



Tesis Doctoral

“Correlación entre eventos tempranos de polaridad en la formación axonal”

Lic. Mariana Oksdath Mansilla

2015

Córdoba-Argentina

Signatariu: K-1
Topografia: 611.0158
..... 0
Nº. Invențiar: 13853
Agentia: Autor
Denotati:
Proiect:
Expediente:
Ordin Proiectat:
Licitații:
Permis:
Data de Incheiere: 02/12/20

jml			
-----	--	--	--

Director de Tesis: Dr. Santiago Quiroga



Comisión de Tesis:


Dr. Javier Valdéz


Dr. Daniel Mascó


Dra. Carolina Montes

Hay cosas que no se compran en la botica de la esquina. Hay que hacer la enorme y costosa diligencia de adquirirlas con el espíritu, y eso cuesta.

Atahualpa Yupanqui

Esta tesis esta

dedica a mis viejos,

dos grandes

maestros de la vida.

Agradecimientos

Una de las partes más compleja de la escritura de esta tesis fue sin lugar a dudas, escribir esta pequeña e importante sección, no por ingrata, sino por lo difícil que resulta expresar en palabras la enorme satisfacción y alegría que representa culminar esta etapa y lo mucho que le debo a tantos.

En primer lugar agradecer a las instituciones que me albergaron y financiaron por todos estos años, la Universidad Nacional de Córdoba, la Facultad de Ciencias Químicas, el Centro de Investigación en Química Biológica de Córdoba y CONICET.

Agradecer a Santiago por brindarme un lugar donde pude desarrollarme profesionalmente.

A todas esas personas del CIQUIBIC que de una u otra manera ayudaron a hacer mi vida doctoral más simple. A todos ellos, gracias.

También les quiero agradecer a mis compañeros del lab Alvaro, Diego, Flor y Lucas por la inmensa ayuda, por compartir, por hacer el día a día más simple. También le agradezco a nuestro compañero por adopción Luis, gracias por tu enorme paciencia para escuchar la innumerable cantidad de eventos catastróficos sucedidos, pero principalmente te agradezco por tu amistad.

También quiero agradecer a uno de los pilares más importantes en mi vida, mis amigas. Gracias Iv, Adri, Juli, Vicky y Co por tanto. La vida se está encargando de ponernos pruebas pero yo estoy convencida que esta amistad tiene para rato.

Mi razón de ser y mi cable a tierra son mi hermosa familia, a la cual le debo todo. Gracias por existir y hacer mi vida mucho más feliz.

A Alvaro por los grandes gestos, y por las pequeñas grades cosas cotidianas que me dan vida. Esta tesis tiene tu impronta has sido parte desde el principio y el promotor más fuerte que me permitió llegar hoy acá.

Esta etapa llena de matices, requirió de mucho esfuerzo, dedicación, valentía y sobre todo autocontrol, nada de esto hubiera sido posible de no ser por todas esas personas que menciono y aquellas que no, que hicieron que mantuviera la cordura.

También quiero agradecer a todos aquellos que ponen honestidad, convicción, pasión y talento en lo que hacen, ustedes son mi fuente de inspiración.

La correcta función del sistema nervioso en organismos complejos, dependen de la existencia de un flujo direccional de la información y una correcta interacción entre las células neuronales, producto de la gran asimetría morfológica que presentan las neuronas.

El desarrollo de una neurona polarizada típica con un único axón y varias dendritas ramificadas, requiere la acción de dos procesos coordinados, la especificación axonal temprana y el establecimiento de la polaridad neuronal que culmina con la formación de un axón. En este proceso de desarrollo intervienen tanto eventos intra como extracelulares.

Ciertos fenómenos esenciales para el establecimiento de un axón, presentan una asimetría temprana en neuronas hipocampales morfológicamente no polarizadas (estadio 2 de desarrollo). Ejemplos de estos fenómenos son: la acumulación de los receptores del IGF-1 activables en la membrana plasmática de un proceso menor (Sosa et al., 2006), el enriquecimiento de microtúbulos estables, rearrreglo que se conserva en el axón (Witte et al., 2008). Así mismo también se observa un transporte selectivo del motor microtubular KIF5C, y una acumulación en la punta del proceso menor que se convertirá en el futuro axón (Jacobson et al., 2006).

Sin embargo se desconocía hasta el momento si estos tres eventos eran fenómenos interdependientes o independientes para lo cual se diseñaron experimentos que permitieran evaluar esta posible correlación. En primer lugar, la acumulación temprana de microtúbulos más estables en una neurita direcciona el enriquecimiento de los RIGF-1 en la membrana de esa neurita, ya que al modificar la estabilidad de los microtúbulos con diferentes drogas, se altera la localización en membrana de dicho receptor. Por otro lado la neurita que presenta una estabilización local de los microtúbulos es la misma neurita que acumula RIGF-1 activables en la membrana.

Por otro lado, el motor anterógrado KIF5C es esencial para el establecimiento de polaridad neuronal, ya que tras su silenciamiento génico con el uso de shRNA las neuronas hipocampales no son capaces de desarrollar un fenotipo polarizado. Además este motor axonal –que prefiere moverse por microtúbulos más estables– participa

en el transporte polarizado de la SNARE sintaxina 6, proteína necesaria para el anclaje de las vesículas precursoras de plasmalema (PPVs) conteniendo a los RIGF-1. Estas vesículas son direccionadas preferencialmente hacia el proceso menor que se convertirá en el futuro axón.

Este trabajo de tesis doctoral permitió demostrar que existe una interconexión entre los tres eventos descritos anteriormente, esenciales para la formación de un axón y el establecimiento de polaridad neuronal.

1.INTRODUCCIÓN	6
1.1. Arquitectura celular.....	7
1.2. Establecimiento de polaridad y especificación axonal en neuronas hipocampales "in vitro"	8
1.2.1. Cultivo primario de neuronas embrionarias de hipocampo.....	8
1.3. Regulación de la polaridad y citoesqueleto neuronal.....	11
1.3.1. Vias de señalización implicadas en la especificación axonal.....	11
1.3.2. Citoesqueleto neuronal.....	12
1.3.3 Transporte vesicular mediado por motores microtubulares.....	15
1.4. Expansión del plasmalema para el crecimiento axonal.....	19
1.4.1 Exocitosis de PPVs para la expansión de membrana.....	20
2.OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo General.....	26
2.2 Objetivos Especificos.....	26
2.2.1 Analizar la conexión, en el fenómeno de desarrollo axonal, entre la distribución polarizada de los receptores de IGF-1 fosforilados (pIGF-1R) y el enriquecimiento de los Microtúbulos (MTs) estables en una neurita de células en estadio 2.....	26

2.2.2 Determinar si el motor microtubular KIF5C (que "camina" preferencialmente sobre microtúbulos estables) transporta algún cargo necesario para la inserción polarizada del IGF-1R.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
3. Resultados Parte I	28
3.1 Correlación entre el enriquecimiento de los RIGF-1 activos (pIGF-1R) y los Microtúbulos (MTs) estables en una neurita de células en estadio 2....	28
3.2 La estabilización de microtúbulos no es suficiente para generar el crecimiento axonal, es esencial además, la activación de la cascada de la PI3k-Cdc42 via el IGF1R.....	31
3.3 Estudio de la alteración por Nocodazol en el funcionamiento intracelular en neuronas del hipocampo.....	33
4. Discusión Parte I	37
4.1 La reorganización del citoesqueleto de tubulina y la exocitosis de los RIGF-1 son procesos vinculados y esenciales para el establecimiento de polaridad neuronal.....	38
4.1.1 Mecanismos de la polarización neuronal.....	38
4.1.2 La estabilización de los MTs direcciona la exocitosis de los RIGF-1.....	40
5. Resultados Parte II	43
5.1 El motor KIF5C es necesario para el establecimiento de un axón.....	44
5.2 KIF5C media la exocitosis polarizada de los RIGF-1.....	48
5.3 La SNARE Syntaxina 6 (Sxt6) cargo del motor microtubular KIF5C.....	50



