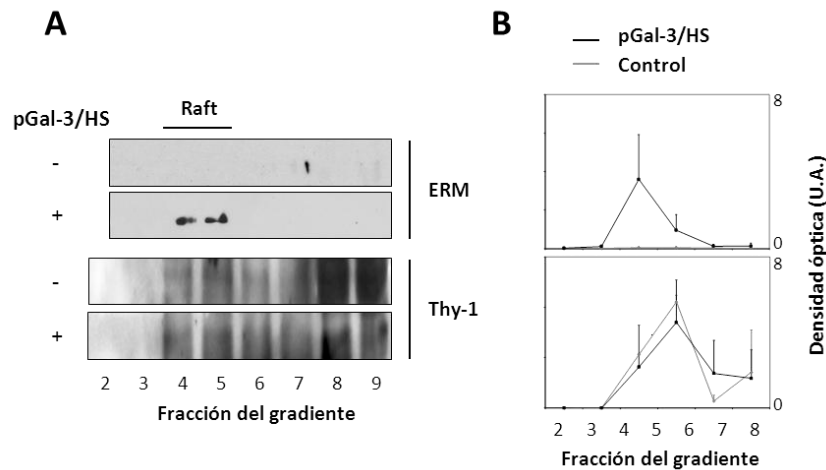


Figura 25. Los complejos pGal3–HS desplazan a ERM hacia balsas lipídicas de membrana ricas en Thy-1. Se extrajeron las membranas de las neuronas control y de las previamente tratadas con complejos pGal-3-HS, se fraccionaron y se analizaron de la misma forma descrita anteriormente. **A)** Las fracciones de membrana obtenidas se analizan por WB con anticuerpos frente a ERM y Thy-1. **B)** Los gráficos de densitometría reflejan la cantidad de proteína presente en cada fracción. En las células tratadas con complejos de pGal-3-HS, ERM se encuentra enriquecido en las fracciones que coinciden con las balsas lipídicas ricas Thy-1 (panel de Thy-1). Valores media \pm d.s. N=3 experimentos. Barras de escala: 10 μ m.

Se realizó además un segundo control del experimento, realizando los mismos experimentos y el mismo tipo de análisis con células crecidas sobre un sustrato de Gal-3 o sometidas a tratamiento con complejos Gal-3-HS, para comprobar que este efecto era exclusivo de la forma fosforilada de la lectina. Esta prueba deja clara otra evidencia, que únicamente la pGal-3 promueve la asociación de ERM con las balsas lipídicas, ya que ni en los experimentos de localización de las proteínas en vivo ni en los estudios bioquímicos se encontró relación alguna entre L1, ERM y Thy-1 (figura 26A, 26B y 26C).

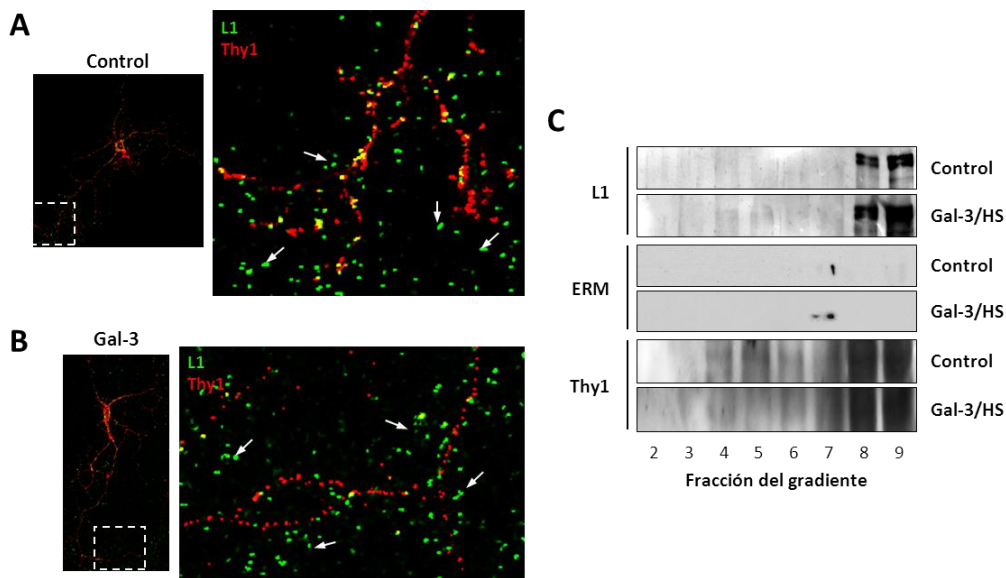


Figura 26. Gal-3 presentada como sustrato no desplaza a L1 hacia las balsas lipídicas ricas en Thy-1. A,B) Se cultivaron neuronas hipocampales durante 72 horas sobre PLL (A) o sobre Gal-3 (B). Las neuronas vivas se incubaron con anticuerpos anti-L1 y anti-Thy-1 siguiendo el protocolo antes descrito. En ningún caso se encontró coincidencia en la distribución de las proteínas (flechas). **C)** Las fracciones de membranas extraídas de células tratadas con Gal-3-HS se analizaron mediante WB para L1, ERM y Thy-1. Ni L1 ni ERM fueron encontradas desplazadas hacia las fracciones 4-5, enriquecidas en Thy-1.

- La expresión de una forma dominante negativa de L1, así como la perturbación de la formación de las balsas lipídicas de membrana, reducen la ramificación inducida por la galectina-3 fosforilada presentada como sustrato.

A fin de obtener una prueba determinante de la participación de las balsas de membrana y del papel de la proteína L1 en la ramificación neurítica inducida por pGal-3, nuestro modelo se puso a prueba de dos formas diferentes: alterando la formación de las balsas lipídicas, y modificando la señalización de la L1.

Para perturbar la formación de balsas lipídicas, los cultivos de neuronas se incubaron con 500 mM de metil- β -ciclodextrina (M β C). En estas condiciones, se consigue una extracción parcial de entre un 25-30% del colesterol de la membrana. Dado que el colesterol es uno de los principales componentes de las balsas lipídicas, esta reducción desestabiliza las balsas lipídicas (Abad-Rodríguez et al 2004), hecho que se ve reflejado bioquímicamente en el desplazamiento parcial de Thy-1 desde las fracciones de balsas lipídicas hacia fracciones más pesadas (figura 27F, panel inferior y gráfico).

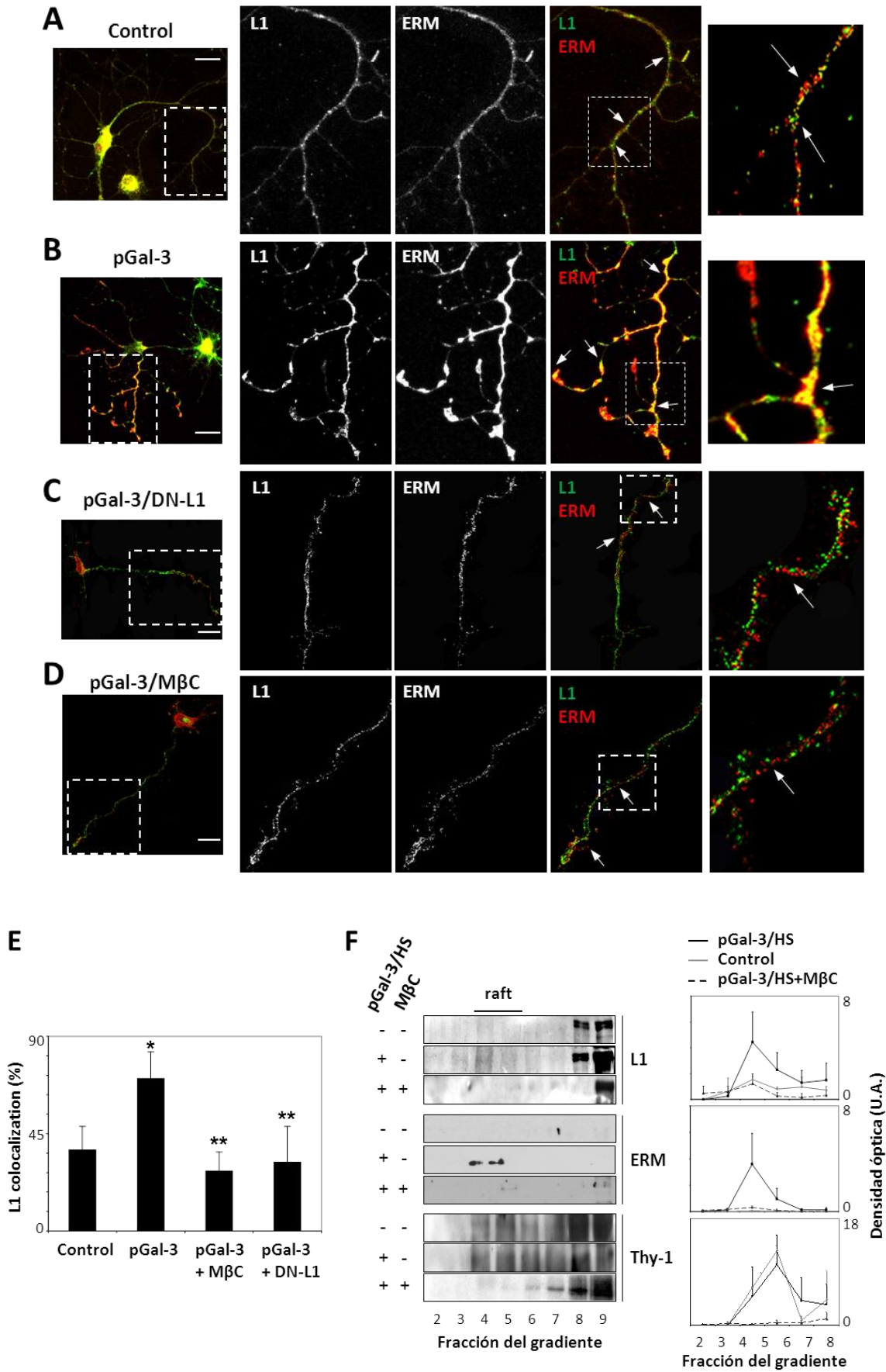


Figura 27. pGal-3 presentada como sustrato provoca la co-localización local entre ERM y L1. A,B,C,D) Se cultivaron neuronas hipocampales durante 72 horas sobre PLL (A), sobre pGal-3 con las células sin transfectar (B) o transfectadas con el plásmido DN-L1 (C), o cultivos tratados con M β C durante las últimas 48 horas del cultivo (D). Las células fueron entonces fijadas y marcadas con anticuerpos anti-ERM y anti-L1. Tras los lavados, los cultivos se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos. Las flechas indican los puntos de co-localización (en amarillo) entre grupos de ERM y L1 en los puntos de ramificación a lo largo del axón. **E)** El porcentaje de grupos de L1 que co-localizan con ERM es significativamente mayor en las neuronas cultivadas con pGal-3 que en los controles. El tratamiento con M β C o la transfección con el DN-L1 dan como resultado valores similares a los obtenidos en las células control. Valores media \pm d.s, N=3 experimentos (20 campos por experimento), * p <0,001 frente al control; ** p<0,001 frente a pGal-3. **F)** Las neuronas (tratadas con M β C cuando se indica) se cultivaron durante 7 días en placas recubiertas con Gal-3 o con pGal-3. Se extrajeron las membranas celulares con una solución fría de Triton X-100 al 1% y se fraccionaron siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Las fracciones de membrana obtenidas se analizan por WB frente a L1, ERM y Thy-1. La cantidad de proteína presente en cada fracción, medida por densitometría, se expone en los gráficos de la derecha. En las células tratadas con complejos de pGal-3-HS, L1 y ERM están enriquecidas en las fracciones 4 y 5, correspondiendo con las fracciones de las balsas lipídicas que contienen Thy-1 (paneles de Thy-1). El tratamiento con M β C perturba la formación de balsas de Thy-1 y suprime el efecto de reclutamiento inducido por pGal-3-HS. Valores media \pm d.s. N=3 experimentos. Barras de escala: 10 μ m.

En los experimentos realizados bajo estas condiciones, encontramos una drástica disminución en la ramificación inducida por pGal-3 (figura 28A y C), lo que indica que la organización fisiológica de las balsas lipídicas de membrana es necesaria para la inducción de la ramificación.

En una segunda serie de experimentos sobre-expresamos una forma dominante negativa (DN) de la proteína L1 (L1-1151Y> A) en las neuronas. Esta forma de la proteína alberga una única mutación en la zona yuxtamembranal de L1, que impide la correcta unión de la proteína a ERM y la ramificación axonal activada por la interacción homofílica L1-L1. Ésta mutación, sin embargo, no afecta al crecimiento axonal (Cheng et al 2005).

Las neuronas crecidas sobre un sustrato de pGal-3 y que expresan la forma DN-L1, presentaron un claro impedimento para la inducción de la ramificación, con axones poco o nada ramificados (figura 28B y 28C). Éstos resultados demuestran una vez más la importancia de la participación de las proteínas ERM en la señalización de L1 y en la inducción de la ramificación mediada por la interacción de pGal-3.

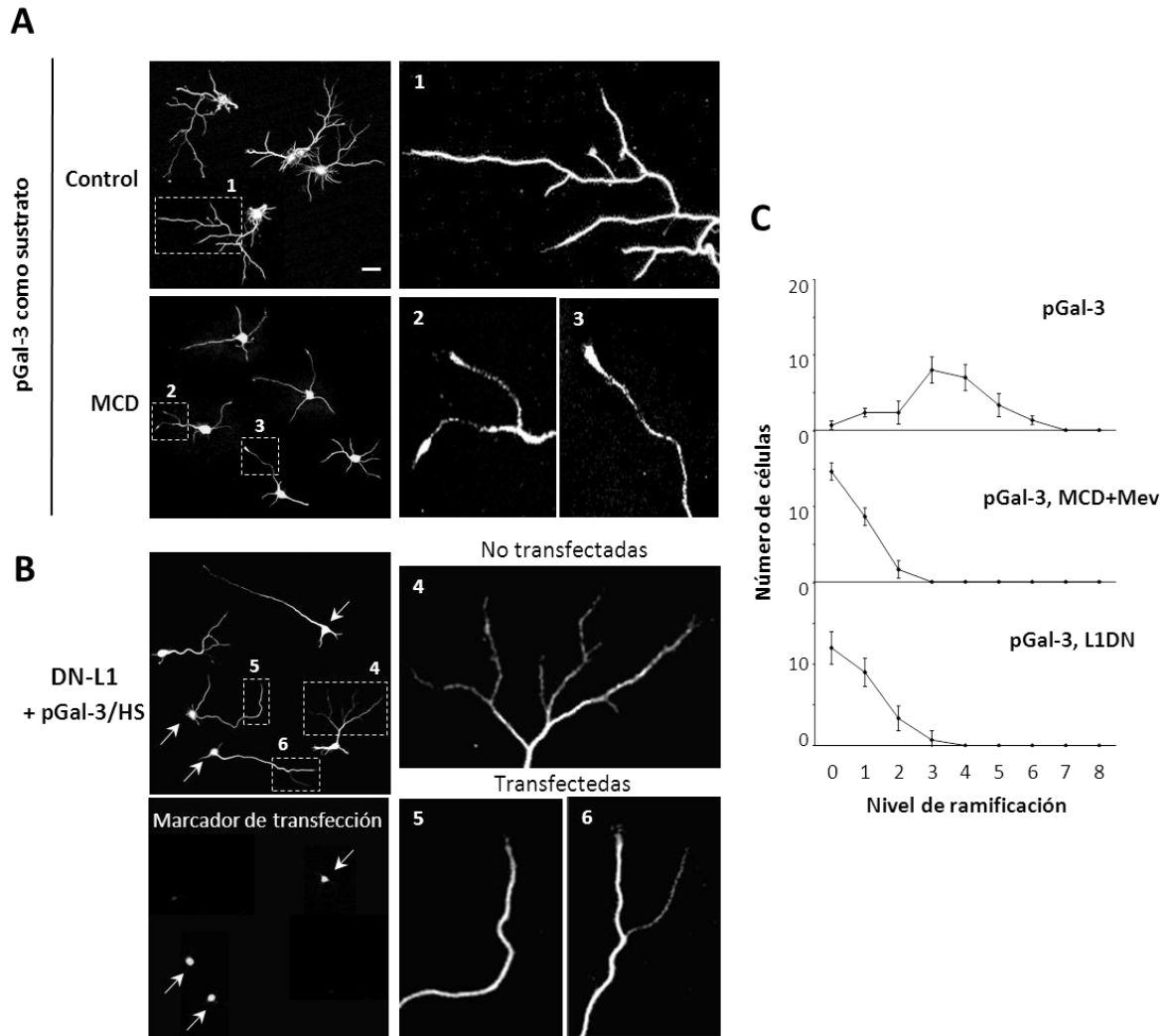


Figura 28. La inducción de una forma dominante negativa de L1 y la perturbación de la formación de las balsas lipídicas, impiden la ramificación inducida por pGal-3. Los cultivos de neuronas fueron fijados y marcados con anticuerpos anti- α -tubulina. **A)** Se agregó M β C a los cultivos de 1 DIV y se incubaron durante otras 48 horas para disminuir los niveles de colesterol de las membranas. **B)** Las neuronas se nucleofetaron con una suspensión que contenía el DN-L1 (ver materiales y métodos para más detalles), se cultivaron y se procesaron tras 3 DIV. **C)** El gráfico muestra el efecto de los tratamientos sobre la ramificación de las poblaciones de neuronas cuantificado de la misma forma en que se hizo en la Figura 17. Valor medio \pm d.s., N=3 experimentos (25 neuronas por experimento). Barras de escala: 10 μ m.

7. La unión de galectina-3 fosforilada induce la co-localización de L1 y ERM.

Hasta este momento, habíamos comprobado que la unión de pGal-3 desplaza a las proteínas L1 y ERM a las balsas de membrana ricas en Thy-1. Para poner de manifiesto la interacción de estas dos proteínas entre sí en estas áreas concretas, llevamos a cabo una batería de experimentos de co-localización con anticuerpos anti-L1 y anti-ERM.

Las neuronas control mostraron una vez más que las proteínas marcadas presentaban un bajo porcentaje de co-localización incluso en los puntos de ramificación (figura 27A, flechas sobre puntos de co-localización amarillos; figura 27E cuantificación). Por el contrario, las neuronas crecidas sobre un sustrato de pGal-3 mostraron un marcaje más continuado y más intenso en los puntos de ramificación, con un elevado nivel de co-localización entre L1 y ERM (figura 27B, flechas; figura 27E cuantificación).

Además, tanto la expresión de la forma DN-L1 (figura 27C) como la perturbación de las balsas lipídicas de membrana por extracción parcial de colesterol con M β C (figura 27D), disminuyeron el efecto de la interacción de pGal-3, viéndose reducida por tanto la co-localización entre L1 y ERM llevándolo a niveles de las células control (figura 27E cuantificación).

Estos resultados corroboran la hipótesis de que la interacción con el axón de los complejos pGal-3-HS, hace que L1 se acumule en las balsas lipídicas, provocando el reclutamiento de ERM por el lado citoplasmático. Se genera así una plataforma en la membrana a la que se asocian localmente los filamentos de actina y la maquinaria de regulación del citoesqueleto necesaria para la formación de una ramificación puntual en dichas localizaciones.

II. LA GALECTINA-4 DE NEURONAS COMO MEDIADORA DEL CRECIMIENTO AXONAL Y REGULADORA DE LA AGRUPACIÓN Y PRESENTACIÓN DE NCAM-L1 EN LA MEMBRANA AXONAL.

8. Las neuronas hipocampales y corticales expresan galectina-4 *in situ*.

Durante el estudio de expresión y función de las galectinas sobre cultivos de neuronas hipocampales *in vitro*, incluimos también la Gal-4. En esta ocasión, no observamos ningún efecto relevante sobre los parámetros de diferenciación o crecimiento neurítico (resultados no mostrados), aunque el patrón de expresión de la Gal-4 en las neuronas en cultivo era muy particular.