5.4 Transporte selectivo de Sintaxina 6 en neuronas hipocampales en estadio 2.	56
6. Discusión Parte II	60
6.1 KIF5C y el establecimiento de polaridad neuronal	61
6.2 Transporte selectivo mediado por KIF5C	62
7. CONCLUSIONES	66
<hr/>	
8. MATERIALES Y MÉTODOS	69
<hr/>	
8.1 Cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata	70
8.1.1 Tratamiento con drogas	71
8.2 Inmunofluorescencia	71
8.2.1 Fijación con PFA	71
8.2.2 Fijación con Buffer PHEM	72
8.3 Anticuerpos Primarios	73
8.4 Anticuerpos Secundarios	73
8.5 Transfección	74
8.5.1 Transfección Convencional	74

8.5.2 Transfección en Suspensión.....	74
8.5.2 Nucleofección.....	75
8.6 Biología Molecular: Preparación de construcciones.....	76
8.6.1 Construcción de los vectores para expresión de shRNAs.....	76
8.6.2 Obtención y subclonado de construcciones utilizadas para experimentos de recuperación de fenotipo.....	77
8.7 Purificación de GCPs.....	77
8.8 Purificación de Microsomas.....	78
8.9 Inmunoprecipitación de estructuras membranosas derivadas de conos de crecimiento axonales y Microsomas.....	79
8.10 Electroforesis y Western Blot.....	80
8.11 Cuantificaciones.....	81
8.11.1 Índice de polaridad.....	81
8.11.2 Análisis del Transporte Vesicular.....	82
9. REFERENCIAS	84

INTRODUCCIÓN

1.1 Arquitectura celular.

1.2. Establecimiento de polaridad y especificación axonal en neuronas hipocampales *in vitro*.

1.3. Regulación de la polaridad y citoesqueleto neuronal.

1.4. Expansión del plasmalema para el crecimiento axonal.

1.1 Arquitectura celular

La compleja red que constituye al sistema nervioso, está gobernada por su unidad básica, la **neurona**. Dicha célula se distingue por sus ramificaciones –axones y dendritas- que conforman las redes neuronales. Una de las clasificaciones más antiguas para este grupo celular, es de acuerdo a su morfología, así como, poliédricas, fusiformes, estrelladas, esféricas y piramidales. Una neurona piramidal típica, presenta entre 4 a 6 dendritas ramificadas y un único axón que puede alcanzar varios centímetros a metros en longitud total. Las prolongaciones dendríticas suelen ser cortas y anchas en la zona cerca al soma celular y finas en los extremos, con ramificaciones en forma de Y, mientras que el axón es típicamente delgado y largo, de forma homogénea y ramificaciones en ángulo recto desde el cuerpo celular (Arimura and Kaibuchi, 2007) .

La característica principal de las células neuronales es su marcada asimetría, propiedad que permite el correcto cableado del sistema nervioso. En las neuronas se pueden diferenciar morfológica, bioquímica y funcionalmente dos dominios, el somato-dendrítico, región encargada de recibir y procesar la información generando un impulso nervioso, además este dominio, es el área encargada de la síntesis de proteínas; y el dominio axonal, especializado en la sinapsis, transmite la información entre células propagando dicho impulso nervioso que culmina con la liberación de neurotransmisores con el objetivo de transmitir la información.

La polaridad de la neurona, por lo tanto, permite el flujo direccional de la información que se requiere para la comunicación entre neuronas y entre las neuronas y las células efectoras. Proceso esencial para el funcionamiento de todos los organismos complejos.

1.2. Establecimiento de polaridad y especificación axonal en neuronas hipocampales *in vitro*

Históricamente, el avance de un sistema de cultivo *in vitro* de neuronas hipocampales disociadas representa un modelo experimental para mejorar nuestro entendimiento sobre la biología celular de la polaridad neuronal, pretendiendo resolver el interrogante de ¿cómo adquiere la neurona su compleja arquitectura dendrítica y axonal? (Dotti et al., 1988). La simplificación de los cultivos primarios, permite el análisis de aspectos puntuales en el desarrollo de la célula que en su conjunto son demasiados complejos para escrutar.

1.2.1. Cultivo primario de neuronas embrionarias de hipocampo

Las neuronas hipocampales adquieren su forma característica por una serie de eventos de desarrollo secuenciales. En tales cultivos *in vitro* se pueden clasificar 5 estadios de desarrollo de manera bioquímica y morfológica (Figura 1a). A continuación se presenta una breve descripción de tales estadios:

Estadio 1: Formación de la lamelipodia. Poco después de la interacción de las células con el sustrato, se desarrolla una lamela móvil en la periferia de la célula junto con unos pocos filopodios, estructuras ricas en filamentos de actina y proteínas asociadas (α -actinina, filamina, vinculina, etc.). Dicha lamelipodia refleja una adaptación de las células al crecimiento en un sustrato en 2 dimensiones.

Estadio 2: Crecimiento de los procesos menores. Si bien la formación de la lamelipodia surge del crecimiento neuronal *in vitro*, cambios o rupturas discretas en regiones específicas de dicha estructura, dan lugar a pequeñas protrusiones que derivan en las neuritas. Estos procesos discretos luego de unas pocas horas exhiben entre 10-15 μ m de largo. Si bien no presentan un crecimiento neto, se mueven continuamente distancias cortas de retracción y extensión. Una característica

importante de este estadio de desarrollo es que, morfológicamente, no se encuentra una diferencia entre los procesos menores. Sin embargo una de estas neuritas adquiere la capacidad de convertirse en axón, y como se describirá más adelante, hay eventos tempranos de polarización de diferentes moléculas. Es decir, podemos distinguir una asimetría a nivel molecular en células que morfológicamente no presentan una polarización.

Estadio 3: Formación y crecimiento del axón. Entre 12 y 18 horas posteriores al plaqueo, las células sufren un cambio abrupto cuando una de las neuritas comienza un elongamiento acelerado para dar lugar al futuro axón. Para que se genere este primer indicio de asimetría, un proceso menor debe alcanzar una velocidad de crecimiento entre 5 a 10 veces superior respecto a las neuritas remanentes. Este crecimiento es liderado por una estructura en el extremo del proceso denominada "cono de crecimiento axonal" (Fig. 1B). Estructura especializada para el crecimiento direccional. Censa el espacio extracelular con movimientos muy dinámicos de retracción y elongación, en respuesta a diferentes señales y estímulos (factores de crecimiento, moléculas señal presentes en el sustrato, interacciones célula-matriz-, etc.). A su vez, esta estructura, es el sitio de mayor expansión de membrana mediada por la exocitosis regulada de vesículas precursoras de plasmalema (PPVs).

En esta etapa de desarrollo la célula se ha polarizado, pudiendo diferenciar, morfológicamente un axón, con una longitud superior en al menos 20 μm respecto al promedio de los demás procesos, así como bioquímicamente con marcadores moleculares tal como Tau 1* (Mandell and Banker, 1996) o GAP43 (Goslin et al., 1988).

Estadio 4: Crecimiento de dendritas. Posterior a la especificación axonal, las neuritas que no siguieron un proceso de elongación neto, inician el crecimiento y la maduración, adquiriendo propiedades típicas de las dendritas. Sin embargo, este fenómeno solo se lleva a cabo a los 4 días de cultivo; aproximadamente entre 2 y 3 días posterior al crecimiento axonal. Una de los marcadores específicos que

*Tau 1 y MAP2. Pertenecen a la familia de las MAP (proteínas asociadas a microtubulos). Se conocen por su función estabilizadora de microtubulos y regular las redes microtubulares en axones y dendritas

determinan la identidad de una dendrita es la expresión de la proteína MAP2* (Caceres et al., 1984).

Estado 5: Maduración final. Posterior a los 7 días de cultivos, las neuronas comienza la última etapa de maduración. Los axones forman contactos sinápticos funcionales pudiendo generar corrientes eléctricas (Bartlett and Banker, 1984; Segal, 1983). Por su lado las dendritas aumentan su arborización y comienzan a formar espinas dendríticas. En este punto la neurona ha alcanzado su polarización funcional.

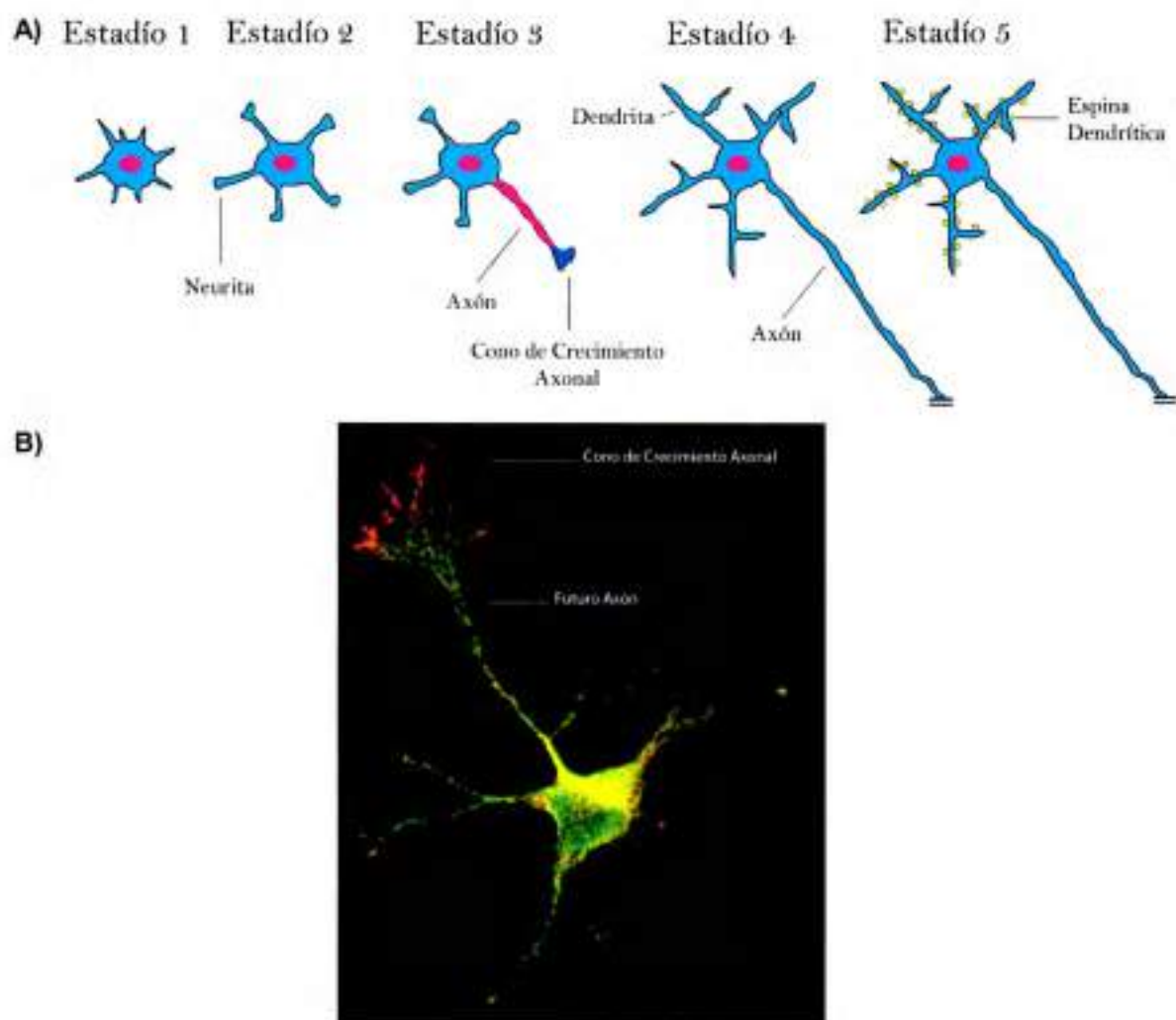


Figura 1: A. Desarrollo *in vitro* de neuronas hipocámpicas. Esquematación de los estadios de desarrollo. (Modificado Giovanna Lalli 2014). Las neuronas atraviesan diferentes estadios de crecimiento con características morfológicas y bioquímicas diferenciales. B. Doble inmunofluorescencia (proteína p38 en rojo y tubulina β III en verde) de una neurona

hipocámpal en cultivo primario en un estadio 3 temprano de desarrollo. Se puede observar el cono de crecimiento liderando la elongación de una de las neuritas menores.

1.3. Regulación de la polaridad y citoesqueleto neuronal

Hasta aquí hemos abordado la importancia de la polaridad neuronal para el correcto funcionamiento de las neuronas. A continuación planteamos el conjunto de mecanismos moleculares y vías de señalización implicadas en el establecimiento de polaridad y su conexión con el citoesqueleto, estructura esencial para la polaridad celular.

1.3.1. Vías de señalización implicadas en la especificación axonal

Los procesos de la iniciación axonal pueden ser disparados por señales extracelulares tales como factores de crecimiento, o elementos de la matriz extracelular, disponibles para activar diferentes cascadas de señalización dirigiendo una distribución asimétrica de los reguladores de la polaridad. Los factores de crecimiento son descritos como importantes reguladores del desarrollo, función, supervivencia y plasticidad neuronal. Durante el desarrollo, estos están implicados en el crecimiento de las fibras neuronales (axones y dendritas) así como en patrones de inervación, expresión de proteínas específicas para el correcto funcionamiento celular, etc. Dentro de estos factores de crecimiento se encuentran, el *Factor de Crecimiento Neural* (NGF), el *Factor de Crecimiento Derivado de Glía* (GDNF), el *Factor de Crecimiento Derivado de Cerebro* (BDNF) y el *Factor de Crecimiento similar a Insulina* (IGF-1).

Estudios en cultivos primarios de neuronas hipocámpales revelaron que el *Factor de Crecimiento similar a Insulina Tipo I* (IGF-1) es esencial para el establecimiento de polaridad neuronal; debido a que al reducir la función de su receptor (Receptor del Factor de Crecimiento Tipo I, RIGF-1) ya sea con el silenciamiento génico a través del uso de siRNA o con un anticuerpo bloqueante

específico que interfiere con el correcto funcionamiento de dicho receptor, se previene la formación de un axón (Sosa et al., 2006). Por su parte la cascada de señalización que estimula dicho factor de crecimiento implica, entre otros, la activación de su propio receptor (RIGF-1) y cascada abajo, a la enzima fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K). Esta enzima y su principal producto el fosolípido fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3), que se recluta en la membrana del axón creciente, son reportados como promotores del crecimiento neurítico y la especificación axonal (Laurino et al., 2005; Menager et al., 2004; Shi et al., 2003). Esto se propuso en base a los resultados de varios grupos de investigación en donde, la inhibición farmacológica de la quinasa lipídica PI3k con LY294002 o Wortmaninna previene la formación de un axón, mientras que la sobreexpresión de la subunidad catalítica (p110) constitutivamente activa permite la formación de múltiples axones (Barnes and Polleux, 2009; Shi et al., 2003).

Una neurona hipocampal en estadio 2 de desarrollo no presenta una morfología polarizada; sin embargo hay evidencias de una polaridad a nivel molecular. Tal es el caso de los receptores activos (fosforilados) de IGF-1 (RIGF-1p). Una célula desarrollada en cultivo, sin contacto célula-célula ni matriz extracelular, que se estimula en tiempos cortos con el ligando IGF-1 presenta un enriquecimiento de los RIGF-1 fosforilados en la membrana de una de las neuritas en células en estadio 2. Este es uno de los eventos tempranos de polaridad previo a la formación del axón. Además esta distribución polarizada también se conserva en el axón en neuronas en estadio 3 (Sosa et al., 2006).

1.3.2. Citoesqueleto neuronal

Unos de los principales interrogantes en neurobiología es como las neuronas alcanzan su morfología altamente polarizada. En este proceso la formación del axón se basa en reordenamientos altamente regulados del citoesqueleto (Neukirchen and Bradke, 2011).

En primera instancia la polimerización de los filamentos de actina causa la extensión y protrusión del cono de crecimiento. Esta elongación acelerada, genera un

fenómeno denominado flujo retrógrado, donde la polimerización de la actina crea una fuerza que empuja a la red de actina y a la membrana que se encuentra estrechamente vinculada con esta, hacia el extremo del futuro axón en crecimiento. Por otro lado se han reportado varias proteínas reguladoras de actina que incluyen a Rho, Cdc42, profilina, cofilina, entre otras, como participes en la regulación del proceso de polarización neuronal (Bito et al., 2000; Bradke and Dotti, 1999; Garvalov et al., 2007; Kunda et al., 2001).