Teniendo en cuenta la bibliografía que describe la localización de Gal-4 en la membrana apical de las células epiteliales (Braccia et al 2003, Stechly et al 2009), se investigó la posibilidad de encontrar una localización polarizada a nivel de membrana también en las neuronas. Así, se realizaron diferentes experimentos de inmunofluorescencia en neuronas hipocampales de rata, en unos se permeabilizó la membrana como de costumbre, mientras que en otros se incubaron las células con el anticuerpo anti-Gal-4 sin permeabilización previa para limitar la accesibilidad del anticuerpo a la superficie de la membrana de las neuronas.

Estos experimentos mostraron una distribución diferencial de la galectina dependiendo de las condiciones de permeabilización. En células permeabilizadas, la distribución de Gal-4 era más o menos homogénea tanto en el axón como en el dominio somatodendrítico (figura 29A, paneles izquierdos, puntas de flecha y flechas respectivamente), en cambio, las inmunocitoquímicas en las que se prescindió de la permeabilización de membrana revelaron que la presencia de la galectina se limitaba a segmentos discretos de la membrana axonal (figura 29A, paneles derechos, puntas de flecha) quedando excluida del compartimento somatodendrítico. Este resultado sugería que la galectina, al igual que ocurría en células epiteliales, también podría desempeñar un papel específico y relevante en el desarrollo axonal.

Para confirmar la expresión neuronal de Gal-4, se obtuvieron extractos totales de cultivos de neuronas hipocampales y se analizaron por WB utilizando anticuerpo anti-Gal-4. Los resultados corroboraron la expresión de Gal-4 por parte de las neuronas, descartando que los astrocitos residuales, presentes en los cultivos de neuronas de hipocampo (menos del 10% del total del cultivo, Nickel 2003), estuvieran produciendo y liberando al medio extracelular la Gal-4 (figura 29B, panel superior, ET). De hecho, el análisis bioquímico tanto de extractos totales de astrocitos como de medio condicionado proveniente de cultivos de astrocitos corticales, revelaron que Gal-4 no es detectable en éste tipo de

células (figura 29B, panel central, ET y MC). Para contrastar este dato, se empleó la Gal-1 como control de expresión positivo en astrocitos (figura 29B, panel inferior, ET y MC). Finalmente, mediante inmunofluorescencia tampoco se detectó la presencia de Gal-4 en la glía marcada con GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, marcador de astrocitos; figura 29C, paneles superiores), mientras que en el control con Gal-1 encontramos un fuerte marcaje (figura 29C, paneles inferiores), lo que indica que los astrocitos no expresan Gal-4, o en caso de hacerlo, sería en cantidades no detectables.

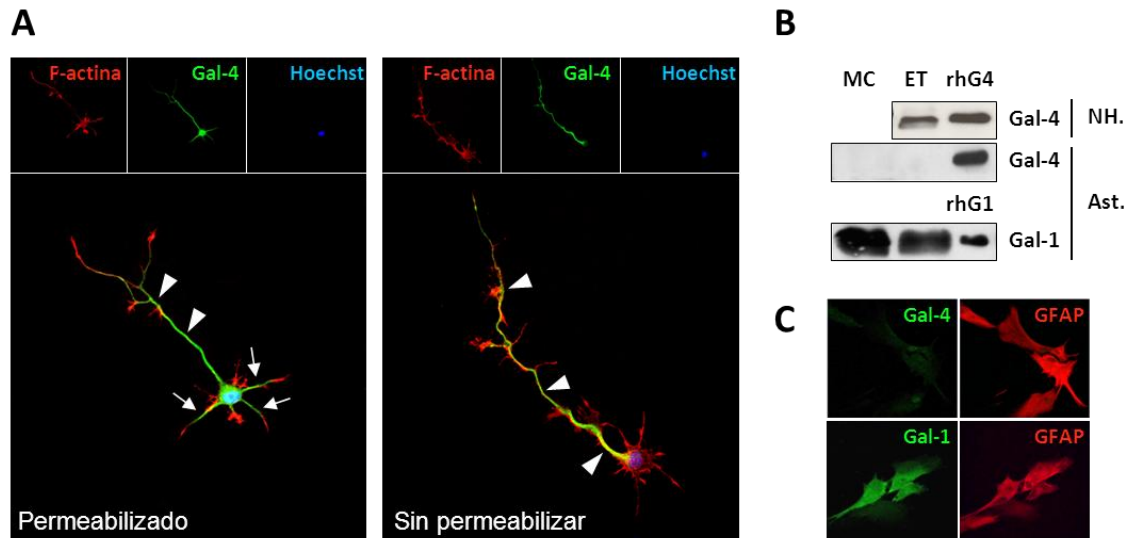


Figura 29. Gal-4 es expresada en cultivos de neuronas hipocampales *in vitro*. **A)** Neuronas hipocampales cultivadas durante 72 horas fueron marcadas con anticuerpo anti-Gal-4 (verde), Faloidina conjugada con Texas-red para ver los filamentos de actina (F-actina, rojo) y Hoechst para ver los núcleos (azul). Las inmunocitoquímicas se realizaron bajo condiciones de permeabilización de la membrana con Triton X-100, o sin permeabilizar. La distribución axonal y dendrítica de la galectina viene indicada por puntas de flecha y flechas respectivamente. **B)** El análisis por WB se realizó con extractos totales (ET) de neuronas hipocampales (NH) y de medio condicionado (MC) de astrocitos (Ast.), empleando anticuerpos anti-Gal-4 y anti-Gal-1. Se usaron también como controles positivos las formas de las galectinas humanas recombinantes rhG4 y rhG1. **C)** El doble marcaje de astrocitos para Gal-4 y Gal-1 junto al marcador específico de la línea astrogliol GFAP, muestra la nula expresión de Gal-4 por parte de los astrocitos. Barras de escala: 25µm.

Estos experimentos produjeron resultados similares en cultivos de neuronas corticales de rata, lo que indicaba que la distribución axonal segmentada de Gal-4 no es una característica exclusiva de las neuronas hipocampales (figura 30A). También se obtuvieron resultados positivos en el análisis bioquímico mediante WB con este tipo de neuronas (figura 30B).

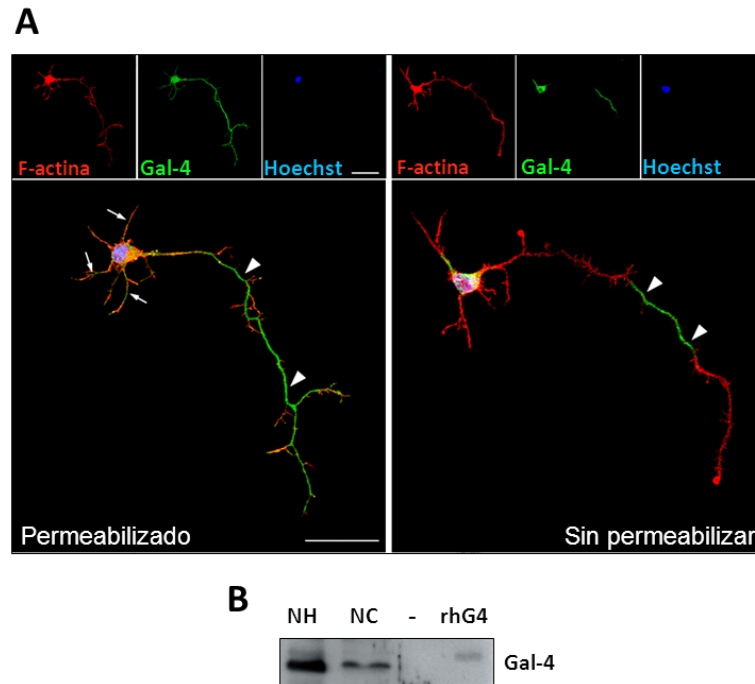


Figura 30. Gal-4 es expresada en cultivos de neuronas corticales *in vitro*. **A)** Neuronas corticales de 72 hiv fueron marcadas con anti-Gal-4 (verde), F-actina (rojo) y Hoechst (azul). Las inmunocitoquímicas se realizaron bajo condiciones de permeabilización de la membrana con Triton X-100, o sin permeabilizar. La distribución axonal y dendrítica de la galectina, idéntica a la obtenida para las neuronas hipocampales, viene indicada por puntas de flecha y flechas respectivamente. **B)** Se realizó un análisis por WB de extractos totales (ET) de neuronas hipocampales (NH) y neuronas corticales (NC) con anticuerpo anti-Gal-4, y se usó la forma recombinante humana rhG4 como control positivo. Los resultados mostraron que las neuronas corticales también tienen cierto nivel de expresión endógena de Gal-4. Barras de escala: 25 μ m.

Para confirmar la expresión de la galectina *in situ*, se realizó un análisis de expresión mediante inmunohistoquímicas dobles en secciones de cerebro de rata adulta, para Gal-4 y para marcadores axonales, Tuj1 para neuronas hipocampales, y NFH (cadenas pesadas de neurofilamentos o *Neurofilament Heavy chain*) para neuronas corticales. En concordancia con nuestros resultados *in vitro*, Gal-4 se expresa a lo largo de los axones de poblaciones de neuronas hipocampales (figura 31A, flechas) y corticales (figura 31B, flechas).

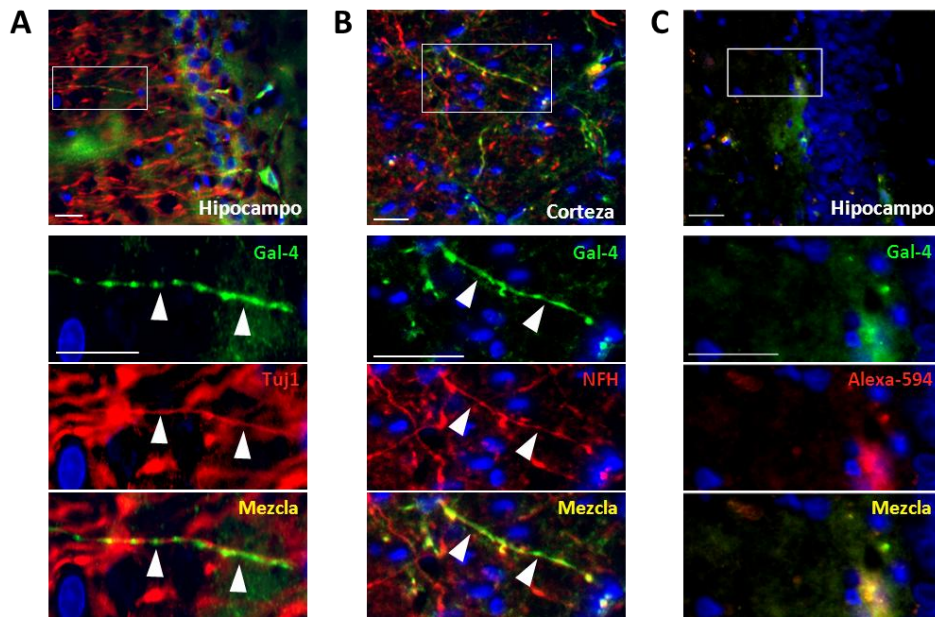


Figura 31. Gal-4 es expresada en tejido cerebral adulto *in situ*. A,B) Se realizaron secciones de cerebro de rata adulto embebido en parafina, y se realizó un doble marcaje para Gal-4 (verde), los marcadores axonales Tuj1 y NFH para neuronas hipocampales y corticales respectivamente, y Hoechst para marcar los núcleos (azul). Se detectó presencia en tractos axonales tanto en neuronas hipocampales (A) como en neuronas corticales (B). Las zonas enmarcadas se muestran en detalle en los paneles inferiores, en los cuales se puede apreciar la localización de Gal-4 con respecto a los marcadores axonales indicados por las puntas de flecha. C) Se realizó también un control para detectar marcaje inespecífico, utilizando tejido de los mismos animales y empleando el mismo procedimiento pero omitiendo el paso correspondiente al anticuerpo primario. Barras de escala: 25μm.

9. La galectina-4 se localiza en la membrana axonal desde estadíos de desarrollo tempranos, y se distribuye en tractos discretos a lo largo del axón en cultivos de neuronas maduras.

A fin de definir un posible papel de Gal-4 en la formación y extensión de axones, y teniendo en cuenta el importante papel que ejerce esta galectina durante la polarización de células epiteliales de intestino (Stechly et al 2009), se estudió la posibilidad de que la galectina pudiera tener una función en la polarización neuronal. Dado que observamos expresión de Gal-4 desde las primeras etapas de desarrollo (figura 32, estadio 1), incluso antes de la especificación morfológica del axón, se planteó la realización por vez primera de un estudio de la distribución de la galectina a lo largo de las sucesivas etapas del desarrollo neuronal (Dotti et al 1988), mediante la realización de marcajes por inmunofluorescencia a distintos tiempos de cultivo *in vitro*, comparando neuronas con y sin permeabilización.

Mientras que Gal-4 presentó un marcaje más o menos homogéneo en células permeabilizadas (figura 32, detalle 2), en neuronas no permeabilizadas el marcaje se veía limitado a la zona proximal de una sola neurita (figura 32, detalle 1, puntas de flecha). De forma consistente, en los siguientes estadios de desarrollo, cuando las neuronas comienzan a mostrar un axón morfológicamente definido, siguió apareciendo una marca de Gal-4 a lo largo de toda la célula permeabilizada (figura 32, estadios 2 y 2+, región 4), mientras que en condiciones de no permeabilización se encontró una vez más la señal limitada a la membrana axonal (figura 32, estadios 2 y 2+, región 3). Esta distribución se mantuvo en el siguiente estadio de desarrollo (figura 32, estadio 3), aunque en este caso comenzaba a aparecer un marcaje discontinuo en segmentos discretos a lo largo del axón, sin un aparente patrón definido (figura 32, región 5; figura 33, flechas y puntas de flecha). Este tipo de marcaje, al contrario de lo que ocurría con la Gal-3, no pareció presentar ningún tipo de correlación con elementos morfológicos del tipo puntos de nueva ramificación o la formación de filopodios y/o lamelipodios.

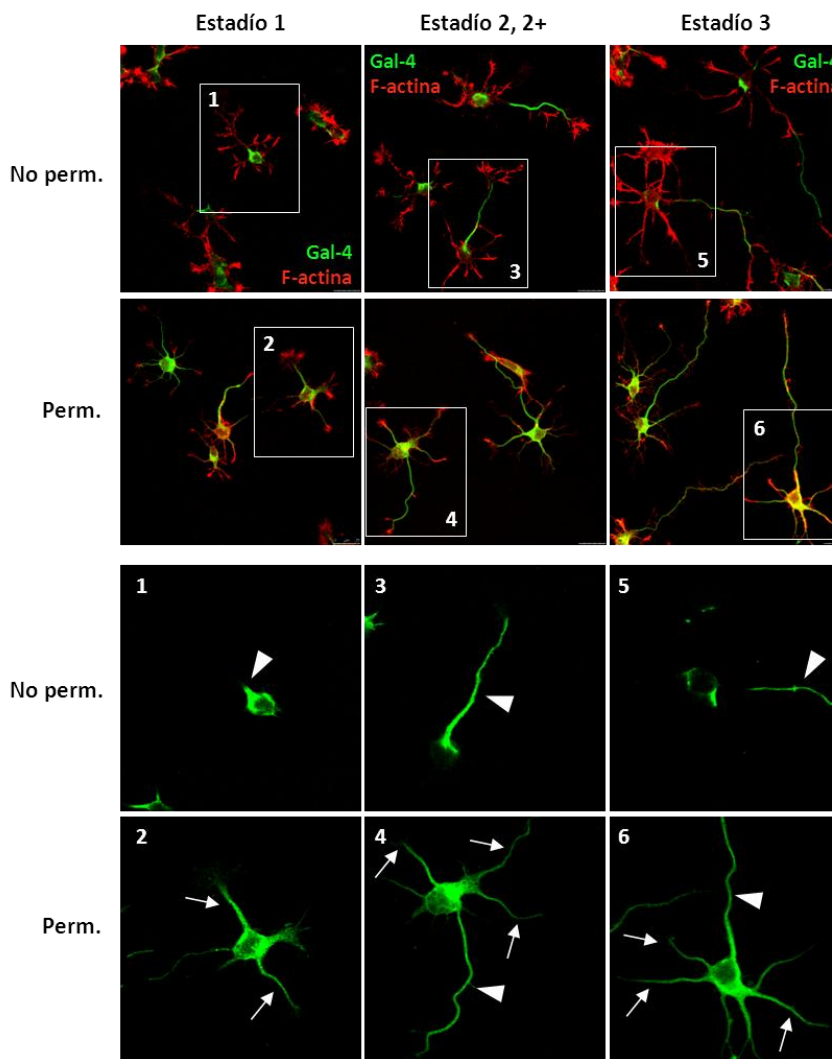


Figura 32. Marcaje de Gal-4 en cultivos de neuronas a lo largo de los diferentes estadios de desarrollo.

Se cultivaron neuronas hipocámpicas y se fijaron y procesaron mediante ICQ a diferentes tiempos, correspondiendo a los estadios de desarrollo específicos en cultivo (1, 2, 2+ y 3). Las neuronas permeabilizadas con Triton X-100 y no permeabilizadas fueron marcadas con anticuerpos para Gal-4 (verde) y F-actina (rojo). Los paneles inferiores muestran el canal verde correspondiente a las regiones enmarcadas en las imágenes superiores (1-6). La distribución de Gal-4 a nivel axonal y dendrítico se indica con puntas de flecha y flechas respectivamente. Barras de escala: 25 μ m.

Una explicación razonable a este fenómeno podría ser que las neuronas tuviesen algún tipo de daño a nivel axonal causado por la manipulación de las células, que resultase imperceptible bajo la tinción de filamentos de actina y que pudiéramos estar pasando por alto. Para comprobar esto, se marcaron neuronas sin permeabilizar con Gal-4, luego se permeabilizaron, y se incubaron de nuevo con un anticuerpo específico para α -tubulina acetilada, un marcador de microtúbulos axonales. Estos experimentos demostraron que los axones permanecían intactos en las zonas marcadas con Gal-4 (figura 33, paneles inferiores, puntas de flecha), excluyendo un posible daño estructural y sugiriendo que el marcaje discontinuo de la Gal-4 responde a una distribución específica.

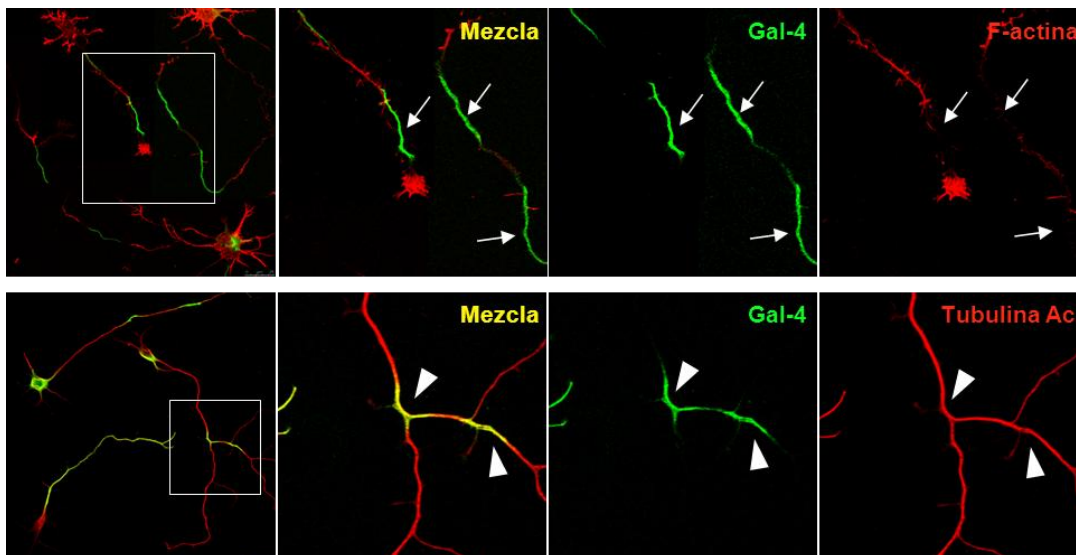


Figura 33. Gal-4 presenta un marcaje en tractos discretos sin un patrón definido. Neuronas hipocámpales en estadio de desarrollo 3 se fijaron y se marcaron en condiciones de no permeabilización con anticuerpos anti-Gal-4 (verde) y dos marcadores de citoesqueleto: Faloidina para marcar filamentos de actina (rojo), y anti-acetil- α -tubulina para marcar microtúbulos (rojo). Los paneles de la derecha muestran en detalle los tres canales correspondientes a las zonas enmarcadas de las imágenes de la izquierda. Se señalan con flechas y puntas de flecha el marcaje de Gal-4 sobre el marcaje de actina y de tubulina respectivamente, donde comprobamos que en ningún caso los axones presentan algún tipo de daño. Barras de escala: 25 μ m.