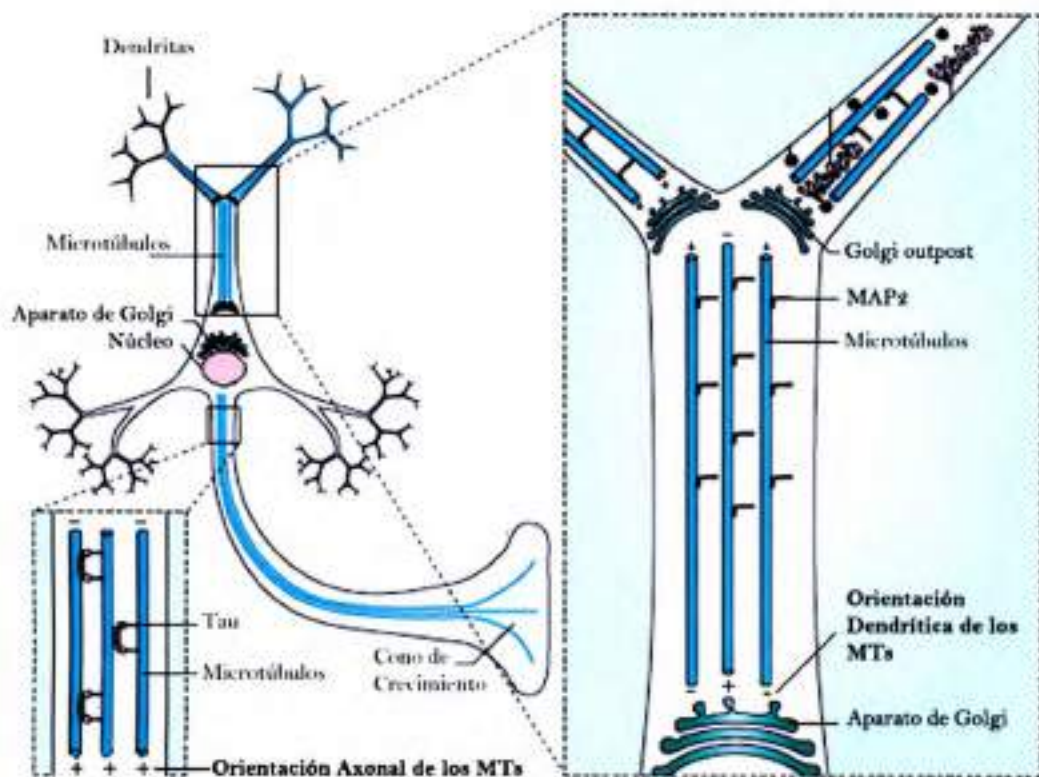
Por su parte los microtúbulos (MTs), juegan un rol activo en el establecimiento del axón. Una de las características principales de los MTs es su habilidad para someterse a ciclos rápidos de crecimiento (polimerizado) y desensamblaje (depolimerizado). Este proceso es denominada como inestabilidad dinámica (Mitchison and Kirschner, 1984) y la transición de la polimerización a la despolimerización se conoce como catástrofe mientras que la transición opuesta se conoce como rescate.

Los MTs, encargados del soporte físico y la forma alargada y fina de los procesos neuríticos, presentan una polaridad intrínseca basada en la asimetría de los heterodímeros α , β Tubulina. Los MTs exhiben dos extremos diferenciables, el extremo menos (-), de crecimiento lento, donde se exponen las subunidades α -tubulina, y el extremo más (+), de crecimiento rápido, donde las subunidades β -tubulina son expuestas (de Forges et al., 2012; Jiang and Akhmanova, 2011; Sakakibara et al., 2013). Los MTs se elongan con la incorporación de heterodímeros de tubulina en el extremo +, formando un citoesqueleto polarizado.

En las neuronas los MTs tienen una organización diferencial entre los distintos procesos. En los axones los MTs se orientan con el extremo + hacia el exterior, mientras que en las dendritas pueden tener una mezcla de polaridad (Fig. 2) (Baas et al., 1989; Baas et al., 1988; Conde and Caceres, 2009).

Por otro lado los heterodímeros α - β tubulina sufren varias modificaciones post-traduccionales tales como acetilación /desacetilación, tirosinación/detirosinación, poliglutamilación, palmitoilación entre otras. La mayoría de las modificaciones post-traduccionales ocurren en el carboxilo-terminal de las α - β tubulina. Algunas de estas modificaciones post-traduccionales han sido utilizadas como marcadores de la

longevidad de los MTs. Por ejemplo, la acetilación (modificación que ocurre en la lisina 40 en el N-terminal de la α -tubulina) o la remoción enzimática del residuo tirosina en su C-terminal (detirosinación). Estas modificaciones ocurren gradualmente sobre el microtúbulo, y por lo tanto, se observan en MTs más estables, es decir con un bajo ciclo de recambio o pocos eventos catastróficos. Por el contrario cuando se encuentra α -tubulina tirosinada en los MTs, denota fibras recién sintetizadas, con muchos ciclos



de recambio y dinamismo.

Figura 2: Organización de los Microtúbulos en células neuronales (Esquema modificado de Conde and Cáceres, 2009). En las fibras axonales los MTs, asociados a proteínas Tau, se encuentran orientados con el extremo + hacia el cono de crecimiento, mientras que las dendritas, con MTs unidos a proteínas MAP2, presentan una mezcla en su orientación.

Trabajos recientes han demostrado que los axones de neuronas hipocampales *in vitro* presentan una estabilidad incrementada de los MTs. Asimismo, cambios en la dinámica de los MTs modifica la polarización neuronal, y el solo incremento en la

estabilidad de estos, es suficiente para inducir la formación de axones (Witte and Bradke, 2008; Witte et al., 2008).

Por otro lado neuronas en estadio 2 de desarrollo presentan una estabilización local de los MTs en una neurita, esto se considera una señal fisiológica que especifica la polarización neuronal en esa dendrita (Witte and Bradke, 2008; Witte et al., 2008). Este es otro fenómeno de polaridad temprana en células morfológicamente no polarizadas (Fig. 3).

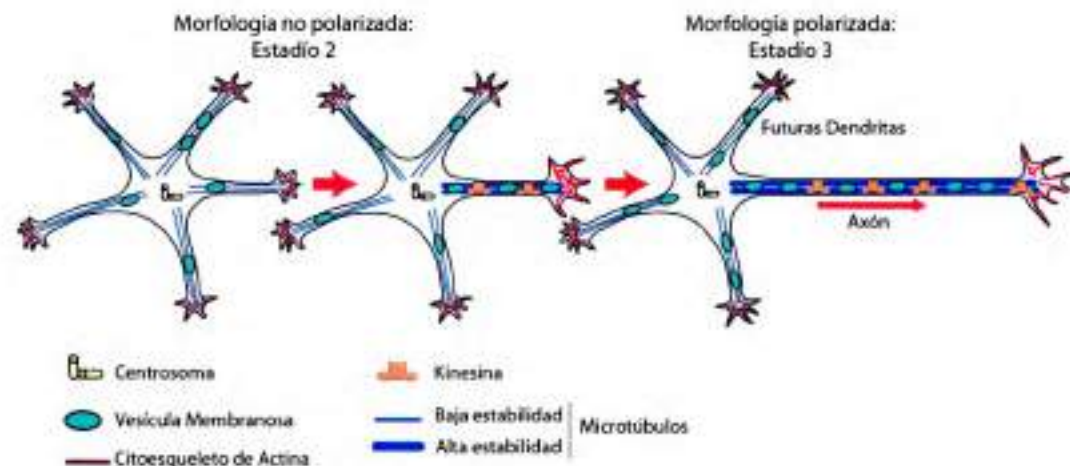



Figura 3: Re arreglos del citoesqueleto en la polarización neuronal (esquema modificado de Witte and Bradke 2008). Se observa en la neurona en estadio 2 la acumulación de MTs estables (azul) en un proceso menor, característica que es mantenida en el axón de la neurona en estadio 3. Por lo tanto, previo a la polarización morfológica el citoesqueleto sufre cambios, aumenta la dinámica de la actina en el cono de crecimiento de la neurita que se convierte en futuro axón, así como se incrementan los MTs estables.