10. El silenciamiento de la galectina-4 mediante RNA de interferencia retarda el crecimiento axonal.

La observación de un marcaje axonal temprano de Gal-4 nos planteó la posibilidad de que una disminución en los niveles intrínsecos de la galectina pudieran afectar al correcto desarrollo del axón. Para poder reducir la producción de Gal-4 en las células, se nucleofectaron neuronas hipocampales empleando un RNA de interferencia o siRNA específico para nuestra lectina (siRNA-hG4), y empleando como control negativo el RNA estándar comercial *Mission® siRNA Universal Control* (UNCsiRNA).

En ambos casos, las neuronas fueron co-transfectadas con un cDNA codificante para la proteína fluorescente GFP (pMAX-GFP; *Green Fluorescent Protein*) para poder evaluar la eficiencia de transfección del vector utilizado. Las neuronas transfectadas con el siRNA-hG4 presentaron una señal prácticamente indetectable de Gal-4 en inmunofluorescencia (figura 34A, siRNA-hG4, Gal-4, flechas), mientras que tanto las neuronas transfectadas con el UNCsiRNA (figura 34A, UNCsiRNA, Gal-4, puntas de flecha) como las no transfectadas (figura 34A, siRNA, Gal-4, puntas de flecha) presentaron el marcaje segmentado característico de la galectina.

Esta inhibición en la expresión de Gal-4 se comprobó bioquímicamente mediante WB. El análisis por densitometría de las bandas obtenidas, reveló que los extractos totales procedentes de neuronas transfectadas con siRNA-hG4, mostraban una reducción un $78 \pm 22\%$ que aquellas neuronas transfectadas con UNCsiRNA o que las no transfectadas (figura 34B). Pero además de la disminución en la expresión, se comprobó que la pérdida de la galectina conllevaba un efecto a nivel morfológico en las células. Los axones de neuronas transfectadas con siRNA-hG4 resultaron ser significativamente más cortos ($85.4 \pm 33.7 \mu\text{m}$) que los de las neuronas transfectadas con UNCsiRNA ($184.5 \pm 41.3 \mu\text{m}$) (figura 34C, barras negras, $*p < 0.0001$ en el test de Student), mientras que no se detectó diferencia alguna en el resto de neuritas (figura 34C, barras gris claro).

Posteriormente, se comprobó si era posible llevar a cabo un rescate del fenotipo original incorporando al medio de cultivo de las neuronas la Gal-4 recombinante. En este caso, la longitud de los axones nucleofectados con siRNA-hG4 ($182.6 \pm 41.2 \mu\text{m}$) resultaron ser muy similares a los valores medidos para las neuronas transfectadas con UNCsiRNA (figura 34A, barras gris oscuro, $*p < 0.0001$ en el test de Student).

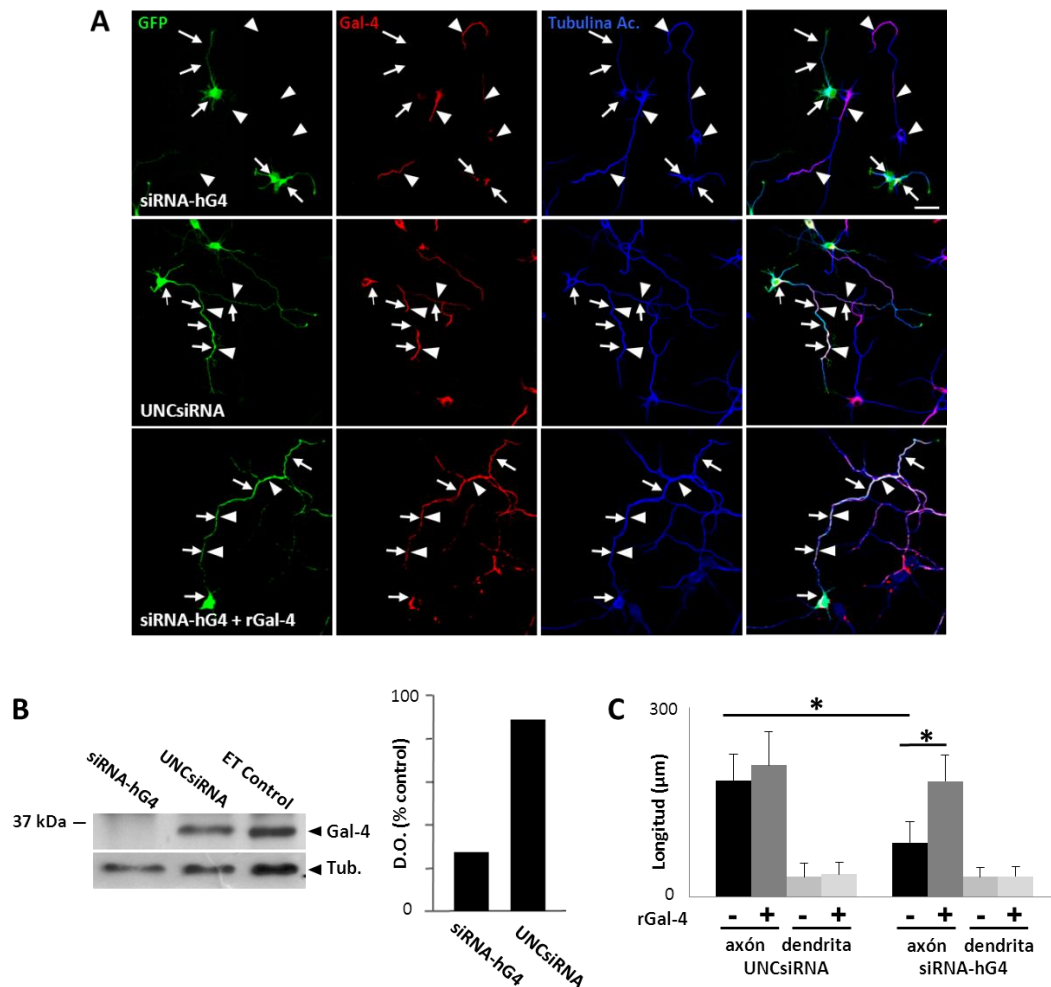


Figura 34. La disminución en la expresión de Gal-4 retarda el crecimiento axonal. La producción de Gal-4 en neuronas se inhibió mediante nucleofección con siRNA-hG4. Como control negativo, se empleó UNCsiRNA. La eficiencia de transfección se evaluó co-transfectando con pMAX-GFP. Se realizó un rescate de la funcionalidad añadiendo Gal-4 recombinante (25µg/ml; rGal-4). **A)** 72 horas tras la transfección, las células se fijaron y se marcaron con anti-Gal-4 (rojo). Después se permeabilizaron, y se marcaron con anti-acetil- α -tubulina (azul). Las neuronas transfectadas con el siRNA presentaron una disminución en el grado de marcaje de Gal-4 y axones más cortos (imágenes superiores, flechas) en comparación a los controles (imágenes centrales y puntas de flecha en las superiores). La presencia de rGal-4 devolvió la longitud axonal a los valores control (paneles inferiores) **B)** Las neuronas positivas para GFP se separaron y se recogieron por citometría de flujo, y se analizaron por WB. Las células transfectadas con el siRNA-hG4 expresaron bajos niveles de Gal-4, en comparación con los extractos totales de neuronas transfectadas con UNCsiRNA o los controles (ET Control). Se muestra la expresión de tubulina (Tub.) como control de carga. Se realizó una cuantificación por densitometría de la señal de Gal-4 con respecto al control. **C)** Se cuantificó la longitud axonal siguiendo el protocolo descrito anteriormente, eligiendo células GFP positivas con un promedio de pérdida de intensidad de señal de Gal-4 de al menos un 30% con respecto a los controles para considerarlas interferidas. El gráfico de barras muestra la longitud media de axones y dendritas en neuronas transfectadas con siRNA-hG4 y UNCsiRNA, en presencia o ausencia de rGal-4. Los axones de las neuronas interferidas resultaron ser significativamente más cortos que los controles, recuperando su longitud con la adición de rGal-4. No se encontró efecto alguno en otras neuritas. Valores media \pm d.s., N=4 experimentos (30 células por experimento), * $p < 0,0001$. Barras de escala: 25 μ m.

Durante la realización de este modelo experimental, hubo que tener en cuenta que la señal en tractos de la galectina sobre la membrana del axón, podría deberse a la adhesión directa de la Gal-4 incorporada al medio de cultivo y no a la lectina endógena de la neurona. Para corroborar este supuesto, se realizaron una serie de experimentos preliminares para estudiar si la Gal-4 estaba siendo endocitada por las células. En primer lugar, se realizaron experimentos de endocitosis en neuronas tratadas con Gal-4 conjugada con el fluoróforo FITC (Gal-4-FITC) y fijadas a distintos tiempos. Durante las primeras 2 horas posteriores a la endocitosis, la Gal-4-FITC se situó de forma perinuclear coincidiendo con los endosomas de reciclaje marcados con anticuerpo anti-Rab11 (proteína específica de este tipo de vesículas), (figura 35A, 10 minutos y 2 horas). A partir de 4 h, la Gal-4-FITC co-localizó con la L1 en la membrana axonal sugiriendo que, al menos en parte, la Gal-4 endocitada estaba alcanzando la membrana junto con la L1 (figura 35A, 4 horas, flechas). En un segundo experimento, se comprobó si la galectina podía ser endocitada también por el soma celular, pre-incubando las neuronas con Gal-4-FITC antes de su siembra. Tras 48 horas de cultivo *in vitro*, se comprobó que la Gal-4 co-localizaba con la señal de FITC en varios segmentos a lo largo del axón, lo que nos hace suponer que la galectina endocitada estaba siendo incorporada al tráfico vesicular y viajando a lo largo del axón para situarse en zonas restringidas de la membrana (figura 35B, flechas).

Con estos resultados no podemos descartar que durante los experimentos de rescate en los que las células se incuban de forma continua con la Gal-4 recombinante, parte de ésta esté siendo incorporada directamente en la membrana, o que algún sistema de reciclaje local pueda estar capturando la galectina e incorporándola a la membrana axonal. Lo que sí podemos concluir, es que la síntesis de Gal-4 es necesaria para un desarrollo axonal normal, y que su ausencia retarda significativamente la elongación del axón.

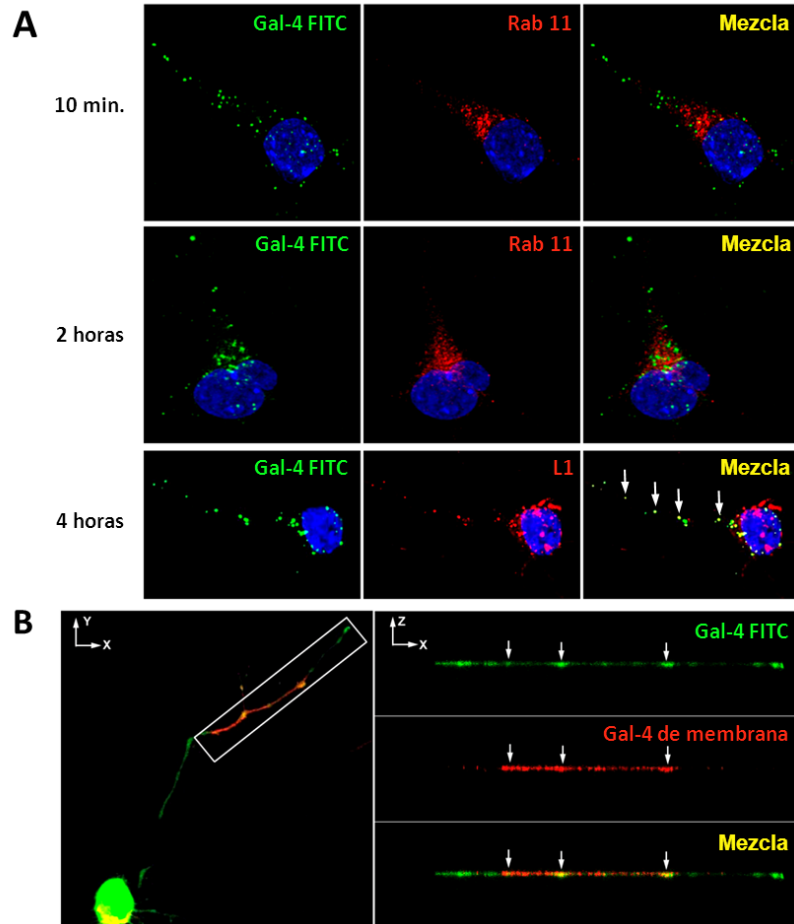


Figura 35. La Gal-4 exógena se incorpora al tráfico vesicular de la neurona, y viaja a lo largo del axón hasta zonas restringidas de la membrana. A) Neuronas de 24 hiv se incubaron con Gal-4 conjugada con FITC (Gal-4-FITC, ver epígrafe 4.1 de materiales y métodos) para después, bien fijarlas a distintos tiempos y marcarlas con anticuerpo α -Rab11 (rojo), o bien incubarlas durante una hora a 12°C con anticuerpo anti-L1 (rojo) en un medio tamponado, después con su correspondiente secundario conjugados con fluoróforo para inducir el agrupamiento del primario sobre la membrana axonal (*co-patching*), y finalmente fijadas. Gal-4-FITC fue endocitada y localizada en los endosomas de reciclaje situados región perinuclear en el comienzo del experimento (10 minutos a 2 horas). A partir de las 4 horas, la Gal-4-FITC comenzó a co-localizar con los agregados de L1 (flechas). Parte de la Gal-4 endocitada está alcanzando la membrana axonal junto con la L1. **B)** Neuronas en suspensión se incubaron con Gal-4-FITC (ver materiales y métodos), comprobándose que la Gal-4 exógena está siendo endocitada por el cuerpo celular. Tras 48 horas de cultivo, Gal-4 comienza a co-localizar con la señal de FITC en los axones (flechas), sugiriendo que la galectina ha sido transportada a lo largo del axón hasta alcanzar la membrana.

11. El marcaje axonal de la galectina-4 se pierde por inhibición metabólica del proceso de sulfatación.

Gal-4 presenta alta especificidad de unión a los sulfátidos de la membrana, glicoesfingolípidos sulfatados asociados a los rafts de membrana (Hansen et al 2001, Ideo et al 2005, Delacour et al 2005).

Teniendo en cuenta este hecho, estudiamos la posible existencia de una vinculación entre Gal-4 y los sulfátidos de membrana como elemento participante en esta peculiar distribución axonal. Para ello se inhibió el metabolismo del sulfato incubando los cultivos de neuronas con clorato de sodio (NaClO_3) (Baeuerle & Huttner 1986, Garcia et al 2007), compuesto que bloquea el proceso de formación del agente donador de grupos sulfato PAPS (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato), consiguiendo una reducción de la sulfatación hasta un $32 \pm 3\%$ con respecto a los niveles de las neuronas no tratadas (figura 36B).

El marcaje de la galectina en neuronas tratadas con NaClO_3 y permeabilizadas después de la fijación, no presentó ninguna modificación notable con respecto a los las células control no tratadas con el compuesto, y apareció con la misma distribución homogénea por el axón, soma y dendritas que ya habíamos descrito anteriormente (figura 36A, paneles inferiores, puntas de flecha y flechas para señalar axón y dendritas respectivamente), mostrando que el tratamiento no está afectando a la biosíntesis de la lectina. Sin embargo, cuando se prescindió de la permeabilización de la membrana, el marcaje axonal de Gal-4 prácticamente desapareció en las neuronas que habían sido tratadas con NaClO_3 (figura 36A, paneles superiores, flechas). Estos resultados indican que la presencia de la galectina en la membrana axonal es dependiente de que el proceso de sulfatación se lleve a cabo correctamente, permitiendo una correcta biosíntesis y distribución de estos componentes de la membrana de la neurona.

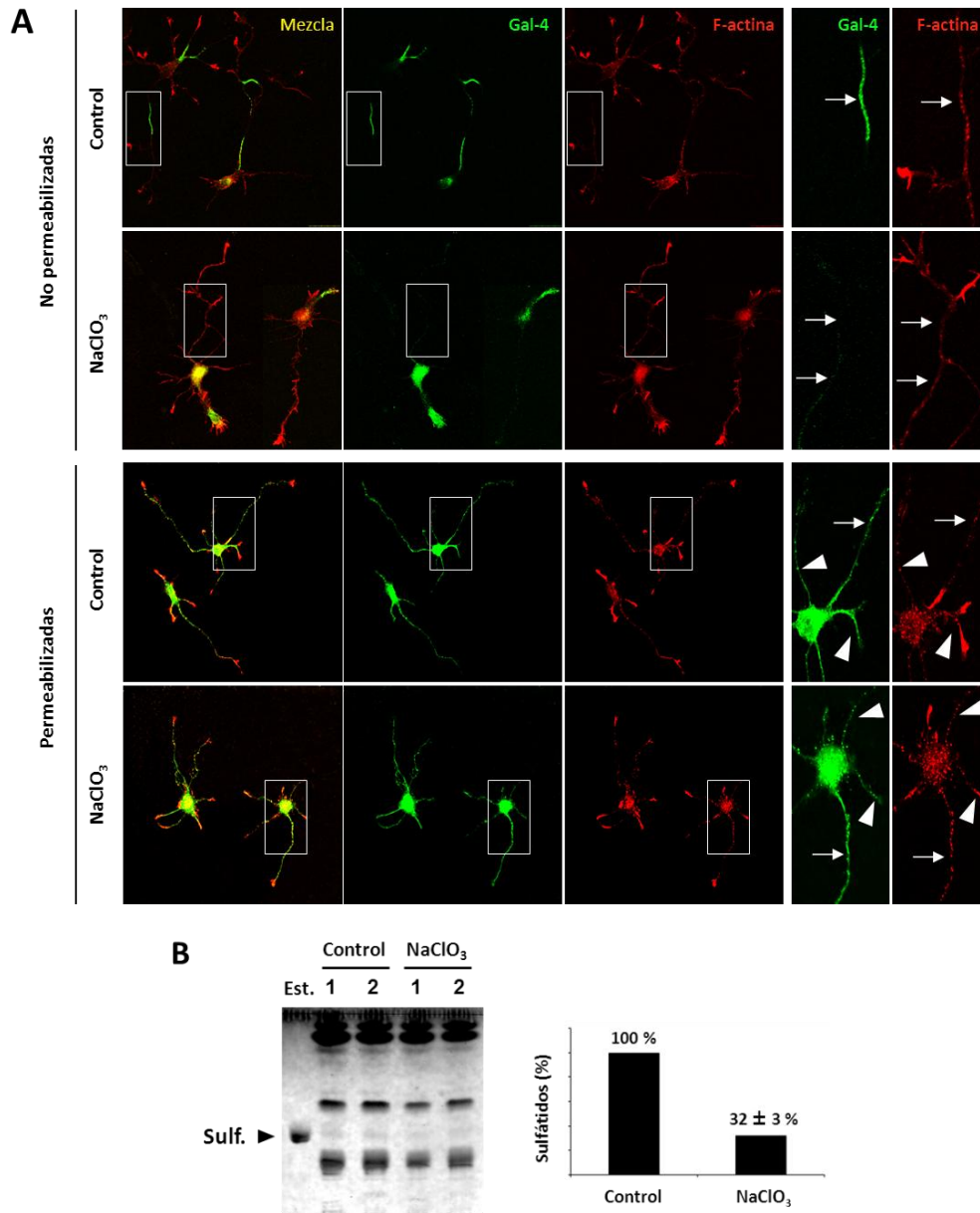


Figura 36. La inhibición metabólica de la sulfatación afecta a la distribución de Gal-4 en la membrana axonal. A) A un cultivo de neuronas hipocámpales de 24 hiv, se incorporó el inhibidor metabólico de la sulfatación clorato de sodio (NaClO₃, 75 mM), y se dejó actuar 48 horas. Después, las neuronas se fijaron y se marcaron con anticuerpo Gal-4 (verde) y con faloidina para marcar F-actina (rojo) en condiciones de permeabilización con Triton X-100 o de no permeabilización. Se usaron en paralelo cultivos de neuronas no tratadas como controles. En las áreas enmarcadas en las imágenes de la izquierda y mostradas con mayor detalle en las de la derecha, comprobamos que el tratamiento con NaClO₃ conlleva una pérdida de la distribución axonal de Gal-4. Las flechas y puntas de flecha señalan axones y dendritas respectivamente. Barras de escala: 25 μm. **B)** Se extrajeron lípidos de las neuronas tratadas con NaClO₃, se separaron mediante una TLC (ver epígrafe 4.2 de materiales y métodos). En el panel de la derecha se muestran los resultados de 2 muestras de 2 experimentos diferentes (N=3 experimentos). El gráfico de la derecha muestra la cuantificación por densitometría de la señal de sulfátidos con respecto los estándares (Est.). El tratamiento inhibe la expresión de sulfátidos en cultivos de neuronas un 68% con respecto a las neuronas sin tratar.