1.3.3. Transporte vesicular mediado por motores microtubulares

En neuronas del hipocampo, existe una distribución polarizada de los MTs estables en una neurita de células en estadio 2 así como en el axón, por lo que se predice que tanto la biogénesis como el mantenimiento de los distintos compartimentos axonales y dendríticos dependen de un transporte selectivo de vesículas y proteínas específicas a lo largo de los MTs hacia estas diferentes regiones. Por lo que resulta crítico para el desarrollo y la función neuronal que exista un



transporte polarizado. Uno de los interrogantes en neurobiología es conocer los mecanismos moleculares de este transporte polarizado mediado por motores microtubulares hacia axones y dendritas (Hammond et al., 2009).

Los motores kinesinas, son enzimas que convierten la energía química de la hidrólisis del ATP en un trabajo mecánico a lo largo del microtúbulo. Dentro de los motores más estudiados se encuentran la kinesina-1 (convencionalmente kinesina o KIF5). Este motor contiene 2 dominios motores en el extremo N-terminal, estos dominios contienen las secuencias necesarias para la hidrólisis del ATP y para la interacción con los MTs. Se mueve progresivamente hacia el extremo + de los MTs en pasos de 8nm (distancia entre subunidades de β -tubulina adyacente) y genera velocidades que rondan en los 0,6-0,8 $\mu\text{m/s}$. La progresividad se debe al sistema de pasos "mano sobre mano" (del inglés *hand over hand*) en donde los 2 dominios motores alternan entre ciclos catalíticos manteniendo su interacción con los MTs (Verhey et al., 2011).

La holoenzima KIF5 es un heterotetrámero comprendido por 2 cadenas pesadas (KHC, del inglés *kinesin heavy chain*) y dos cadenas livianas (KLC, del inglés *kinesin light chain*). Las subunidades de las KHC contienen los dominios motores en el N-terminal mientras que las KLC contienen una región héptada repetida para la oligomerización con KHC, además de 6 motivos tetratricopéptidos repetidos (TPR) vinculados con la unión a cargos (Fig. 4) (Adio et al., 2006). Esta enzima es encargada del transporte anterógado en los axones, es decir desde el soma celular hacia el extremo del axón.

En mamífero las subunidades KHC son codificadas por tres genes (KIF5A, KIF5B, KIF5C). Mientras que KIF5B tiene una expresión ubicua, KIF5A y KIF5C tienen una expresión específica en neuronas (Hirokawa et al., 2009). Las subunidades KLC son codificadas por 4 genes (KLC1-4). Todos los transcritos de la kinesina-1 se pueden generar por splicing alternativo.

Kiensina 1

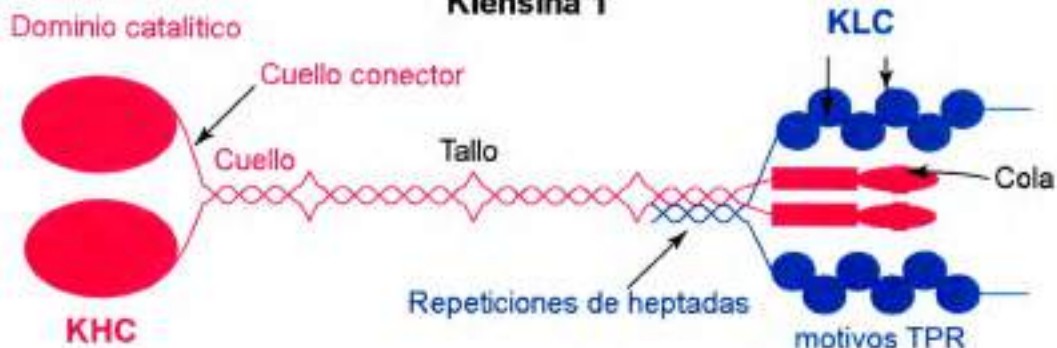


Figura 4: Subunidades que conforman el motor kinesina 1 (Esquema modificado de Verhey and Rapoport 2001). La enzima kinesina 1 es un heterotetrámero constituido por dos cadenas pesadas (KHC en rojo) y dos cadenas livianas (KLC en azul). Las cadenas pesadas contienen el dominio catalítico. Estas interactúan con las cadenas livianas mediante un flexible tallo constituido por α -hélices. Las moléculas cargo pueden interactuar tanto con la "cola" -transporte directo- como con las cadenas livianas -transporte indirecto-

La proteína KIF5C, es un motor que se asocia preferencialmente a los MTs axonales y no así a los dendríticos en neuronas de hipocampo en cultivo primario (Nakata and Hirokawa, 2003). Los MTs con modificaciones post-traduccionales en la Tubulina son enriquecidos en una neurita en particular de neuronas en estadio 2 y en el axón de células polarizadas en estadio 3. Este enriquecimiento se correlaciona con la acumulación selectiva del dominio motor de la proteína KIF5C constitutivamente activa. Por lo tanto la kinesina-1 tiene la habilidad de distinguir entre diferentes neuritas previo a la polarización morfológica, acumulándose especialmente en un tipo de neurita en particular de células en estadio 2. Sin embargo es importante destacar que esta acumulación puede ser muy dinámica alternando entre las diferentes neuritas en cuestiones de minutos. Indicando también, que las señales que direccionan el motor también deben ser dinámicas (Jacobson et al., 2006).

La capacidad del motor microtubular KIF5 para interactuar y en algunos casos hasta moverse a lo largo de los MTs se debe a la presencia de modificaciones post-traduccionales de la tubulina tales como acetilación, detirosinación o glutamilación (Dunn et al., 2008; Konishi and Setou, 2009; Larcher et al., 1996).

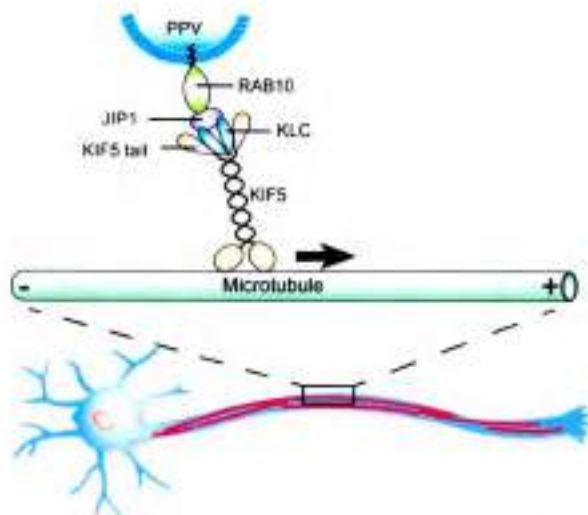


El movimiento selectivo del motor kinesina-1 en una neurita menor de células en estadio 2, puede ser vinculado con el incremento en la acetilación en los MTs de dicha neurita, debido a que otras modificaciones post-traduccionales como la detirosinación y la glutamilación, no presentan un enriquecimiento significativo en un proceso menor. Sin embargo cuando se aumenta los niveles de tubulina acetilada sin incrementar las otras modificaciones de la tubulina, no se altera el transporte selectivo del motor kinesina-1. En contraste cuando se altera de manera global la acetilación, detirosinación, y la glutamilación como, por ejemplo, con drogas como el Taxol o inhibidores de la GSK3 β (glucógeno sintasa quinasa 3) incrementado la estabilidad de los microtúbulos, alteran la selectividad del motor perdiendo la especificidad por una determinada neurita y generan múltiples axones (Hammond et al., 2010a).

Por lo tanto es interesante notar que el enriquecimiento de la enzima kinesina-1 (KIF5C) en una neurita que presenta MTs con mayor cantidad de α -tubulina acetilada en neuronas hipocampales en estadio 2, es otro fenómeno de polaridad previo a la polarización morfológica.