Se ha comprobado recientemente, que Gal-4 también se une con gran afinidad al colesterol 3-sulfato (Ideo et al 2007), otra molécula sulfatada que como ya se ha comentado, es un componente principal de las balsas lipídicas de membrana a las que se viene asociando la galectina. Por este motivo, se planteó la idea de que reduciendo la presencia de este lípido en la membrana neuronal, y perturbando por tanto la estructura de las balsas lipídicas, se podría afectar a la distribución axonal de Gal-4.

Para comprobar este hecho, se extrajo colesterol de la membrana de las neuronas mediante una incubación con metil- β -ciclodextrina (M β C) en condiciones que, como ya se ha estudiado previamente (Abad-Rodríguez et al 2004), se extrae en torno al 30% del total de colesterol de las membranas de las neuronas, y altera la organización de los rafts. El resultado de este experimento muestra que la incubación con M β C en condiciones no induce modificación alguna del marcaje axonal de Gal-4, que sigue apareciendo distribuido en tractos discretos de la misma forma en que lo hace en los cultivos control sin tratamiento (figura 37, flechas).

Este hecho sugiere que la distribución de la Gal-4 axonal, no requiere la unión al colesterol de la membrana, y que es independiente del contenido total de esta molécula en las balsas lipídicas, incluyendo la variable sulfatada o colesterol 3-sulfato, que también es extraída por la M β C en la misma proporción que el resto de colesterol (Visconti et al 1999). Este dato se correlaciona además con recientes publicaciones en las que se comprobó que Gal-4 se asocia a microdominios de membrana libres de colesterol (Hansen et al 2001).

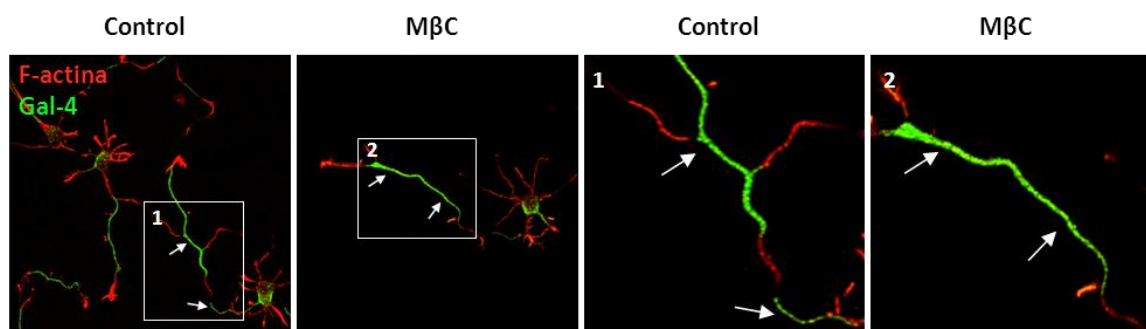


Figura 37. La extracción parcial del colesterol de la membrana neuronal no afecta a la distribución axonal de Gal-4. Se cultivaron neuronas hipocámpales durante 48 horas, y después, durante 24 horas más en presencia de metil- β -ciclodextrina (M β C, 500 mM), compuesto que extrae parcialmente el colesterol de las membranas. Las neuronas fueron después fijadas y marcadas en condiciones de no permeabilización con anticuerpo anti-Gal-4 (verde) y Faloidina para ver filamentos de actina (rojo). Las áreas enmarcadas de las imágenes de la izquierda, se muestran con mayor detalle en las de la derecha, donde se señala con flechas el marcaje típicamente axonal de Gal-4 que no se ve alterado por el tratamiento. Barras de escala: 25 μ m.

12. La distribución axonal de galectina-4 requiere de un citoesqueleto de tubulina intacto.

En las células epiteliales intestinales, la interacción entre Gal-4 y los sulfátidos de membrana se ha propuesto que pudiera tener un papel funcional en la agrupación de las balsas lipídicas para la fusión apical de las glicoproteínas de vesículas de transporte post-Golgi (Stechly et al 2009, Delacour et al 2005). El hecho de que las vesículas se muevan hacia los dominios diana a lo largo de las estructuras del citoesqueleto (Weisz & Rodriguez-Boulan 2009), nos hizo plantear la hipótesis de que el citoesqueleto podría estar jugando un papel relevante en la distribución axonal de Gal-4.

Para abordar esta cuestión, se incubaron durante dos horas cultivos de neuronas desarrolladas con drogas que despolimerizan el citoesqueleto: la lantrunculina, que actúa sobre la polimerización del citoesqueleto de actina, y el nocodazol, que lo hace sobre la polimerización de microtúbulos. Comprobamos el efecto de las drogas viendo que las neuronas tratadas con lantrunculina mostraban microtúbulos intactos mediante un marcaje específico para α -tubulina acetilada, y las tratadas con nocodazol no mostraban alteraciones de los filamentos de actina marcados con faloidina conjugada con Texas-red.

La despolimerización de los filamentos de actina bajo el tratamiento con lantrunculina, no influyó especialmente en la señal axonal de Gal-4 comparado con las células control no tratadas (figura 38A, flechas), lo que sugería que la localización axonal de la galectina no depende de la polimerización subcortical de F-actina. Por el contrario, en aquellas células que sufrieron despolimerización de los filamentos de tubulina a causa del tratamiento con nocodazol, el marcaje en tractos axonales resultó ser indetectable en las neuronas tratadas (figura 38B, puntas de flecha), y no en las neuronas control (figura 38B, flechas).

Estos resultados indicaban, en concordancia con los estudios sobre las células epiteliales polarizadas, que la localización de Gal-4 en la membrana axonal requiere que los microtúbulos estén intactos para poder llegar a sus lugares específicos, y es independiente del estado de la F-actina subcortical. Todo esto sugiere que la Gal-4 pudiera estar siendo transportada a estas zonas específicas de la membrana axonal mediante transportadores asociados a microtúbulos.

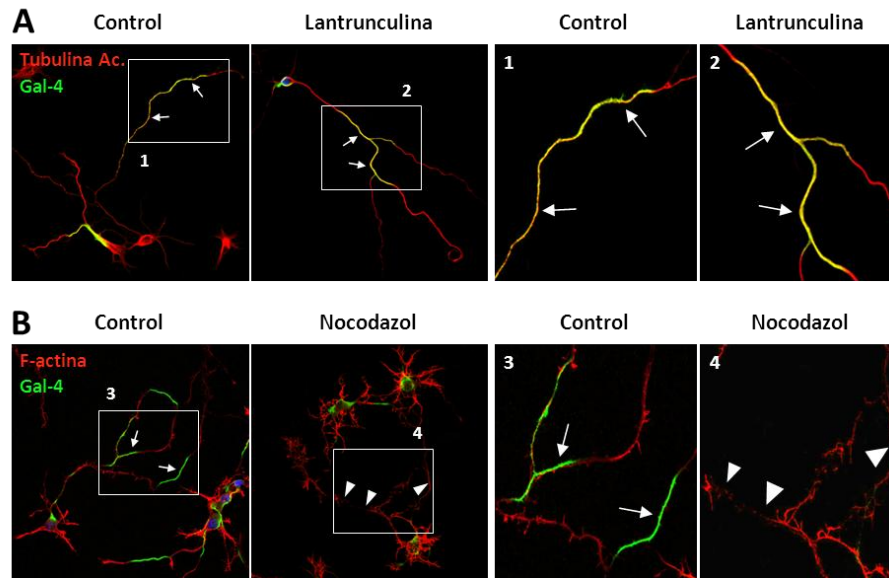


Figura 38. La correcta estructura del citoesqueleto de tubulina es imprescindible para la distribución de membrana de Gal-4. A,B) Neuronas hipocámpales de 72 hiv, se incubaron durante 2 horas con dos tipos de drogas que causan alteraciones en el citoesqueleto: lantrunculina (2.5 μ M) que inhibe la polimerización de filamentos de actina (A), y nocodazol (7 μ M) que inhibe la polimerización de microtúbulos (B). Las neuronas fueron después fijadas y marcadas en condiciones de no permeabilización con anticuerpos anti-Gal-4 (verde) y anti-acetil- α -tubulina en el primer caso, o Faloidina para ver filamentos de actina en el segundo (ambos en rojo). Las áreas enmarcadas de las imágenes de la izquierda, se muestran con mayor detalle en las de la derecha, donde se señala con flechas el marcaje axonal característico de Gal-4 resultante con el tratamiento con lantrunculina, y con puntas de flecha las regiones donde se pierde la señal de galectina al despolimerizarse la tubulina bajo los efectos del nocodazol. Barras de escala: 25 μ m.

13. La galectina-4 interacciona con L1, y su reducción previene la formación de agregados de L1 sobre la membrana axonal.

Como ya se comprobó, la disminución de la producción de Gal-4 endógena por parte de las neuronas, conllevó un enlentecimiento en su crecimiento axonal, además de cambios en la distribución particular de la galectina sobre la membrana del axón. Esto sugirió que Gal-4 podría estar influyendo sobre la elongación axonal, interaccionando y modulando la actividad de moléculas implicadas en el crecimiento de los axones, las cuales estarían presentes en la superficie de los mismos.

Se ha descrito que Gal-4 es responsable de la selección de distintas glicoproteínas por la unión a sus N-glicanos característicos. Esto permite su transporte polarizado específico hacia el dominio apical de las células epiteliales del intestino (Stechly et al 2009, Morelle et al 2009).

Teniendo en cuenta este dato, planteamos la posibilidad de que un mecanismo similar pudiera estar mediando el posicionamiento de glicoproteínas en la superficie de la membrana plasmática del axón. Por este motivo, seleccionamos la proteína de membrana N-glicosilada NCAM-L1 como posible candidato para estudiar este modelo de transporte.

Para comenzar, se comprobó la interacción entre Gal-4 y L1. De forma similar a los experimentos de co-localización empleados en el estudio de la Gal-3, incubamos células vivas con anticuerpos anti-Gal-4 y anti-NCAM-L1, seguido de otra incubación con los respectivos anticuerpos secundarios fluorescentes (Abad-Rodríguez et al 2004). Este experimento resultó en una notable cantidad de agregados de Gal-4 que co-localizaban con los de la L1 (figura 39A, punteado color amarillo), sugiriendo la existencia de una interacción entre ambas moléculas. Además, dichos agregados en co-localización se presentaron siguiendo el mismo patrón de la Gal-4, en tractos discontinuos (figura 39B).

Para comprobar la veracidad de esta supuesta interacción entre Gal-4 y los N-glicanos de la proteína L1, se cultivaron células PC12 y se trataron con un inhibidor de la α -manosidasa I, la deoxymannojirimycin (DMJ). Este compuesto es capaz de bloquear la formación de N-glicanos complejos con terminales del tipo LacNAc, que son reconocidos por la Gal-4. Para preservar las interacciones entre proteínas durante el proceso de extracción, se recurrió de nuevo al reactivo de entrecruzamiento reversible DSP (ver sección de materiales y métodos). Los WB con anti-Gal-4 mostraron la presencia de la lectina en los inmunoprecipitados con anticuerpo anti-L1 (figura 39C, IP L1, WB Gal-4). Además, el tratamiento con DMJ redujo de forma importante la cantidad de Gal-4 co-inmunoprecipitada (figura 39C, IP L1 +DMJ, WB Gal-4).

Para reforzar estos resultados, se realizó el experimento inverso, es decir, se inmunoprecipitó con anti-Gal-4 mediante el mismo procedimiento de entrecruzamiento de antes, y se realizó un WB con anti-L1. Como era de esperar, L1 también co-inmunoprecipitó con Gal4 (figura 39C, IP Gal-4, WB L1), y una vez más, el tratamiento con DMJ revirtió este efecto (figura 39C, IP Gal-4 +DMJ, WB L1).

Este experimento reveló que Gal-4 y L1 forman complejos, y que el hecho de inhibir a la enzima α -manosidasa I con el DMJ afecta esta interacción, indicando que los terminales LacNAc de los glicanos complejos de tipo N presentes en L1, son ligandos importantes reconocidos por Gal-4.

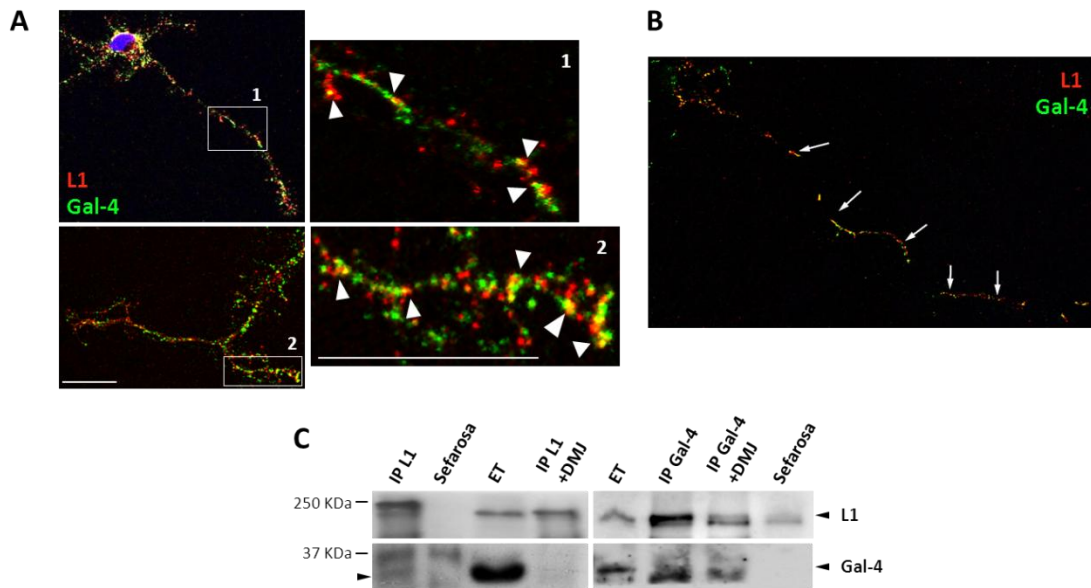


Figura 39. Gal-4 interacciona con L1 en la membrana axonal. A, B) Neuronas de 72 horas se incubaron durante una hora a 12°C con una mezcla de anticuerpos anti-Gal-4 (verde) y anti-L1 (rojo) en un medio tamponado. Después, se incubaron con los correspondientes secundarios conjugados con fluoróforos para inducir el agrupamiento de los primarios sobre la membrana axonal. Los resultados muestran una gran cantidad de agregados de Gal-4 sobre el axón, de los cuales, muchos coinciden con los agregados de L1 (A, puntas de flecha). Se puede apreciar que la distribución espacial de los agregados que co-localizan, coinciden con el patrón de distribución en trectos distribuidos a lo largo del axón. Barras de escala: 25 μ m. **C)** PC12 cultivadas en ausencia o presencia de 1-deoxymannojirimycin (DMJ) fueron tratadas con el reactivo de entrecruzamiento DSP de la misma forma en que se hizo en experimentos anteriores. Una vez hechos los extractos celulares (ET), se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-L1 o anti-Gal-4, y después, se realizaron sendos WBs con anti-Gal-4 y anti-L1 respectivamente. Se comprobó que L1 co-inmunoprecipitó Gal-4 mucho más en células no tratadas con el inhibidor de la glucosidación (IP L1) que en las células tratadas (IP L1 + DMJ). El experimento inverso resultó coherente con el primero, ya que Gal-4 también co-inmunoprecipitó L1 en las células control (IP Gal-4) de una forma mucho más notable que en las células tratadas (IP Gal-4 + DMJ).

El hecho de que la formación de agregados de L1 en la membrana axonal sea un requisito para la inducción de la elongación de esta parte de la neurona (Nakai & Kamiguchi 2002), junto con nuestras evidencias de que Gal-4 se une a la L1 en la membrana de los axones y que su interferencia conlleva una disminución en el crecimiento axonal, nos planteamos comprobar si la forma de agregación de L1 sobre la membrana podría verse modificada en ausencia de Gal-4. Para comprobarlo utilizamos la técnica de *co-patching* con anticuerpo anti-L1 y su correspondiente secundario, sobre neuronas previamente nucleofectadas con siRNA-hG4 o con UNCsiRNA como control. Una vez incubadas las células con los anticuerpos, fueron fijadas y marcadas mediante inmunocitoquímica normal para α -tubulina acetilada. En el caso de las neuronas transfectadas con el siRNA-hG4, los agregados de L1 se presentaron de una forma

difusa a lo largo del axón (figura 40A, siRNA-hG4, flechas), mientras que en las neuronas control transfectadas con UNCsiRNA, L1 pareció ser más abundante (figura 40B, grafico superior), presentó una formación de agregados significativamente mayores que los del control (figura 40B, gráfico inferior), y se mostró más distribuida sobre los axones y agrupada en zonas muy restringidas de la membrana (figura 40A, UNCsiRNA, flechas).

Teniendo en cuenta que la interferencia en la biosíntesis de Gal-4 no modificó significativamente los niveles de expresión de L1 (figura 40C, panel superior), los resultados indicaron que la presencia de una mínima cantidad de Gal-4 es necesaria para la correcta unión y agregación de L1 sobre la membrana neuronal, y que esta interacción está mediada por la unión de la galectina a los terminales LacNAc de los N-glicanos de la proteína L1.

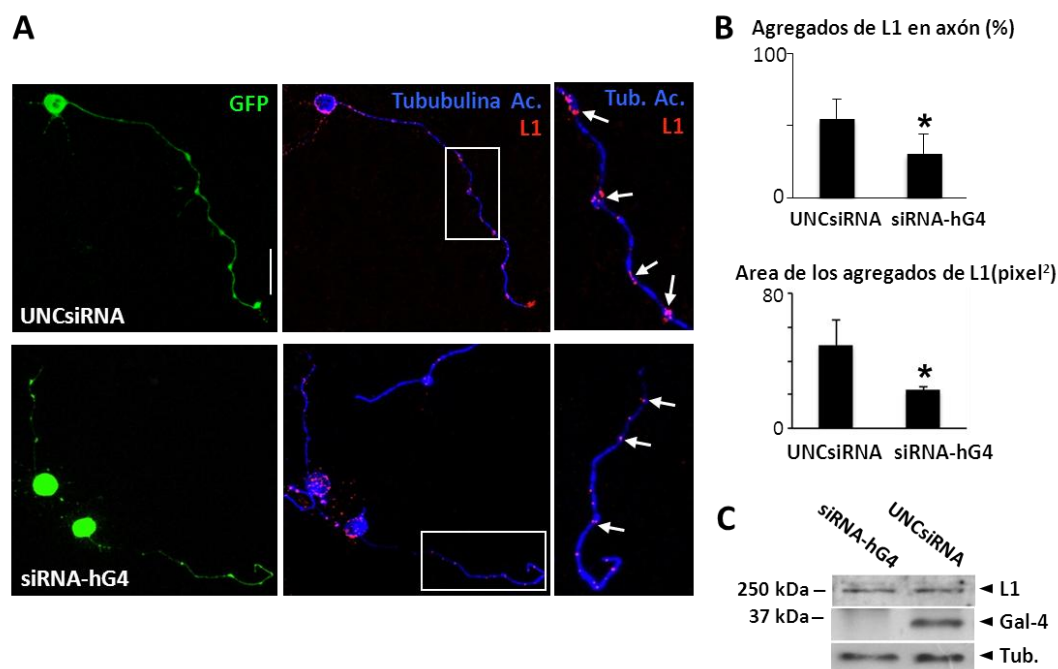


Figura 40. La disminución en la expresión de Gal-4 modifica la distribución de L1 en la membrana axonal. A) Neuronas nucleofectadas con siRNA-hG4 o UNCsiRNA se trataron como en la Figura 39 para comprobar la capacidad de agregación de la proteína L1 (rojo) en la membrana axonal. Una vez fijadas, se marcaron por inmunocitoquímica con anti-acetil- α -tubulina (azul). Tomando el GFP como control de transfección, comprobamos que los agregados de L1 en los axones de los controles UNCsiRNA, paneles de la derecha, flechas) estaban delimitados a ciertas regiones, mientras que las células interferidas presentaron los agregados más dispersos (siRNA-hG4, paneles de la derecha, flechas). **B)** Para el estudio cuantitativo de los agregados de L1, usando el programa Image J, se separó el canal de la proteína, se marcó un umbral intensidad mínima para imponer un límite de tamaño mínimo a los agregados y se cuantificó del porcentaje de agregados repartidos por el axón con respecto al total de agregados en la célula (gráfico superior). También se analizó el tamaño medio de los agregados (gráfico inferior). Valores media \pm d.s., N=3 experimentos (10 campos por experimento), * $p < 0,05$. Barra de escala: 25 μ m. **C)** Tras un extenso lavado, se volvió a incubar el WB presentado en la Figura 22 con anticuerpo anti-L1, y se comprobó que su expresión no varía con la transfección de las células.

14. La inhibición del proceso de N-glicosilación de L1 afecta a la distribución de la proteína, pero no a la distribución segmentada de la galectina-4 sobre la membrana axonal.

Con todos los resultados obtenidos hasta este momento, planteamos la posibilidad de que tanto la disminución de la síntesis de Gal-4 como la perturbación de la N-glicosilación de L1 podrían interferir en la correcta disposición de L1 a nivel de la membrana axonal, impidiendo por tanto su correcto funcionamiento y modificando la localización en el axón de la galectina. Sin embargo, en este segundo supuesto la disposición de la galectina no se vio afectada; de hecho, las neuronas tratadas con el inhibidor de la N-glicosilación DMJ mostraron el típico marcaje segmentado de Gal-4 a lo largo del axón (figura 41A, DMJ, flechas), sin prácticamente diferencias respecto a las neuronas control (figura 41A, Control, flechas).

Por el contrario, el tratamiento con DMJ sí redujo significativamente el número de agregados de L1 en las células tratadas (figura 41C, DMJ), que además presentó una disposición mucho más dispersa a lo largo del axón (figura 41B, DMJ, flechas), en comparación con los controles, que, una vez más, presentaron una abundancia y distribución axonal de L1 en regiones concretas de la membrana (figura 41B, Control, flechas).

Un efecto similar se consiguió al inhibir metabólicamente el proceso de sulfatación con clorato de sodio. Los agregados de L1 parecieron dispersarse a lo largo de todo el axón (figura 41B, NaClO₃, flechas) y reducir significativamente su presencia (figura 41C, NaClO₃).

En este caso, como ya se mostró anteriormente, la distribución normal de Gal-4 si se encuentra afectada (Figura 36, células no permeabilizadas). Añadiendo este dato al hecho de que aún con una disposición normal de Gal-4 en la membrana axonal, la alteración del proceso de N-glicosilación sobre L1 impedía que esta proteína se localizara normalmente en la membrana, pudimos deducir que la unión de Gal-4 a sulfátidos y a los terminales LacNAc de los N-glicanos de la L1 son dos interacciones imprescindibles para la correcta disposición y función de la proteína L1.

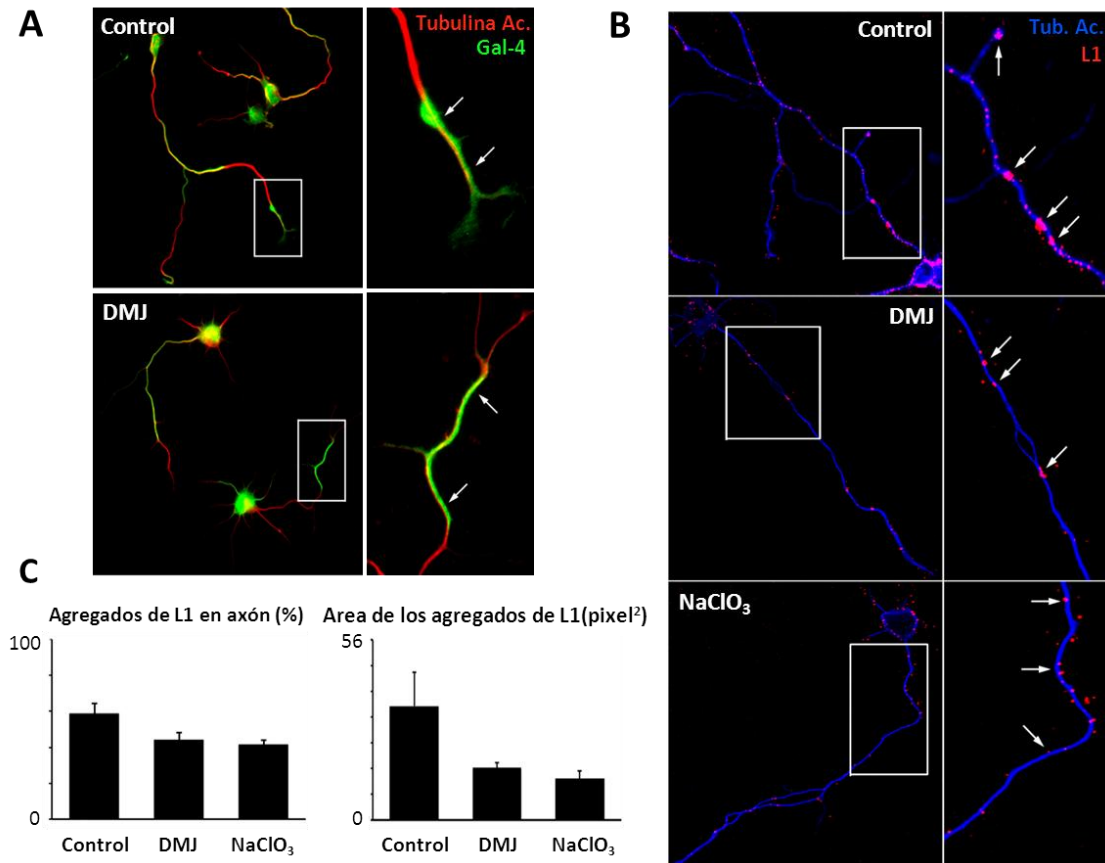


Figura 41. La reducción en el número de terminales LacNAc en los N-glicanos reduce la capacidad de reagrupamiento de L1 sobre la membrana axonal pero no de Gal-4, mientras que la inhibición de la sulfatación afecta a ambos procesos. A) Neuronas hipocámpales con y sin tratamiento con DMJ fueron marcadas con anticuerpos anti-Gal-4 (verde) y anti-acetil- α -tubulina (verde). Las imágenes de la derecha muestran en detalle los segmentos de Gal-4 a lo largo del axón, donde apreciamos que no se vieron afectados por el tratamiento. **B)** Células control y tratadas con DMJ o con NaClO₃ fueron procesadas como en experimentos anteriores para ver los agregados de L1 sobre la membrana axonal. Después fueron fijadas y marcadas con anti-acetil- α -tubulina (azul). Las imágenes de la derecha muestran con detalle cómo los agregados de L1 en las células control aparecieron agrupados en zonas puntuales de la membrana (paneles control, flechas), mientras que en las neuronas tratadas los agregados resultaron menos abundantes y más dispersos a lo largo del axón (paneles DMJ y NaClO₃, flechas). Barras de escala: 25 μ m. **C)** Se cuantificó el porcentaje de agregados que se pueden contar por axón en los anteriores cultivos siguiendo el mismo protocolo descrito en la Figura 27. Valores media \pm d.s., N=3 experimentos (10 campos por experimento), * p < 0,05, ** p < 0.005.

Discusión

Las glicoproteínas de las neuronas juegan un papel fundamental durante procesos importantes como la diferenciación. Para lograrlo, se basan en la formación de interacciones homofílicas, y en el reconocimiento por parte de otras lectinas endógenas de las cadenas de glicanos específicas de cada glicoproteína. Estas interacciones cuentan con una gran versatilidad gracias a que cada ramificación de cada glicano presenta unos epítomos específicos (Rüdiger & Gabius 2009), y este es el origen de la especificidad de las lectinas para desencadenar procesos de señalización muy concretos.

Las modificaciones post-transduccionales de estos efectores, en nuestro caso las galectinas, podrían estar actuando como un interruptor para modular su bioactividad. En el presente trabajo, presentamos una primera evidencia de que existe una modulación de la función extracelular de la Gal-3 mediada por la fosforilación de esta proteína, usando como modelo cultivos de neuronas hipocampales.

Es conocido que los efectos celulares provocados por las galectinas, dependen de cómo éstas sean presentadas a la superficie celular. Trabajos previos han mostrado como una galectina prototipo, como es el caso de la galectina-16 de pollo, es capaz de acelerar el crecimiento de los axones *in vitro* ya sea presentada en solución como en sustrato, mientras que puede provocar efectos totalmente opuestos en neuritogénesis en cualquiera de los dos modos de presentación (Kopitz et al 2004). Por el contrario, la galectina de tipo quimera Gal-3 unida a fibronectina de la superficie de las células tumorales, favorece la interacción y el reagrupamiento de integrinas mediado por su unión a carbohidratos, regulando así la adhesión local de la célula (Goetz et al 2008). En este contexto, nuestros resultados han mostrado que la Gal-3 induce la ramificación o el crecimiento axonal únicamente cuando la proteína es presentada como un sustrato sobre la superficie de crecimiento, o cuando se presenta formando complejos con un componente de la MEC como es el HS (figura 17). Esto sugiere que la exposición de las neuronas a los complejos Gal-3-HS podría parecerse a la situación que la célula va a encontrar *in vivo*, donde la interacción de las diferentes formas de la Gal-3 con los componentes de la MEC, puede estabilizar y/o disponer a la lectina de una forma muy concreta para que participe en las interacciones entre proteínas y carbohidratos o entre varias proteínas (Gabius 2006, Smetana et al 2006, Gabius 2008, Smetana et al 2006). Por otro lado, la rotura proteolítica irreversible de la galectina tiene capacidad de revertir esta actividad de la pGal-3, presentándose como una nueva dimensión de regulación de esta actividad fisiológica regulada por enzimas MMP-2 y MMP-9 de la MEC. De hecho, este último caso ha sido empleado como modelo de regulación de la progresión del cáncer de mama mediado por Gal-3, y de los procesos

de diferenciación terminal de los condrocitos (Ortega et al 2005, Nangia-Makker et al 2007, Lohr et al 2008).

Muchas glicoproteínas son candidatos a presentarse como receptores para galectinas en la superficie celular. Es conocido que la neuropilina-1, receptor de la semaphorina 3A (proteína que interviene en los procesos de orientación de las células nerviosas), regula la ramificación dendrítica (Morita et al 2006). Recientemente se ha identificado una glicofoma específica de neuropilina-1, que es ligando de la Gal-1 (Hsieh et al 2008). Teniendo en cuenta que tanto Gal-1 como Gal-3 comparten afinidades por su unión a determinados tipos de β -galactósidos, incluyendo gangliósidos como el GM1 y N-glicanos (Hirabayashi et al 2002, Ahmad et al 2004b, Andre et al 2005, Dam et al 2005), se postuló que la neuropilina-1 pudiera ser un candidato apto para mediar la inducción de la ramificación originada por la forma fosforilada de la Gal-3. Sin embargo, nuestros resultados no han determinado que exista interacción alguna entre pGal-3 y neuropilina-1 (figura 21A). Resultados similares se obtuvieron para la Integrina- β 1 (figura 21A), cuyos glicanos también pueden interactuar con galectinas, y se ha comprobado que también participa en procesos de ramificación y mantenimiento de dendritas (Poinat et al 2002, Becker et al 2003, Moresco et al 2005, Goetz et al 2008).

En contraste con la Neuropilina-1 y la Integrina- β 1, que son de expresión más tardía, la glicoproteína NCAM-L1 se localiza en los axones desde el principio de la diferenciación de la neurona (van den Pol & Kim 1993). Además, se ha comprobado que la reagrupación de L1 mediante interacciones homofílicas, induce un fenotipo axonal muy ramificado (Dickson et al 2002), que recuerda al fenotipo desencadenado por la unión de la pGal-3 (figura 20). Sin embargo, aunque se sabe que la reactividad de la galectina con la L1 parece ser débil (Probstmeier et al 1995), teniendo en cuenta que la glicosilación está sujeta a una regulación sutil y dinámica que puede influir en la fuerza con la que se producen los contactos moleculares, hemos investigado este tipo de interacción en neuronas. Para ello, se inmunoprecipitaron ambas proteínas con anticuerpo anti-Gal-3, incorporando previamente una molécula de entrecruzamiento reversible capaz de formar puentes disulfuro entre las proteínas que interaccionan. Con este sistema, hemos detectado co-inmunoprecipitación entre ambas proteínas (figura 21A), y además, que la interacción de pGal-3 con L1 es mayor que la interacción de Gal-3 con esta misma proteína. Este último dato fue corroborado haciendo una inmunoprecipitación inversa con anticuerpo anti-NCAM-L1 (figura 21B).

El crecimiento axonal mediado por las interacciones homofílicas de L1, depende de la asociación de esta proteína con las balsas lipídicas de membrana en los conos de crecimiento. Esto se comprobó marcando el gangliósido de membrana GM1 mediante un ensayo de micro-CALI, que consiste en un láser de inactivación acoplado a un cromóforo. Al inactivar GM1, se paraliza el proceso de elongación axonal haciendo que los conos de crecimiento se sometan a un cambio drástico de morfología, pasando de formar lamelipodios a formar filopodios. Lo que ocurre en este sistema, es que la perturbación del cono de crecimiento induce una modificación en la composición lipídica y proteica de la membrana, impidiéndose la correcta estabilización de los dominios de presentación de L1 y, por tanto, la correcta regulación de señales de crecimiento mediadas por dicha proteína. Este hecho, favorece por tanto la formación de filopodios en el cono de crecimiento (Nakai & Kamiguchi 2002).

Un dato a tener en cuenta dentro de este estudio, es que la inmunoreactividad de Thy-1, una proteína anclada a GPI y asociada a rafts de membrana (Ledesma et al 1998), no se ve afectada durante el marcaje de GM1 por micro-CALI. De acuerdo a este mecanismo, nuestros resultados indican que la interacción de la pGal-3-HS con la proteína L1, pudiera estar relacionada con las balsas lipídicas de membrana ricas en Thy-1 (figura 22). Siguiendo esta hipótesis, comprobamos la expresión de la forma dominante negativa de L1, cuya señalización se encuentra interrumpida, previenen los efectos de la pGal-3-HS sobre la neurona (figura 28). Además, se obtiene un resultado similar con la perturbación de la formación de las balsas lipídicas de membrana por extracción parcial de colesterol con M β C (figura 28).

El enriquecimiento de L1 en estas zonas restringidas de la membrana, crea una plataforma estable donde las proteínas ERM son reclutadas y ancladas por el dominio intracelular de la glicoproteína (figuras 24 y 27). ERM a su vez ancla los filamentos de actina bajo esas zonas de la membrana, permitiendo al citoesqueleto de actina movilizarse para dar lugar a un nuevo punto de ramificación (modelo explicativo propuesto en la figura 42).

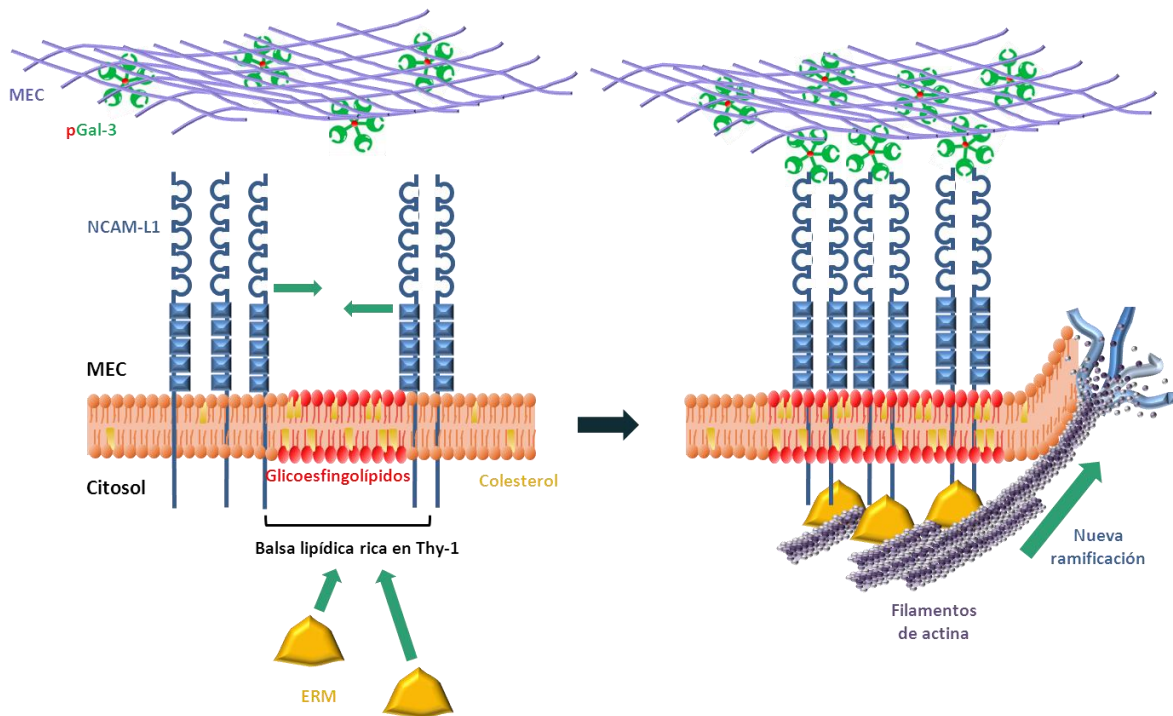


Figura 42. Modelo propuesto para la inducción de ramas locales promovido por pGal-3. Los componentes de la MEC presentan la pGal-3 a la membrana del axón en una disposición espacial óptima para favorecer su interacción con la L1. La región N-terminal fosforilada de la Gal-3 es esencial, lo que sugiere que esta zona es necesaria para el reconocimiento de carbohidratos por parte de la lectina. En consecuencia, L1 se ve desplazada hacia las balsas lipídicas de membrana ricas en Thy-1. La acumulación local de L1 dará lugar al reclutamiento de las proteínas ERM encargadas de conectar la actina con la membrana, creando una zona del citoesqueleto dinámica, que será punto de inicio de una nueva ramificación.