Este motor es considerado esencial para la formación de un axón, y su importancia se cree que radica en las proteínas cargo que el transporta. Las proteínas KIF5 tienen regiones específicas de interacción para los cargos, que están localizadas en el C-terminal de las KLCs; sin embargo, este motor tiene la habilidad de unirse directamente a cargos, sugiriendo la existencia de 2 formas de transporte, directa (a través, solo de las KHCs) o indirecta vía las KLCs (Hirokawa and Noda, 2008). Hasta el momento se encuentran identificadas unas series de cargos transportadas de manera directa e indirecta (ver tabla 1), Dentro de los cuales se destaca el transporte de la pequeña GTPasa Rab10 que interactúa con las KLCs del motor KIF5 mediante la proteína JIP1 (proteína que interacciona con JNK). Este complejo kinesina1/JIP1/Rab10 es requerido para el transporte anterógrado de PPVs (ver sección 1.4.1) durante el crecimiento axonal, lo que sugiere que el transporte direccional de Rab10 es esencial para la adición polarizada de nueva membrana durante el desarrollo axonal (Deng et al., 2014).

En el desarrollo inicial del axón intervienen tres procesos de polaridad molecular temprana, el incremento en la estabilidad de los MT en una neurita, la inserción polarizada de los pIGF 1R y el mayor transporte hacia un proceso menor mediado por KIF5.



Adaptación de Deng et al., 2014. Modelo propuesto para el transporte anterógrado de PPVs con Rab10 a lo largo del axón. Las vesículas PPVs cargadas con Rab10 son transportadas por KIF5 mediante JIP1 que interactúa directamente con las KLC.

Tabla 1

Motor	Implicancia de KLC	Tipo de Cargo	Proteína adaptadora o scaffold	Molécula cargo
Transporte Axonal				
motor KIF5	Ninguno	Mitocondria	Milton, Miro, sintabulina and RanBP2	Proteínas Mitocondriales
	No se conoce	Lisosomas	No se conoce	LAMP2
	Ninguno	Precursores de vesículas sinápticas	UNC76	UNC51 (ATG1) and sinaptotagmina
	Ninguno	Precursores de Membrana sináptica	Sintabulina	Sintaxina 1
	Ninguno	Precursores de Membrana sináptica	Ninguno	SNAP25
	Ninguno	Complejo proteico desconocido	DISC1	Nudel y LIS1
	KLC	Vesículas	JIPs	APOER2 (LRP8)
	KLC	Vesículas	JIP1 (MAPK8IP1)	APP fosforilado
	KLC	Dímero de Tubulina	CRMP2	Tubulina

Tabla 1: Transporte axonal directo e indirecto del motor KIF5 (tabla modificada de Hirokawa N., et al 2009)

1.4. Expansión del plasmalema para el crecimiento axonal

Uno de los eventos necesarios para el crecimiento de los procesos neuronales es la expansión de la membrana. Es interesante notar que en cultivos de neuronas

hipocampales que han crecido alrededor de 7 días "in vitro" pueden tener ~ 250µm de dendritas y 3000µm de axones. Asumiendo que el diámetro de las fibras es ~1µm esto constituye ~10.000µm² de área de superficie que es ~30 veces más que el área de superficie de un soma de 10µm de diámetro (Futerman and Banker, 1996; Ye et al., 2006). Es evidente, por lo tanto, destacar que a diferencia de otros tipos celulares, las neuronas requieren de un proceso altamente regulado que permita la agregación de membrana en el lugar y en la forma adecuada.

1.4.1. Exocitosis de PPVs para la expansión de membrana

El proceso de expansión de membrana en células neuronales, es producto de la "exocitosis regulada con fines no secretorios" de vesículas precursoras de plasmalema (PPVs) (Coco et al., 1999; Laurino et al., 2005; Leoni et al., 1999; Lockerbie et al., 1991; Osen-Sand et al., 1996; Pfenninger et al., 2003; Schoch et al., 2001; Pfenninger et al., 2009). Estas vesículas presentan una característica pleomórfica, un tamaño de ~150nm, y su ubicación se encuentra en la periferia de los conos de crecimiento de las fibras en desarrollo.

Como se conoce por bibliografía, existen 2 tipos de exocitosis. La *constitutiva* – fusión continua de vesículas que no se encuentra sometida a regulación alguna, con sitios de inserción específicos y controlados – las vesículas secretorias están continuamente produciéndose y llevándose desde la red trans del Golgi (TGN del inglés *Trans Golgi Network*) a la membrana plasmática, permitiendo la fusión y el descargo de su contenido al espacio extracelular. La *exocitosis regulada* – las vesículas son liberadas en respuesta a un estímulo, que en la mayoría de los casos es el ión Ca²⁺ – un ejemplo, es la exocitosis de neurotransmisores. Dentro de la exocitosis regulada, se pueden diferenciar dos tipos, la *exocitosis con fines secretorios*, como la fusión de vesículas sinápticas; con la *exocitosis con fines no secretorios*, como la fusión de vesículas para la expansión del plasmalema.

La exocitosis de PPVs, que permite la expansión de membrana, es regulada en el cono de crecimiento por IGF-1 en una manera casi independiente del soma neuronal.

Por otro lado, se demostró que la activación de la vía de señalización IRS/PI3k/Cdc42 por el ligando IGF-1 a través de su receptor, es necesaria para la exocitosis de PPVs y la expansión de membrana (Laurino et al., 2005; Pfenninger et al., 2003).

Para que el fenómeno de expansión de membrana se lleve a cabo, las vesículas que son excitadas sufren una serie de eventos esenciales ampliamente estudiados. Estos se pueden dividir en 4 diferentes etapas, *formación de la vesícula* (del inglés *budding*), *transporte*, *acercamiento* (del inglés *tethering*), y finalmente la *fusión* en la membrana target o blanco. En la primera etapa hay una serie de proteínas vinculadas, las mejor estudiadas son aquellas denominadas "de cubierta" tales como clatrina, COPI y COPII. Después de la formación de las vesículas, estas son transportadas por difusión o por transporte mediado por motores a lo largo del citoesqueleto; en este último están implicados tanto kinesinas, dineinas como miosinas. La tercera etapa es el acercamiento o tethering (término utilizado para describir la interacción inicial entre la vesícula y la membrana target). En esta, se describen diferentes complejos proteicos que funcionan como anclaje entre las vesículas y su membrana blanco; como COG, TRAPP1, TRAPP2, exocisto, entre otros. Finalmente la última etapa es la fusión de la vesícula con su membrana target, etapa mediada por la formación del complejo proteico SNARE (*Soluble NSF Attachment Receptor* o Receptor de unión para el factor soluble NSF). Este complejo está formado por tres proteínas neuronales, sinaptobrevina, sintaxina y SNAP25. Estas proteínas se pueden clasificar en dos tipos: v-SNARE y t-SNARE. Las v-SNARE se incorporan en la vesícula durante su formación en el compartimento fuente y las t-SNARE se encuentran en las membranas del compartimento diana. La interacción entre v-SNARE y t-SNARE provoca un acercamiento de las membranas de la vesícula y del compartimento diana, liberando además la energía necesaria para la fusión de ambas membranas (Cal et al., 2007; Maldonado-Baez et al., 2008; McNiven and Thompson, 2006; Weinberg and Drubin, 2012).

Cómo se describió anteriormente, en el acercamiento de las vesículas a su membrana target para ser excitadas, está implicado, entre otros, el complejo exocisto. Datos anteriores publicados de nuestro laboratorio (Dupraz et al., 2009) indican que la

activación del complejo Exo70/ TC10 es necesario para la especificación axonal y para la expansión de membrana mediada por la exocitosis de PPVs. TC10 es una pequeña GTPasa perteneciente a la familia de las Rho GTPasas. Mientras que Exo70 es una de las 8 proteínas que conforman al complejo exocisto (sec 3, 5, 6, 8, 10, 15 Exo70, 84). Complejo requerido para la interacción de vesículas con la membrana plasmática en preparación a la fusión exocítica (Munson and Novick, 2006).

En cultivos primarios de neuronas de hipocampo, Exo70 se encuentra localizada selectivamente en la región distal del axón, sitio donde también se enriquecen los RIGF-1. Además, IGF-1 dispara la activación significativa de TC10 que resulta en una translocación de Exo70 en la membrana plasmática de la neurita en desarrollo; permitiendo la externalización de los RIGF-1 en neuronas no polarizadas; por lo que TC10 junto con el complejo exocisto pueden controlar la especificación axonal mediante la exocitosis polarizada de los RIGF-1. Este es un ciclo de retroalimentación positivo que puede amplificar rápidamente la expansión de membrana en respuesta al factor de crecimiento IGF-1 (Figura 5) (Dupraz et al., 2009).