En vivo, la formación de filopodios de tipo exploratorio y de axones ramificados, son procesos asociados al desarrollo del nervio y, sobre todo, a la actividad neuroregenerativa tras una lesión. Dentro del sistema nervioso, Gal-3 se expresa, entre otros, por la activación de las células de Schwann tras una lesión (Reichert et al 1994) y por las células olfativas (Storan et al 2004). Teniendo en cuenta que tanto el SNP como el sistema olfativo dentro del SNC muestran cierta capacidad de regeneración nerviosa, es tentador especular que la inducción de la expresión de Gal-3 asociada a axones de neuronas pueda correlacionarse con esta actividad regenerativa del sistema nervioso. Como sustento de esta idea, encontramos que ni los oligodendrocitos que mielinizan las neuronas, ni los astrocitos activados tras la lesión expresan Gal-3 (Kuklinski et al 2000), lo cual explica la falta de regeneración del SNC. La fosforilación de Gal-3 podría estar actuando como una señal de activación durante el proceso de regeneración nerviosa, mediante el favorecimiento de la ramificación axonal.

En conclusión, comprobamos como la combinación estratégica de las modificaciones post-transduccionales de determinadas glicoproteínas, junto con la forma de presentación de la lectina por parte de otras moléculas de la MEC, podría explicar el nivel de especificidad de Gal-3 en la regulación axonal. En particular, la presentación de la pGal-3 formando complejos con HS, induce el reclutamiento de L1 y activa la maquinaria de regulación del citoesqueleto basada en la interacción de ERM con zonas discretas de la membrana plasmática. Este mecanismo se llevaría a cabo en aquellos puntos donde sea necesaria la formación de una nueva rama.

La distribución espacial de pGal-3 en la matriz extracelular, al menos en parte, puede determinar el grado de ramificación axonal y la posición en la que las ramas se distribuyen. Este mecanismo, alberga una parte de los procesos involucrados en el desarrollo del sistema nervioso, y en procesos con una mayor relevancia clínica como es la regeneración de axones dañados.

La Gal-4 es una galectina perteneciente a la familia de repetición tipo tándem, caracterizadas por presentar 2 dominios CRD unidos entre si por un dominio de unión (*linker*). Estos dominios, aunque estructuralmente similares, varían en sus afinidades de unión a carbohidratos, hecho que permite a la lectina interconectar diferentes tipos de moléculas simultáneamente.

La unión de galectinas a sulfátidos y a N-glicanos de distintas glicoproteínas en las células endoteliales, se ha presentado como un proceso esencial para el mantenimiento de la polaridad celular. Esta polaridad, entre otras funciones, permite regular el tráfico de proteínas hacia el lado apical de este tipo de células. De hecho, se ha comprobado que cuando estas células carecen de la Gal-4, presentan acumulaciones intracelulares de proteínas de la membrana, así como pérdidas parciales de la localización apical de las mismas (Delacour et al 2005, Stechly et al 2009).

La polarización es uno de los principales procesos que acompañan a la maduración neuronal, y es un proceso que requiere de un transporte polarizado de material biológico, tanto para determinar la futura localización del axón de entre todas las neuritas primarias

indiferenciadas, como para mantener esta polaridad a lo largo del desarrollo y formar así una neurona funcional.

Hasta hace poco, la detección de la expresión de Gal-4 en el sistema nervioso central se limitaba al sistema olfativo (Storan et al 2004), y en neuronas corticales y de los ganglios de la raíz dorsal (Wei et al 2007, Stancic et al 2012). Dada la importante presencia de sulfátidos en el sistema nervioso, resultó tentador postular que la Gal-4 podría tener una funcionalidad similar más allá de estos sistemas celulares.

En este estudio, mostramos que las neuronas de hipocampo y corticales expresan Gal-4 siguiendo dos patrones característicos y diferenciados (figuras 29 y 30): una expresión intracelular en común con otras galectinas que se distribuye homogéneamente a lo largo de toda la célula, detectable sólo bajo condiciones de permeabilización de la membrana, y un segundo patrón de presentación no observado previamente, en el que la Gal-4 se presenta como segmentos distribuidos a lo largo de la superficie axonal que sólo pueden ser observados bajo condiciones de no permeabilización de la membrana (figura 32). Este peculiar marcaje en la superficie de la membrana, en principio se puede sospechar que pueda deberse a la presencia de Gal-4 en el medio, originada a partir de fuentes exógenas tales como los astrocitos residuales típicamente presentes en los cultivos neuronales, ya que estos se sabe pueden sintetizar y segregar otros tipos de galectinas (como la Gal-1 y la Gal-3). Pero de acuerdo con anteriores resultados que mostraban que la expresión glial de Gal-4 es insignificante (Stancic et al 2012), se encontró que los astrocitos en cultivo no producen cantidades detectables de Gal-4, confirmando inequívocamente el origen neuronal de la galectina (figura 29).

Más allá de la mera expresión en las neuronas, el curso temporal de la expresión de Gal-4 indica que la galectina se ordena en la membrana axonal ya desde las primeras fases del desarrollo neuronal (figura 32). Este hecho apunta a que la galectina pudiera tener consecuencias funcionales para la formación y el crecimiento axonal. Esta hipótesis fue corroborada por el hecho de que las células transfectadas con un RNA de interferencia específico para Gal-4 (siRNA-hG4), con una expresión de dicha lectina drásticamente reducida, presentaron un retraso en su crecimiento normal, siendo además posible el rescate del fenotipo original mediante la adición de la forma recombinante de la Gal-4 a los cultivos interferidos (figura 34).

Hubo que tener en cuenta que esta reversión al fenotipo original por adición de Gal-4 al medio de cultivo, podría deberse no solo de la localización de la galectina endógena en la membrana axonal, sino que también podría ocurrir que la galectina se estuviera adhiriendo a sus ligandos de membrana de forma exógena. Para poner a punto las condiciones de estos estudios de reversión, se plantearon una serie de experimentos preliminares. En primer lugar, para estar seguros de que la Gal-4 exógena estaba siendo incorporada por las neuronas en cultivo, se hizo una breve incubación con la Gal-4 recombinante conjugada con el fluoróforo FITC, y posteriormente las células fueron fijadas a distintos tiempos. De esta forma comprobamos que la Gal-4-FITC estaba siendo endocitada y localizada, inicialmente, en la zona perinuclear coincidiendo con los endosomas de reciclaje (positivos para la proteína Rab11), y posteriormente (a partir de las 4 horas desde la endocitosis), comenzó a aparecer señal del FITC en forma de tractos discretos sobre la membrana axonal, co-localizando además con la proteína L1 (figura 35A). Estos resultados muestran que, al menos en parte, la Gal-4 estaba siendo endocitada y reconducida a la membrana axonal junto con la L1 (figura 35A, flechas). En una segunda tanda de experimentos, se incubaron las neuronas en suspensión, antes de su siembra en placas de cultivo, con la Gal-4-FITC. Transcurridas 48 hiv, comenzó a apreciarse de nuevo el marcaje de FITC en tractos, indicando que la lectina ha sido correctamente endocitada por los cuerpos celulares, y posteriormente transportada a lo largo del axón hasta alcanzar su situación en la membrana axonal (figura 35B, flechas).

A la vista de estos resultados no podemos asegurar en los experimentos de reversión, en los que la Gal-4 recombinante se presenta en el cultivo de forma continuada durante 48 horas, que parte de esta proteína no esté interaccionando directamente con sus ligandos de membrana de forma exógena o esté entrando en el axón por un mecanismo de reciclaje local. Sin embargo, en vista de los resultados obtenidos, sí que podemos afirmar que parte de la galectina endocitada está viajando a lo largo del axón hasta situarse en tractos localizados sobre la membrana axonal.

Es bien sabido que el transporte vesicular depende de la correcta organización de los microtúbulos del citoesqueleto, y es necesario para que una gran cantidad de moléculas lleguen a su destino y permitan el correcto desarrollo y funcionamiento del axón (Witte & Bradke 2008, Witte et al 2008). Esto llevó a investigar si los microtúbulos podrían estar involucrados en la disposición de Gal-4 y, en efecto, el posicionamiento de Gal-4 requiere de una estructura intacta del citoesqueleto de tubulina, tal y como se comprueba por la ausencia de marcaje de Gal-4 en

la membrana axonal en células tratadas con nocodazol, un agente depolimerizante de microtúbulos (figura 38). En contraste, la perturbación de la actina filamentosa con lantrunculina, no tiene efectos detectables sobre la presencia axonal de Gal-4, lo que sugiere que el citoesqueleto de actina no está esencialmente involucrado en la localización de Gal-4 (figura 38). Era por tanto factible pensar, que la Gal-4 pudiera estar siendo transportada a lo largo de los microtúbulos axonales hacia sus sitios de unión en la membrana del axón, probablemente asociada a vesículas de transporte (figura 35). Este hecho concuerda con los antecedentes en los que se demostró que en células HT-29 (línea celular de adenocarcinoma de colon humano, capaces de expresar características de diferenciación propias de células intestinales maduras), Gal-4 es capaz de asociarse a vesículas de transporte con una gran afinidad de unión a sulfátidos insertados en balsas lipídicas de membrana por medio de una larga cadena lipófila de ceramida. Es importante mencionar que dichas balsas lipídicas llegan a alcanzar una particular estabilidad debido a la actividad de Gal-4 como agente de interconexión molecular (Braccia et al 2003). La combinación de la capacidad de Gal-4 de interconectar carbohidratos, unida a su capacidad para seleccionar la carga, como ya se comprobó en el estudio de la clasificación de glicoproteínas apicales en varias células epiteliales intestinales (Delacour et al 2005, Morelle et al 2009, Stechly et al 2009), sugieren que la galectina pudiera estar participando en la clasificación de la selección de la carga y en su anclaje a la región de balsas lipídicas de la membrana vesicular. En concordancia con nuestra hipótesis de que un mecanismo similar pudiera estar operando en las neuronas, comprobamos que la inhibición metabólica de la sulfatación con NaClO_3 , un inhibidor de la formación del donante de grupos sulfato PAPS (Baeuerle & Huttner 1986, Garcia et al 2007), deslocaliza la Gal-4 de la membrana axonal, sin influir aparentemente en la producción de la galectina (figura 36). Teniendo en cuenta que el tratamiento con el NaClO_3 reduce la sulfatación tanto en proteínas como en lípidos, no podemos excluir la idea de que su efecto sobre la Gal-4 neuronal pudiera estar viéndose originado por los defectos en la sulfatación de proteínas. Sin embargo, Gal-4 muestra una baja afinidad por proteínas sulfatadas tales como heparán sulfato o condroitín sulfato, mientras que muestra una alta afinidad por la unión a sulfátidos.

Por el contrario, la implicación de la Gal-4 en la unión de otros lípidos sulfatados típicos de las balsas lipídicas de membrana, como por ejemplo el colesterol-3-sulfato (Ideo et al 2007), fue descartada mediante la extracción parcial de colesterol de la membrana con $\text{M}\beta\text{C}$ (Abad-Rodríguez et al 2004, Díez-Revuelta et al 2010), que secuestra el colesterol-3-sulfato en la misma proporción que el colesterol no sulfatado (Visconti et al 1999). Este tratamiento no afectó a la distribución axonal de la Gal-4 (figura 37), dando a entender, que la unión a la galactosa 3'-

sulfatada de los sulfátidos es importante para la localización axonal de la Gal-4 pero no para su biosíntesis.

Si tenemos en cuenta la implicación de la Gal-4 en el transporte apical basado en balsas lipídicas de glicoproteínas en células epiteliales polarizadas, junto con la particular distribución de la lectina a lo largo de la membrana axonal, cabe pensar que un mecanismo similar al que subyace en las células epiteliales podría estar ocurriendo en las neuronas, es decir, podría haber una modulación por parte de la Gal-4 para localizar en zonas particulares diversas moléculas relacionadas con el desarrollo axonal. De ser así, esto explicaría además la influencia de la Gal-4 en la elongación axonal.

Dentro de este marco, L1 es una proteína que podría cumplir con muchos de los requisitos necesarios para comprobar esta hipótesis. Se sabe que L1 se sitúa en la membrana axonal, y determinadas modificaciones en su distribución, repercuten sobre la elongación axonal (Kleene et al 2001). Además, L1 es una proteína que presenta N-glicanos que como nosotros mismos comprobado anteriormente, son ligandos de unión para la Gal-3, y además sabemos que esta galectina comparte afinidad con la Gal-4 por la unión a terminales LacNAc, también presentes en N-glicanos (Diez-Revuelta et al 2010, Krzeminski et al 2011, Wu et al 2004). Por último, se ha comprobado que el bloqueo de la formación de N-glicanos que incluyan una región de tipo LacNAc inducida por el tratamiento con DMJ, tiene como resultado la deslocalización de la L1 de la membrana axonal (McFarlane et al 2000), efecto que recuerda al descrito anteriormente para el caso de las glicoproteínas apicales de células epiteliales (Delacour et al 2005, Morelle et al 2009, Stechly et al 2009).

Como se ha mostrado en el presente trabajo mediante co-localización de marcaje de anticuerpos sobre la superficie de neuronas vivas, la Gal-4 interacciona con L1 (figura 40A), y además ambos marcajes presentan la característica distribución en tractos discretos (figura 40B). Esta interacción fue comprobada de la misma forma en que comprobamos la interacción de la L1 con la Gal-3, mediante co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en presencia de una molécula de entrecruzamiento reversible (figura 40C). El significado funcional de esta interacción entre Gal-4 y L1, quedó patente al comprobar que la interferencia de neuronas para la producción de la Gal-4 endógena, se traducía en una reducción en el número de agregados de L1, que además, comenzaron a aparecer dispersos por todo el axón (figura 41), lo cual indica que la galectina es necesaria para la correcta organización espacial de la L1 en la membrana. Este

dato además explica que las neuronas interferidas para la Gal-4 presenten un retardo en el crecimiento axonal (figura 34C).

Para comprobar que la unión de la Gal-4 a L1 es dependiente del grado de N-glicosilación de esta última, se realizó de nuevo una inmunoprecipitación de las proteínas tras tratar las células con DMJ. La disminución en el grado de co-inmunoprecipitación entre ambas proteínas dejó patente que la disponibilidad de los N-glicanos de L1 es imprescindible para la correcta interacción de la proteína con la Gal-4 (figura 42B). Puesto que la interacción entre la Gal-4 y la L1 no parece ser dependiente de sulfátidos, los experimentos de inmunoprecipitación se llevaron a cabo en células PC12, una línea celular que no expresa estos esfingolípidos (Townson et al 2007). En este caso, tanto el tratamiento de las células con DMJ como con NaClO₃, tuvieron como consecuencia una dispersión de la señal de la L1 a lo largo de la membrana axonal (figura 42B), mientras que únicamente en el caso del tratamiento con DMJ, pareció no afectar a la distribución en trectos discontinuos de la Gal-4 (figura 42A).

Resumimos por tanto que al igual que ocurría en el caso del transporte apical de glicoproteínas en las células HT-29 (Morelle et al 2009), la distribución espacial de los terminales LacNAc de los N-glicanos de determinadas glicoproteínas como la L1, los cuales interaccionan con la Gal-4, forman una plataforma bioquímica para la distribución de Gal-4 en la membrana axonal. Sin embargo, estas interacciones no son imprescindibles para el transporte de la galectina, hecho que sí depende de la biosíntesis de sulfátidos de membrana. Los estudios de inhibición llevados a cabo, muestran la relevancia de la doble especificidad de esta galectina por determinados glicolípidos y determinadas glicoproteínas.

La localización de Gal-4 en dominios acotados de la membrana del axón mediante su unión a las balsas lipídicas sulfatadas de las vesículas de transporte asociadas a microtúbulos, supone un instrumento para la polarización de la glicoproteína axonal L1, y seguramente, para otras moléculas de este tipo. Esta ruta de transporte se basa en el anclaje de la carga de las vesículas por medio de uniones específicas de la Gal-4 a los N-glicanos de las glicoproteínas transportadas (modelo explicativo propuesto en la figura 43), coincidiendo con lo que ocurría en el transporte de glicoproteínas apicales asociadas a balsas lipídicas en células epiteliales polarizadas. Es por tanto razonable sugerir que el efecto de la Gal-4 sobre el crecimiento axonal se lleve a cabo mediante la modulación y organización de la distribución de glicoproteínas sobre la membrana axonal.

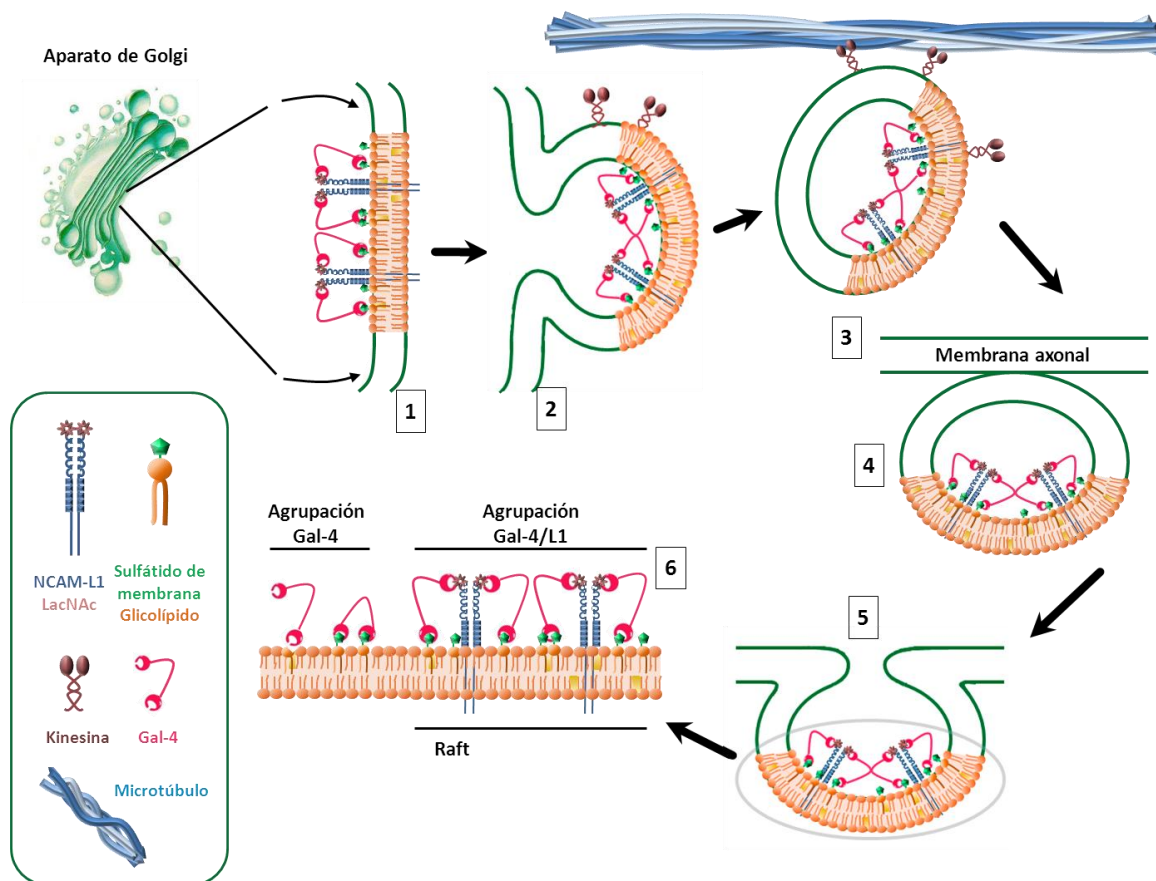



Figura 43. Modelo propuesto para el transporte axonal y reagrupamiento de L1. 1) Gal-4, gracias a sus dos dominios CRD, conecta los terminales LacNAc de los N-glicanos de L1, con los sulfátidos presentes en las balsas lipídicas de membrana de las vesículas de transporte que provienen del aparato de Golgi. 2) La membrana se invagina manteniendo esas agrupaciones de Gal-4/L1 ancladas a las balsas lipídicas, e incorpora moléculas de transporte (como kinesinas). 3) Estas vesículas, viajan a lo largo del axón asociadas a los microtúbulos. 4) Una vez alcanzado su destino, se fusionan con la membrana axonal, 5) donde se incorporan estos agregados de Gal-4/L1 asociados a las balsas de membrana, manteniendo la estructura con la que partieron.

Además de la función antes mencionada de Gal-4 en la clasificación de glicoproteínas a nivel axonal, se pueden prever otras funciones para estos acúmulos de Gal-4 sobre la superficie axonal. Así por ejemplo, es tentador especular con la posibilidad de que Gal-4, presente en distintos segmentos de las vías axonales, pudiera estar participando en la regulación de la formación de la mielina axonal por parte de los oligodendrocitos (Wei et al 2007, Stancic et al 2012), orientando el establecimiento y/o mantenimiento del contacto glial, con los sulfátidos como principales componentes de la mielina (Norton & Poduslo 1973). Podría estar acotando la agrupación de los canales de sodio en los paranodos de los axones mielinizados (Ishibashi et al 2002), y mediando la formación y el mantenimiento de zonas de interacción de mielina con el axón. Estas y otras cuestiones conexas de posibles funciones axonales de Gal-4 son algunos de los objetivos de nuestra actual investigación.



Por otro lado, en un contexto más amplio, teniendo en cuenta la funcionalidad de L1 en células tumorales, que se ve implicada en la regulación de la proteólisis intermembranal (Kiefel et al 2011), junto con el hecho de que Gal-4 se ha encontrado asociado a diversos tipos tumorales (Kiefel et al 2011, Kaltner & Gabius 2012), nuestro trabajo sobre la presentación de L1 regulada por Gal-4 en la membrana plasmática puede servir de inspiración para abordar este tipo de estudios.

Conclusiones

De acuerdo con los objetivos propuestos, los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Las distintas formas de Gal-3 presentadas como soluto en cultivos de neuronas hipocampales de rata, no ejercen ningún efecto significativo sobre el crecimiento o la guía axonal.
2. La Gal-3 fosforilada presentada bien como sustrato, bien formando complejos con componentes de la matriz extracelular, induce la ramificación axonal de una forma independiente de la unión a carbohidrato.
3. La Gal-3 fosforilada interacciona con L1, lo que induce el reagrupamiento de ésta en las balsas lipídicas de la membrana axonal y, mediante la interacción con su región citoplasmática, se reclutan en las mismas zonas las proteínas del complejo ERM. Éstas últimas conectan la membrana con los filamentos de actina permitiendo un reordenamiento local del citoesqueleto. Esta vía L1/ERM/actina es punto de partida para la creación de un nuevo punto de ramificación.
4. Gal-4 se expresa en neuronas hipocampales y corticales de rata, y en ambos casos, presenta un marcaje de membrana en segmentos discontinuos distribuidos sin un patrón aparente.
5. La administración exógena de Gal-4 no produce ningún efecto significativo en cultivos de neuronas del sistema nervioso central.
6. La disminución en la expresión de Gal-4 en neuronas hipocampales de rata, da lugar a un retardo en el crecimiento axonal. La administración exógena de la galectina rescata el fenotipo original.
7. La presencia de Gal-4 en la membrana axonal depende de su unión a sulfátidos de membrana y depende de la integridad de los microtúbulos. Además, la unión de Gal-4 a los terminales LacNAc de los N-glicanos de la proteína L1, propicia que dicha proteína sea dispuesta en la membrana axonal, permitiendo su correcto posicionamiento y funcionamiento, regulando, por tanto, el crecimiento del axón.

Bibliografía

- Abad-Rodriguez J, Ledesma MD, Craessaerts K, Perga S, Medina M, et al. 2004. Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *The Journal of cell biology* 167: 953-60
- Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, et al. 2004a. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *The Journal of biological chemistry* 279: 10841-7
- Ahmad N, Gabius HJ, Sabesan S, Oscarson S, Brewer CF. 2004b. Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology* 14: 817-25
- Andre S, Jarikote DV, Yan D, Vincenz L, Wang GN, et al. 2012. Synthesis of bivalent lactosides and their activity as sensors for differences between lectins in inter- and intrafamily comparisons. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 22: 313-8
- Andre S, Kaltner H, Lensch M, Russwurm R, Siebert HC, et al. 2005. Determination of structural and functional overlap/divergence of five proto-type galectins by analysis of the growth-regulatory interaction with ganglioside GM1 in silico and *in vitro* on human neuroblastoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 114: 46-57
- Andre S, Maljaars CE, Halkes KM, Gabius HJ, Kamerling JP. 2007. Discovery of galectin ligands in fully randomized combinatorial one-bead-one-compound (glyco)peptide libraries. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17: 793-8
- Andre S, Pei Z, Siebert HC, Ramstrom O, Gabius HJ. 2006. Glycosyldisulfides from dynamic combinatorial libraries as O-glycoside mimetics for plant and endogenous lectins: their reactivities in solid-phase and cell assays and conformational analysis by molecular dynamics simulations. *Bioorg Med Chem* 14: 6314-26
- Andre S, Sansone F, Kaltner H, Casnati A, Kopitz J, et al. 2008. Calix[n]arene-based glycoclusters: bioactivity of thiourea-linked galactose/lactose moieties as inhibitors of binding of medically relevant lectins to a glycoprotein and cell-surface glycoconjugates and selectivity among human adhesion/growth-regulatory galectins. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 9: 1649-61
- Baeuerle PA, Huttner WB. 1986. Chlorate--a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. *Biochemical and biophysical research communications* 141: 870-7
- Baier H, Klostermann S. 1994. Axon guidance and growth cone collapse *in vitro*. *Neuroprotocols*. 4(2): 96-105
- Barnes AP, Polleux F. 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annual review of neuroscience* 32: 347-81
- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, et al. 1994a. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76: 597-8
- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. 1994b. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of biological chemistry* 269: 20807-10

- Barros CS, Franco SJ, Muller U. 2011. Extracellular matrix: functions in the nervous system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3: a005108
- Becker T, McLane MA, Becker CG. 2003. Integrin antagonists affect growth and pathfinding of ventral motor nerves in the trunk of embryonic zebrafish. *Molecular and cellular neurosciences* 23: 54-68
- Bendas G, Borsig L. 2012. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *International journal of cell biology* 2012: 676731
- Bennett WF, Tieleman DP. 2013. Computer simulations of lipid membrane domains. *Biochimica et biophysica acta*
- Bottazzi B, Garlanda C, Salvaroli G, Jeannin P, Manfredi A, Mantovani A. 2006. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Current opinion in immunology* 18: 10-5
- Braccia A, Villani M, Immerdal L, Niels-Christiansen LL, Nystrom BT, et al. 2003. Microvillar membrane microdomains exist at physiological temperature. Role of galectin-4 as lipid raft stabilizer revealed by "superrafts". *The Journal of biological chemistry* 278: 15679-84
- Brewer CF. 2002. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochimica et biophysica acta* 1572: 255-62
- Brewer CF. 2004. Thermodynamic binding studies of galectin-1, -3 and -7. *Glycoconjugate journal* 19: 459-65
- Brewer CF, Miceli MC, Baum LG. 2002. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Current opinion in structural biology* 12: 616-23
- Buttner B, Kannicht C, Reutter W, Horstkorte R. 2003. The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. *Biochemical and biophysical research communications* 310: 967-71
- 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
- Comte I, Kim Y, Young CC, van der Harg JM, Hockberger P, et al. 2011. Galectin-3 maintains cell motility from the subventricular zone to the olfactory bulb. *Journal of cell science* 124: 2438-47
- Conway G. 2006. STAT3-dependent pathfinding and control of axonal branching and target selection. *Developmental biology* 296: 119-36
- Cooper DN. 2002. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et biophysica acta* 1572: 209-31
- Cooper DN, Barondes SH. 1999. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 9: 979-84
- Couchman JR, Pataki CA. 2012. An introduction to proteoglycans and their localization. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 60: 885-97

- Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, Kimura H, Arawaka S, et al. 2005. Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental neurology* 194: 203-11
- Cheng L, Itoh K, Lemmon V. 2005. L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 395-403
- Cherayil BJ, Chaitovitz S, Wong C, Pillai S. 1990. Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 7324-8
- Dam TK, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Lensch M, Brewer CF. 2005. Galectins bind to the multivalent glycoprotein asialofetuin with enhanced affinities and a gradient of decreasing binding constants. *Biochemistry* 44: 12564-71
- Danguy A, Camby I, Kiss R. 2002. Galectins and cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1572: 285-93
- Danielsen EM, Hansen GH. 2006. Lipid raft organization and function in brush borders of epithelial cells. *Mol Membr Biol* 23: 71-9
- Danielsen EM, van Deurs B. 1997. Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters. *Molecular biology of the cell* 8: 2241-51
- Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R. 2006. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Current biology : CB* 16: 408-14
- Delacour D, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, Leteurtre E, et al. 2005. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *The Journal of cell biology* 169: 491-501
- Delacour D, Greb C, Koch A, Salomonsson E, Leffler H, et al. 2007. Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic* 8: 379-88
- Dickson TC, Mintz CD, Benson DL, Salton SR. 2002. Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *The Journal of cell biology* 157: 1105-12
- Diez-Revuelta N, Velasco S, Andre S, Kaltner H, Kubler D, et al. 2010. Phosphorylation of adhesion- and growth-regulatory human galectin-3 leads to the induction of axonal branching by local membrane L1 and ERM redistribution. *Journal of cell science* 123: 671-81
- Dityatev A, Schachner M. 2006. The extracellular matrix and synapses. *Cell and tissue research* 326: 647-54
- Dolapchieva S, Eggers R, Kuhnel W. 2002. Expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) in the peripheral nerve fibers demonstrated by postembedding immunogold method on ultrathin sections. A preliminary study. *Ann Anat* 184: 137-40

- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8: 1454-68
- Dzhashiashvili Y, Zhang Y, Galinska J, Lam I, Grumet M, Salzer JL. 2007. Nodes of Ranvier and axon initial segments are ankyrin G-dependent domains that assemble by distinct mechanisms. *The Journal of cell biology* 177: 857-70
- Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. 2007. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64: 1679-700
- Eva R, Dassie E, Caswell PT, Dick G, ffrench-Constant C, et al. 2010. Rab11 and its effector Rab coupling protein contribute to the trafficking of beta 1 integrins during axon growth in adult dorsal root ganglion neurons and PC12 cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 11654-69
- Fransen E, Van Camp G, Vits L, Willems PJ. 1997. L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Hum Mol Genet* 6: 1625-32
- Gabius HJ. 1997. Animal lectins. *European journal of biochemistry / FEBS* 243: 543-76
- Gabius HJ. 2006. Cell surface glycans: the why and how of their functionality as biochemical signals in lectin-mediated information transfer. *Critical reviews in immunology* 26: 43-79
- Gabius HJ. 2008. Glycans: bioactive signals decoded by lectins. *Biochemical Society transactions* 36: 1491-6
- Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Siebert HC. 2002. The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et biophysica acta* 1572: 165-77
- Gabius HJ, Siebert HC, Andre S, Jimenez-Barbero J, Rudiger H. 2004. Chemical biology of the sugar code. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 5: 740-64
- Garcia J, Callewaert N, Borsig L. 2007. P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells. *Glycobiology* 17: 185-96
- Gaudet AD, Steeves JD, Tetzlaff W, Ramer MS. 2005. Expression and functions of galectin-1 in sensory and motoneurons. *Current drug targets* 6: 419-25
- Gilbert SF. 2005. *Biología del desarrollo*. pp. 419-496. Buenos Aires-Argentina.
- Gitt MA, Colnot C, Poirier F, Nani KJ, Barondes SH, Leffler H. 1998. Galectin-4 and galectin-6 are two closely related lectins expressed in mouse gastrointestinal tract. *The Journal of biological chemistry* 273: 2954-60
- Goetz JG, Joshi B, Lajoie P, Strugnelli SS, Scudamore T, et al. 2008. Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *The Journal of cell biology* 180: 1261-75
- Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Mira E, Jimenez-Baranda S, Barber DF, et al. 2004. Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *The Journal of cell biology* 164: 759-68

- Goslin K, Banker G. 1989. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of cell biology* 108: 1507-16
- Haas MA, Vickers JC, Dickson TC. 2004. Binding partners L1 cell adhesion molecule and the ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins are involved in development and the regenerative response to injury of hippocampal and cortical neurons. *The European journal of neuroscience* 20: 1436-44
- Hansen GH, Immerdal L, Thorsen E, Niels-Christiansen LL, Nystrom BT, et al. 2001. Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. *The Journal of biological chemistry* 276: 32338-44
- Harder T, Scheiffelle 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
- Hayashi K, Yonemura S, Matsui T, Tsukita S. 1999. Immunofluorescence detection of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins with their carboxyl-terminal threonine phosphorylated in cultured cells and tissues. *Journal of cell science* 112 (Pt 8): 1149-58
- Hebbar S, Lee E, Manna M, Steinert S, Kumar GS, et al. 2008. A fluorescent sphingolipid binding domain peptide probe interacts with sphingolipids and cholesterol-dependent raft domains. *J Lipid Res* 49: 1077-89
- Hernandez JD, Baum LG. 2002. Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology* 12: 127R-36R
- Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, Huflejt ME, Poulter L, et al. 1993. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *The Journal of biological chemistry* 268: 26704-11
- Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, et al. 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et biophysica acta* 1572: 232-54
- Hoogenraad CC, Popa I, Futai K, Martinez-Sanchez E, Wulf PS, et al. 2010. Neuron specific Rab4 effector GRASP-1 coordinates membrane specialization and maturation of recycling endosomes. *PLoS Biol* 8: e1000283
- Horton AC, Ehlers MD. 2003. Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40: 277-95
- Hortsch M, Nagaraj K, Godenschwege TA. 2009. The interaction between L1-type proteins and ankyrins--a master switch for L1-type CAM function. *Cellular & molecular biology letters* 14: 57-69
- Hoschouer EL, Yin FQ, Jakeman LB. 2009. L1 cell adhesion molecule is essential for the maintenance of hyperalgesia after spinal cord injury. *Experimental neurology* 216: 22-34
- Houzelstein D, Goncalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, et al. 2004. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Molecular biology and evolution* 21: 1177-87

- Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, Hsu CL, et al. 2008. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* 27: 3746-53
- Hsu DK, Chernyavsky AI, Chen HY, Yu L, Grando SA, Liu FT. 2009. Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 129: 573-83
- Huflejt ME, Leffler H. 2004. Galectin-4 in normal tissues and cancer. *Glycoconjugate journal* 20: 247-55
- Huflejt ME, Turck CW, Lindstedt R, Barondes SH, Leffler H. 1993. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 *in vivo* and by casein kinase I. *The Journal of biological chemistry* 268: 26712-8
- Hughes RC. 1999. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1473: 172-85
- Hynes RO. 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends in cell biology* 9: M33-7
- Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-87
- Hynes RO, Naba A. 2012. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4: a004903
- Ideo H, Seko A, Ishizuka I, Yamashita K. 2003. The N-terminal carbohydrate recognition domain of galectin-8 recognizes specific glycosphingolipids with high affinity. *Glycobiology* 13: 713-23
- Ideo H, Seko A, Yamashita K. 2005. Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and carcinoembryonic antigen in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* 280: 4730-7
- Ideo H, Seko A, Yamashita K. 2007. Recognition mechanism of galectin-4 for cholesterol 3-sulfate. *The Journal of biological chemistry* 282: 21081-9
- Ishibashi T, Dupree JL, Ikenaka K, Hirahara Y, Honke K, et al. 2002. A myelin galactolipid, sulfatide, is essential for maintenance of ion channels on myelinated axon but not essential for initial cluster formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 6507-14
- Ishii A, Ikenaka K, Pfeiffer SE. 2007. The N-glycan profile of mouse myelin, a specialized central nervous system membrane. *Journal of neurochemistry* 103 Suppl 1: 25-31
- Itoh K, Cheng L, Kamei Y, Fushiki S, Kamiguchi H, et al. 2004. Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *The Journal of cell biology* 165: 145-54
- Itoh K, Fushiki S, Kamiguchi H, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V. 2005. Disrupted Schwann cell-axon interactions in peripheral nerves of mice with altered L1-integrin interactions. *Molecular and cellular neurosciences* 30: 624-9
- Jensen M, Berthold F. 2007. Targeting the neural cell adhesion molecule in cancer. *Cancer letters* 258: 9-21

- Jossin Y, Cooper JA. 2011. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nature neurosciences* 14(6): 697-703
- Kaech S, Banker G. 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1: 2406-15
- Kalovidouris SA, Gama CI, Lee LW, Hsieh-Wilson LC. 2005. A role for fucose alpha(1-2) galactose carbohydrates in neuronal growth. *J Am Chem Soc* 127: 1340-1
- Kaltner H, Gabius HJ. 2012. A toolbox of lectins for translating the sugar code: the galectin network in phylogenesis and tumors. *Histology and histopathology* 27: 397-416
- Kansas GS. 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88: 3259-87
- Khan TK, Yang B, Thompson NL, Maekawa S, Epand RM, Jacobson K. 2003. Binding of NAP-22, a calmodulin-binding neuronal protein, to raft-like domains in model membranes. *Biochemistry* 42: 4780-6
- Kiefel H, Pfeifer M, Bondong S, Hazin J, Altevogt P. 2011. Linking L1CAM-mediated signaling to NF-kappaB activation. *Trends in molecular medicine* 17: 178-87
- Kleene R, Yang H, Kutsche M, Schachner M. 2001. The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *The Journal of biological chemistry* 276: 21656-63
- Kopitz J, Ballikaya S, Andre S, Gabius HJ. 2012. Ganglioside GM1/galectin-dependent growth regulation in human neuroblastoma cells: special properties of bivalent galectin-4 and significance of linker length for ligand selection. *Neurochemical research* 37: 1267-76
- Kopitz J, Russwurm R, Kaltner H, Andre S, Dotti CG, et al. 2004. Hippocampal neurons and recombinant galectins as tools for systematic carbohydrate structure-function studies in neuronal differentiation. *Brain research. Developmental brain research* 153: 189-96
- Krzeminski M, Singh T, Andre S, Lensch M, Wu AM, et al. 2011. Human galectin-3 (Mac-2 antigen): defining molecular switches of affinity to natural glycoproteins, structural and dynamic aspects of glycan binding by flexible ligand docking and putative regulatory sequences in the proximal promoter region. *Biochimica et biophysica acta* 1810: 150-61
- Krzyslak A, Lipinska A. 2004. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cellular & molecular biology letters* 9: 305-28
- Kubler D, Hung CW, Dam TK, Kopitz J, Andre S, et al. 2008. Phosphorylated human galectin-3: facile large-scale preparation of active lectin and detection of structural changes by CD spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta* 1780: 716-22
- Kuklinski S, Pesheva P, Heimann C, Urschel S, Gloor S, et al. 2000. Expression pattern of galectin-3 in neural tumor cell lines. *Journal of neuroscience research* 60: 45-57
- Kuklinski S, Probstmeier R. 1998. Homophilic binding properties of galectin-3: involvement of the carbohydrate recognition domain. *Journal of neurochemistry* 70: 814-23
- Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, Ebe Y, Takashima S, et al. 2005. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nature methods* 2: 851-6

- Laderach DJ, Compagno D, Toscano MA, Croci DO, Dergan-Dylon S, et al. 2010. Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings. *IUBMB Life* 62: 1-13
- Laine RA. 1997. The information-storing potential of the sugar code In *Glycosciences: Status and perspectives*, ed. HJ Gabius, Gabius S., pp. 1 - 14. London: Chapman & Hall
- Lau TL, Kim C, Ginsberg MH, Ulmer TS. 2009. The structure of the integrin α 5 β 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *The EMBO journal* 28: 1351-61
- 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: 192-8
- Ledesma MD, Simons K, Dotti CG. 1998. Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3966-71
- Leffler H, Barondes SH. 1986. Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian beta-galactosides. *The Journal of biological chemistry* 261: 10119-26
- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. 2004. Introduction to galectins. *Glycoconjugate journal* 19: 433-40
- Leffler H, Masiarz FR, Barondes SH. 1989. Soluble lactose-binding vertebrate lectins: a growing family. *Biochemistry* 28: 9222-9
- Lindstedt R, Apodaca G, Barondes SH, Mostov KE, Leffler H. 1993. Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* 268: 11750-7
- Lingwood D, Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327: 46-50
- Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. 2002. Intracellular functions of galectins. *Biochimica et biophysica acta* 1572: 263-73
- Liu FT, Rabinovich GA. 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews. Cancer* 5: 29-41
- Liu Y, Halloran MC. 2005. Central and peripheral axon branches from one neuron are guided differentially by Semaphorin3D and transient axonal glycoprotein-1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 10556-63
- Lohr M, Kaltner H, Lensch M, Andre S, Sinowatz F, Gabius HJ. 2008. Cell-type-specific expression of murine multifunctional galectin-3 and its association with follicular atresia/luteolysis in contrast to pro-apoptotic galectins-1 and -7. *Histochemistry and cell biology* 130: 567-81
- Long KE, Lemmon V. 2000. Dynamic regulation of cell adhesion molecules during axon outgrowth. *Journal of neurobiology* 44: 230-45