Por otro lado, cómo se mencionó anteriormente, parte importante en la exocitosis de vesículas es la fusión de estas a la membrana plasmática. Proceso en el cual intervienen las proteínas SNARE. A este complejo proteico se lo vincula con procesos tales como la expansión de membrana en el crecimiento axonal *in vitro* (fenómeno en el que han sido implicadas las proteínas SNAP25, Sintaxina 1 y Vamp7), y la fusión de vesículas para la transmisión sináptica madura (Igarashi et al., 1997; Martínez-Arca et al., 2001; Osen-Sand et al., 1993; Osen-Sand et al., 1996).

Recientemente en nuestro grupo de investigación se han identificado en cultivos primarios de neuronas de hipocampo, 5 de estas proteínas –VAMP2, VAMP4, VAMP7, Sintaxin6 y SNAP23– con una expresión temprana previo a la polarización morfológica (Grassi, et al 2015). Por otro lado las SNARE VAMP4, Sintaxina6 y SNAP23 son requeridas para la inserción polarizada de los RIGF-1 además son esenciales para la regulación del crecimiento inicial del axón y el establecimiento de polaridad neuronal. Se observó, que la estimulación con IGF-1 dispara la asociación de

VAMP4, Sintaxina 6 y SNAP23 a PPVs que transporta los RIGF-1 (Fig. 5) (Grassi, et al 2015).

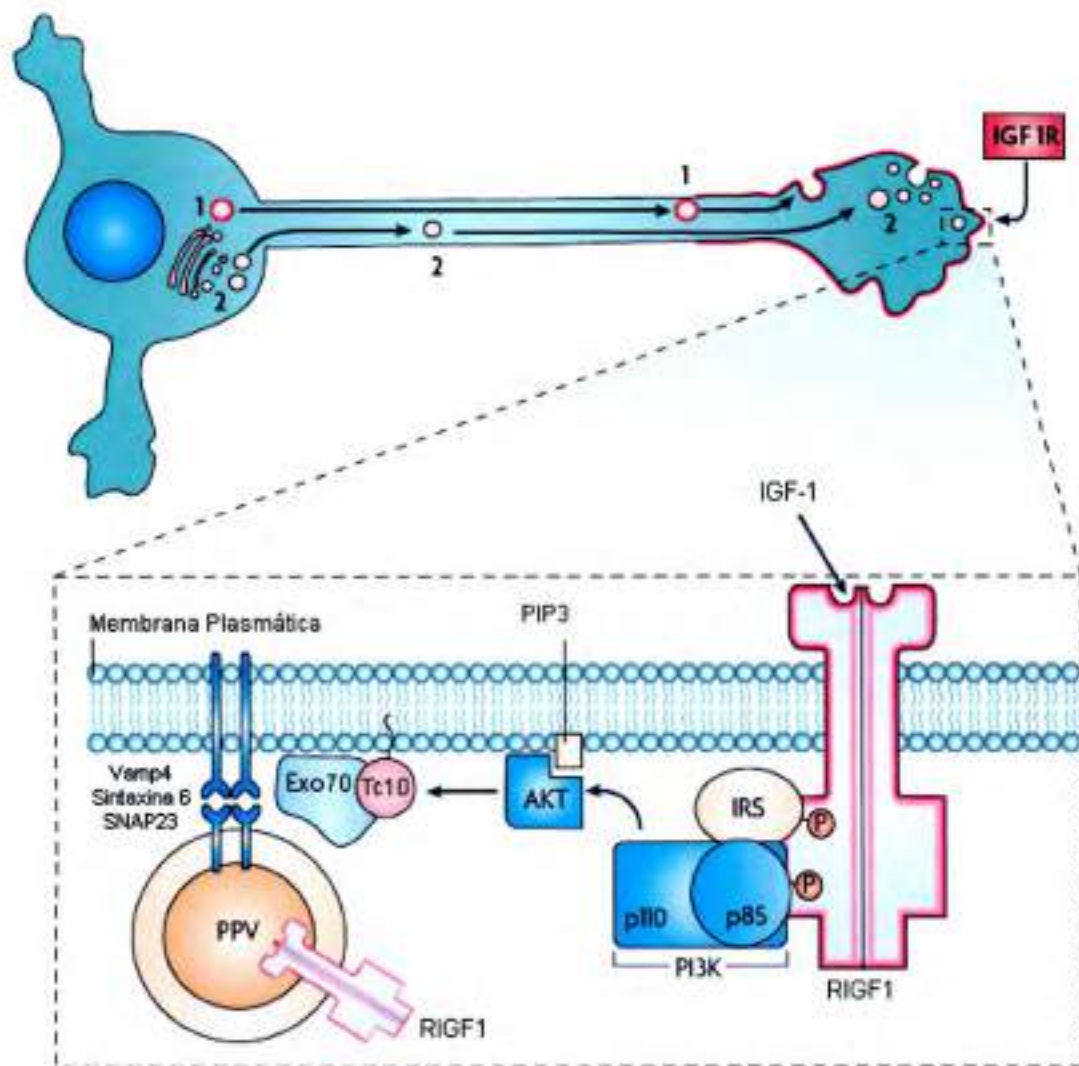


Figura 5: Esquema de la regulación en la expansión de membrana en el crecimiento axonal (modificado de Pfenninger et al 2009). Las vesículas que contienen RIGF1 son transportadas por el motor microtubular KIF2 (proceso 1). Además hay mecanismos de transporte de PPVs para la expansión de membrana independientes de ese motor (proceso 2). La activación de los RIGF-1 via IGF-1 activa la enzima PI3K que a su vez desencadena una serie de activaciones, ejemplificadas en el esquema, que culminan con la exocitosis de PPVs que contiene RIGF-1.

Cómo se explicó en la base teórica descrita anteriormente, existen 3 eventos bien estudiados de polaridad temprana en neuronas hipocámpales *in vitro* previo a la formación del axón. Los cuales incluyen a la inserción a la membrana de los RIGF-1 (al

ser insertados a la membrana exponen su sitio de interacción al ligando al espacio extracelular por lo que tienen la capacidad de poder ser activados desencadenando señales intracelulares que promueven la formación del axón), la acumulación de MTs estables y el transporte selectivo del motor microtubular KIF5C, estos fenómenos ocurren en su totalidad en una neurita en particular de neuronas en estadio 2 de desarrollo. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si estos tres eventos de polaridad molecular temprana acontecen en el mismo proceso menor ó si son fenómenos independientes o interdependientes.

Es a partir de esta observación que surge la necesidad de analizar si existe una conexión entre esos fenómenos y cuál es su implicancia en la formación temprana de un axón.

A continuación, en la sección de objetivos, se detallan los interrogantes que impulsaron el presente trabajo de tesis doctoral

OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

❖ Estudiar la correlación entre el enriquecimiento de los RIGF-1 (receptores de IGF-1) activos, el incremento de los MTs estables y el transporte selectivo de KIF5C en una neurita de células en estadio 2 en el fenómeno de polaridad neuronal.

2.2. Objetivos Especificos

❖ 2.2.1 Analizar la conexión, en el fenómeno de desarrollo axonal, entre la distribución polarizada de los receptores de IGF-1 fosforilados (pIGF-1R) y el enriquecimiento de los Microtúbulos (MTs) estables en una neurita de células en estadio 2.

❖ 2.2.2 Determinar si el motor microtubular KIF5C (que "camina" preferencialmente sobre microtúbulos estables) transporta algún cargo necesario para la inserción polarizada del IGF-1R.

RESULTADOS .PARTE I

Analizar la conexión, en el fenómeno de desarrollo axonal, entre la distribución polarizada de los receptores de IGF-1 fosforilados (pIGF-1R) y el enriquecimiento de los Microtúbulos (MTs) estables en una neurita de células en estadio 2.

3.1 Correlación entre el enriquecimiento de los RIGF-1 activos (pIGF-1R) y los Microtúbulos (MTs) estables en una neurita de células en estadio 2.