- Lu P, Weaver VM, Werb Z. 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology* 196: 395-406
- Lucero HA, Robbins PW. 2004. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys* 426: 208-24
- Luo BH, Carman CV, Springer TA. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology* 25: 619-47
- Mahoney SA, Wilkinson M, Smith S, Haynes LW. 2000. Stabilization of neurites in cerebellar granule cells by transglutaminase activity: identification of midkine and galectin-3 as substrates. *Neuroscience* 101: 141-55
- Martín-Belmonte F, Millan J. 2001. Estructura y función de las balsas lipídicas ("rafts"), dominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol. *Inmunología*. 20(4): 216-24
- Martin-Santamaria S, Andre S, Buzamet E, Caraballo R, Fernandez-Cureses G, et al. 2011. Symmetric dithiodigalactoside: strategic combination of binding studies and detection of selectivity between a plant toxin and human lectins. *Org Biomol Chem* 9: 5445-55
- Mazurek N, Conklin J, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. 2000. Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *The Journal of biological chemistry* 275: 36311-5
- McCarthy KD, de Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *The Journal of cell biology* 85: 890-902
- McFarlane I, Breen KC, Di Giamberardino L, Moya KL. 2000. Inhibition of N-glycan processing alters axonal transport of synaptic glycoproteins *in vivo*. *Neuroreport* 11: 1543-7
- McGraw J, Gaudet AD, Oschipok LW, Kadoya T, Horie H, et al. 2005. Regulation of neuronal and glial galectin-1 expression by peripheral and central axotomy of rat primary afferent neurons. *Experimental neurology* 195: 103-14
- Mehul B, Bawumia S, Hughes RC. 1995. Cross-linking of galectin 3, a galactose-binding protein of mammalian cells, by tissue-type transglutaminase. *FEBS letters* 360: 160-4
- Mingorance-Le Meur A, O'Connor TP. 2009. Neurite consolidation is an active process requiring constant repression of protrusive activity. *The EMBO journal* 28: 248-60
- Morelle W, Stechly L, Andre S, Van Seuningen I, Porchet N, et al. 2009. Glycosylation pattern of brush border-associated glycoproteins in enterocyte-like cells: involvement of complex-type N-glycans in apical trafficking. *Biological chemistry* 390: 529-44
- Moresco EM, Donaldson S, Williamson A, Koleske AJ. 2005. Integrin-mediated dendrite branch maintenance requires Abelson (Abl) family kinases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 6105-18
- Morita A, Yamashita N, Sasaki Y, Uchida Y, Nakajima O, et al. 2006. Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 2971-80
- Morris S, Ahmad N, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ, et al. 2004. Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7. *Glycobiology* 14: 293-300

- Munro S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115: 377-88
- Nagae M, Yamaguchi Y. 2012. Function and 3D Structure of the N-Glycans on Glycoproteins. *International journal of molecular sciences* 13: 8398-429
- Nakai Y, Kamiguchi H. 2002. Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate-dependent manner. *The Journal of cell biology* 159: 1097-108
- Nangia-Makker P, Raz T, Tait L, Hogan V, Fridman R, Raz A. 2007. Galectin-3 cleavage: a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers. *Cancer research* 67: 11760-8
- Narciso MS, Mietto Bde S, Marques SA, Soares CP, Mermelstein Cdos S, et al. 2009. Sciatic nerve regeneration is accelerated in galectin-3 knockout mice. *Experimental neurology* 217: 7-15
- Nickel W. 2003. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *European journal of biochemistry / FEBS* 270: 2109-19
- Nishi N, Itoh A, Fujiyama A, Yoshida N, Araya S, et al. 2005. Development of highly stable galectins: truncation of the linker peptide confers protease-resistance on tandem-repeat type galectins. *FEBS letters* 579: 2058-64
- Norton WT, Poduslo SE. 1973. Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *Journal of neurochemistry* 21: 759-73
- Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. 2004. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate journal* 19: 527-35
- Oda Y, Herrmann J, Gitt MA, Turck CW, Burlingame AL, et al. 1993. Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain. *The Journal of biological chemistry* 268: 5929-39
- Ortega N, Behonick DJ, Colnot C, Cooper DN, Werb Z. 2005. Galectin-3 is a downstream regulator of matrix metalloproteinase-9 function during endochondral bone formation. *Molecular biology of the cell* 16: 3028-39
- Pasquini LA, Millet V, Hoyos HC, Giannoni JP, Croci DO, et al. 2011. Galectin-3 drives oligodendrocyte differentiation to control myelin integrity and function. *Cell Death Differ* 18: 1746-56
- Pesheva P, Kuklinski S, Schmitz B, Probstmeier R. 1998. Galectin-3 promotes neural cell adhesion and neurite growth. *Journal of neuroscience research* 54: 639-54
- Poinat P, De Arcangelis A, Sookhareea S, Zhu X, Hedgecock EM, et al. 2002. A conserved interaction between beta1 integrin/PAT-3 and Nck-interacting kinase/MIG-15 that mediates commissural axon navigation in *C. elegans*. *Current biology : CB* 12: 622-31
- Porcionatto MA. 2006. The extracellular matrix provides directional cues for neuronal migration during cerebellar development. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 39: 313-20

- Probstmeier R, Montag D, Schachner M. 1995. Galectin-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, binds to neural recognition molecules. *Journal of neurochemistry* 64: 2465-72
- Pucadyil TJ, Chattopadhyay A. 2006. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Prog Lipid Res* 45: 295-333
- Puche AC, Poirier F, Hair M, Bartlett PF, Key B. 1996. Role of galectin-1 in the developing mouse olfactory system. *Developmental biology* 179: 274-87
- Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA. 2002. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochimica et biophysica acta* 1572: 274-84
- Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. 2007. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current opinion in structural biology* 17: 513-20
- Reichert F, Saada A, Rotshenker S. 1994. Peripheral nerve injury induces Schwann cells to express two macrophage phenotypes: phagocytosis and the galactose-specific lectin MAC-2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14: 3231-45
- Rüdiger H, Gabius HJ. 2009. The biochemical basis and coding capacity of the sugar code In *The sugar code: Fundamentals of glycosciences*, ed. HJ Gabius, pp. 3-13. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- Saravanan C, Liu FT, Gipson IK, Panjwani N. 2009. Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on alpha3beta1 integrin. *Journal of cell science* 122: 3684-93
- Scherer SS, Xu T, Crino P, Arroyo EJ, Gutmann DH. 2001. Ezrin, radixin, and moesin are components of Schwann cell microvilli. *Journal of neuroscience research* 65: 150-64
- Schubert V, Dotti CG. 2007. Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. *Journal of cell science* 120: 205-12
- Smetana K, Jr., Dvorankova B, Chovanec M, Boucek J, Klima J, et al. 2006. Nuclear presence of adhesion-/growth-regulatory galectins in normal/malignant cells of squamous epithelial origin. *Histochemistry and cell biology* 125: 171-82
- Song AH, Wang D, Chen G, Li Y, Luo J, et al. 2009. A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell* 136: 1148-60
- Sonnino S, Prinetti A. 2013. Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Current medicinal chemistry* 20: 4-21
- Stancic M, Slijepcevic D, Nomden A, Vos MJ, de Jonge JC, et al. 2012. Galectin-4, a novel neuronal regulator of myelination. *Glia* 60: 919-35
- Stancic M, van Horssen J, Thijssen VL, Gabius HJ, van der Valk P, et al. 2011. Increased expression of distinct galectins in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37: 654-71
- Stechly L, Morelle W, Dessein AF, Andre S, Grard G, et al. 2009. Galectin-4-regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. *Traffic* 10: 438-50

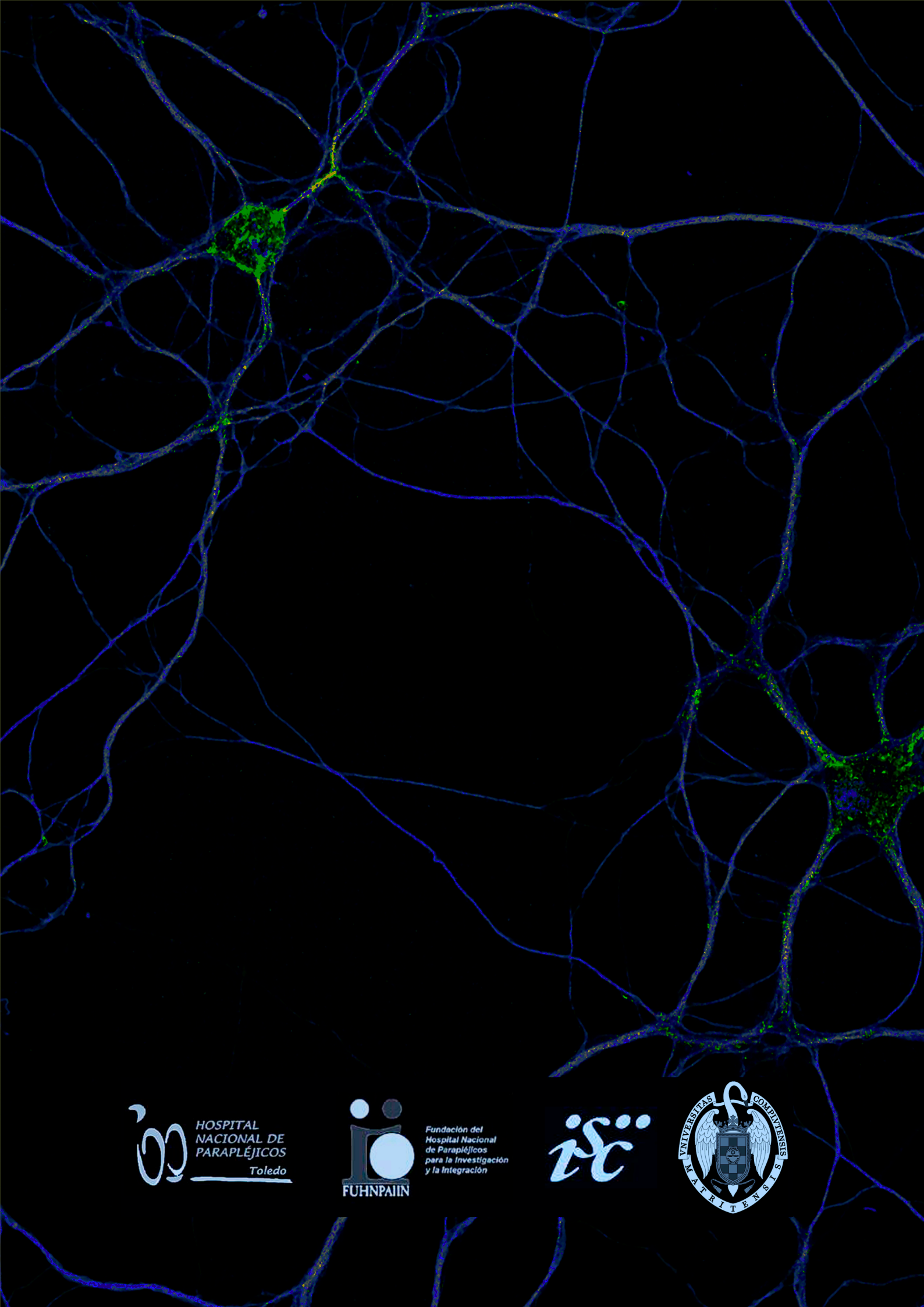
- Storan MJ, Magnaldo T, Biol-N'Garagba MC, Zick Y, Key B. 2004. Expression and putative role of lactoseries carbohydrates present on NCAM in the rat primary olfactory pathway. *The Journal of comparative neurology* 475: 289-302
- Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, et al. 2004. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol* 24: 4395-406
- Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M. 2000. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 1: 91-100
- Tonge DA, de Burgh HT, Docherty R, Humphries MJ, Craig SE, Pizzey J. 2012. Fibronectin supports neurite outgrowth and axonal regeneration of adult brain neurons *in vitro*. *Brain research* 1453: 8-16
- Townson K, Greenshields KN, Veitch J, Nicholl D, Eckhardt M, et al. 2007. Sulfatide binding properties of murine and human antiganglioside antibodies. *Glycobiology* 17: 1156-66
- van Buul JD, Kanters E, Hordijk PL. 2007. Endothelial signaling by Ig-like cell adhesion molecules. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27: 1870-6
- van den Pol AN, Kim WT. 1993. NILE/L1 and NCAM-polysialic acid expression on growing axons of isolated neurons. *The Journal of comparative neurology* 332: 237-57
- Varki A, Kornfeld S. 2009. P-type Lectins In *Essentials of Glycobiology*, ed. A Varki, RD Cummings, JD Esko, HH Freeze, P Stanley, et al. Cold Spring Harbor (NY)
- Vasta GR, Ahmed H, Du S, Henrikson D. 2004. Galectins in teleost fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity. *Glycoconjugate journal* 21: 503-21
- Velasco S, Díez-Revuelta N, Hernández T, Kaltner H, André S, Gabius HJ, Abad-Rodríguez J. 2013. Neuronal Galectin-4 is required for axon growth and for the organization of axonal membrane L1 delivery and clustering. *Journal of Neurochemistry*. 10.1111/jnc.12148
- Venkatesan C, Chrzaszcz M, Choi N, Wainwright MS. 2010. Chronic upregulation of activated microglia immunoreactive for galectin-3/Mac-2 and nerve growth factor following diffuse axonal injury. *Journal of neuroinflammation* 7: 32
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, et al. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *The Journal of biological chemistry* 274: 3235-42
- Wade A, Robinson AE, Engler JR, Petritsch C, David James C, Phillips JJ. 2013. Proteoglycans and their roles in brain cancer. *The FEBS journal*
- Wai Wong C, Dye DE, Coombe DR. 2012. The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *International journal of cell biology* 2012: 340296
- Wanner IB, Wood PM. 2002. N-cadherin mediates axon-aligned process growth and cell-cell interaction in rat Schwann cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 4066-79

- Wei Q, Eviatar-Ribak T, Miskimins WK, Miskimins R. 2007. Galectin-4 is involved in p27-mediated activation of the myelin basic protein promoter. *Journal of neurochemistry* 101: 1214-23
- Weisz OA, Rodriguez-Boulan E. 2009. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *Journal of cell science* 122: 4253-66
- Winckler B, Yap CC. 2011. Endocytosis and endosomes at the crossroads of regulating trafficking of axon outgrowth-modifying receptors. *Traffic* 12: 1099-108
- Witte H, Bradke F. 2008. The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current opinion in neurobiology* 18: 479-87
- Witte H, Neukirchen D, Bradke F. 2008. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of cell biology* 180: 619-32
- Wu AM, Wu JH, Liu JH, Singh T, Andre S, et al. 2004. Effects of polyvalency of glycotopes and natural modifications of human blood group ABH/Lewis sugars at the Galbeta1-terminated core saccharides on the binding of domain-I of recombinant tandem-repeat-type galectin-4 from rat gastrointestinal tract (G4-N). *Biochimie* 86: 317-26
- Wu AM, Wu JH, Tsai MS, Liu JH, Andre S, et al. 2002. Fine specificity of domain-I of recombinant tandem-repeat-type galectin-4 from rat gastrointestinal tract (G4-N). *Biochem J* 367: 653-64
- Yanagisawa M, Yu RK. 2007. The expression and functions of glycoconjugates in neural stem cells. *Glycobiology* 17: 57R-74R
- Yoshida J, Kubo T, Yamashita T. 2008. Inhibition of branching and spine maturation by repulsive guidance molecule in cultured cortical neurons. *Biochemical and biophysical research communications* 372: 725-9
- Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A. 2002. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *The Journal of biological chemistry* 277: 6852-7
- Yurchenco PD. 2011. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3
- Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, et al. 2008. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *The FEBS journal* 275: 1939-48

Resumen de abreviaturas

aa	Aminoácido	FN	Fibronectina
ADN	Ácido desoxirribonucleico	GAGs	Glicosaminoglicanos
Arg	Arginina	Gal	Galactosa
ARN	Ácido ribonucleico	Gal-1	Galectina 1
Asp	Aspártico	Gal-3	Galectina 3
BCA	Ácido biscinoconínico (<i>Bicinchoninine acid assay</i>)	Gal-4	Galectina 4
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	GalNAc	N-acetilgalactosamina
CAMs	Moléculas de adhesión celular (<i>Cell adhesion molecules</i>)	Glc	Glucosa
CKI	Enzima Caseín-kinasa-I	GlcA	Ácido D-glucurónico
CLAP	Cóctel inhibidor de proteasas	GlcNAc	N-acetilglucosamina
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos (<i>Carbohydrate recognition domain</i>)	Glu	Glutamina
C-terminal	Carboxilo terminal	Gly	Glicina
d.s.	Desviación estándar	GPI	Glicofosfatidil-inositol
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano	HBSS	Solución tamponada de Hank (<i>Hank's balanced salt sodium</i>)
div	Días <i>in vitro</i>	HEPES	Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfónico
DMEM	MEM modificado por Dubelco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)	hiv	Horas <i>in vitro</i>
DMJ	1-desoxymannojirimicina	HNK	Células <i>human natural killer</i>
DSP	Dithiobis [succinimidylpropionato]	HS	Heparán Sulfato
E1, E2...	Embriones de 1 día, 2 días, etc.	HT-29	Línea celular proveniente de adenocarcinoma de colon humano
ERM	Proteínas Ezrin, Radixin y Moesin	IgG	Inmunoglobulina G
FAK	Quinasa de adhesión local (<i>Focal-adhesion kinase</i>)	KDa	Kilodaltons
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	Lac	Lactosa
FITC	Fluoresceína-isothiocyanato	LacNAc	N-acetilactosamina
		LAM	Laminina
		Leu	Leucina
		MAG	Glicoproteína asociada a mielina (<i>myelin-associated glycoprotein</i>)
		MBP	Proteína básica de mielina (<i>Myelin basic protein</i>)
		MEC	Matriz extracelular

MEM	Medio mínimo esencial (<i>Minimal Essential Medium</i>)	PFA	Paraformalehído
MEM-HS	Medio mínimo esencial suplementado con 10% <i>Horse Serum</i> (suero de caballo)	pGal-3	Galectina-3 fosforilada
MβC	Metil-β-ciclodextrina	PLL	Poly-L-Lysina
N-CAM	Moléculas de adhesión de células de tipo neural (<i>Neural cell adhesion molecules</i>)	PPI	Enzima proteín-fosfatasa I
N-terminal	Amino terminal	Ser	Serina
P0,P1,P2...	Recién nacidos y postnatales de 1 día, 2 días, etc.	siRNA	RNA pequeño de interferencia (<i>small interfering RNA</i>)
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'- phosphosulfato	SN	Sistema nervioso
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)	SNC	Sistema nervioso central
PC12	Línea celular proveniente de feocromocitoma de rata	SNP	Sistema nervioso periférico
		TCA	Ácido tricloroacético
		TGasa	Enzima transglutaminasa
		trGal-3	Galectina-3 truncada
		Trp	Triptófano
		WB	Western Blot
		β-ME	β-mercaptoetanol



Fundación del Hospital Nacional de Paraplégicos para la Investigación y la Integración