3.2 Procesos vinculados en el

establecimiento de polaridad neuronal:
estabilización microtubular y activación de PI3k-Cdc42-RIGF-1

3.3 Estudio de la alteración por Nocodazol en el funcionamiento intracelular.

3. Resultados Parte I

3.1. Correlación entre el enriquecimiento de los RIGF-1 activos (pIGF-1R) y los Microtúbulos (MTs) estables en una neurita de células en estadio 2

En la introducción, se describieron dos de los fenómenos más tempranos de polaridad neuronal, la segregación preferencial de RIGF-1 a un proceso menor de neuronas hipocampales en estadio 2 de desarrollo (Sosa et al., 2006) y la estabilidad incrementada de los MTs a lo largo del eje o "shaft" de una neurita previo a la formación del axón (Witte et al., 2008).

A partir de estas observaciones, se nos plantean los primeros interrogantes. ¿Por qué los RIGF-1 se insertan preferentemente en la membrana de una única neurita? ¿Este fenómeno tiene alguna relación con la acumulación de MTs estables en un proceso menor de neuronas en estadio 2?

Para lograr este objetivo, utilizamos el cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata (Banker and Goslin, 1988) como nuestro sistema modelo. Los MTs de las neuronas piramidales en cultivo, fueron parcialmente despolimerizados mediante el tratamiento con la droga desestabilizadora de MTs, Nocodazol (Hoebeker et al., 1976), y estabilizados con la droga Taxol (Schiff et al., 1979; Schiff and Horwitz, 1980). Tras el tratamiento con las drogas se evaluó mediante inmunofluorescencia la distribución de los RIGF-1 activos en los procesos neuríticos de neuronas en estadio 2, a través de la identificación de los residuos Tirocina fosforilados que presentan dichos receptores utilizando anticuerpos específicos para tal fin. Así, las neuronas cultivadas durante 12h "in vitro" (células no polarizadas), deprivadas de insulina entre 3 a 5h, fueron tratadas con 3 μ M Nocodazol durante 30 min a 37°C o con 3 nM de Taxol durante todo el tiempo de la deprivación de Insulina. Como control se cultivaron neuronas sin tratar a las cuales se les suministró el vehículo de las drogas utilizadas



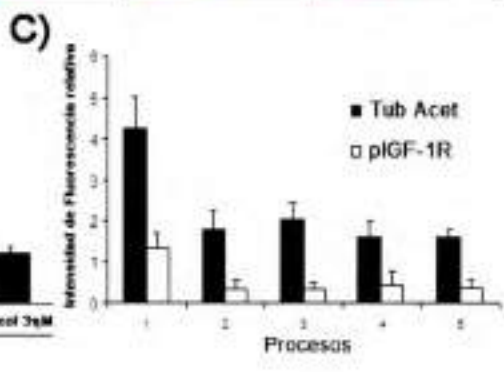
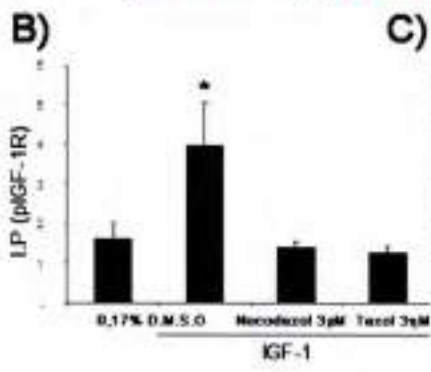
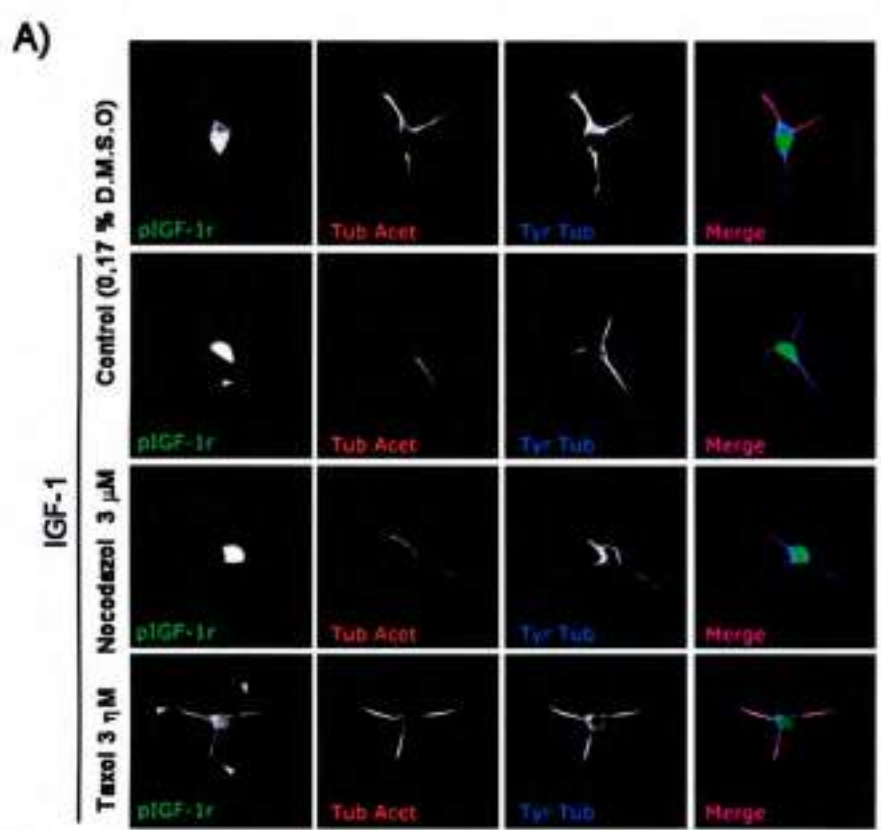
(0,17% D.M.S.O). Posterior a la privación de Insulina, las neuronas fueron sometidas a una estimulación por 5 min. con 20 nM del factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-1) e inmediatamente fijadas y permeabilizadas en simultáneo con el buffer PHEM (ver Materiales y Métodos).

La inmunomarcación con los anticuerpos contra la tubulina acetilada –marcador de microtúbulos estable– la tubulina tirosinada –marcador de microtúbulos dinámicos– y contra el IGF-1 activo fosforilado (pIGF-1R) , reveló que las células que fueron estimuladas por el factor de crecimiento IGF-1 presentaron una distribución enriquecida en una neurita de los pIGF-1R, sin embargo aquellas neuronas que además de la estimulación fueron incubadas con Nocodazol, pierden la disposición polarizada de los pIGF-1R en neuronas en estadio 2. En las neuronas cultivadas en presencia de Taxol y estimuladas con el factor de crecimiento IGF-1 presentaron un incremento, en la misma proporción, de los niveles de los pIGF-1R en todos los procesos menores mostrando una distribución atípica, no polarizada, para dicho receptor. Estas observaciones nos permitieron aseverar que la alteración en la estabilidad del citoesqueleto de microtúbulos perturba la inserción polarizada típica de los IGF-1 (Fig. 6 A).

A partir de las micrografías se calculó el Índice de Polaridad (IP) para los pIGF-1R (Dupraz et al., 2009), esta medición nos permitió evaluar la distribución de estos receptores activos en las neuronas en estadio 2, pudiendo identificar si se encuentran o no enriquecidos en un proceso menor determinado. Además se analizó de igual manera la distribución de la tubulina acetilada y de los pIGF-1R en cada proceso menor de células en estadio 2, mediante el análisis de la intensidad de fluorescencia relativa obtenida a partir del programa ImageJ en pixel/cm. Los IP, como es de esperar por lo mencionado anteriormente, arrojaron valores próximos a 1 ($1,42 \pm 0,25$) en los casos, control sin estimular, Taxol y Nocodazol, indicando una inserción inespecífica de los receptores de IGF-1 en las neuritas en desarrollo, mientras que las células control estimuladas presentaron un valor de $4 \pm 1,05$, representando un enriquecimiento en un proceso menor determinado en los pIGF-1R. Por otro lado, es interesante destacar, que la neurita con niveles incrementados de los receptores activables en membrana, es

coincidente con aquella que exhibe el enriquecimiento de MTs estables. Esto indica una significativa correlación entre ambos eventos (Fig. 6 B y C respectivamente).

El conjunto de resultados presentados hasta el momento, nos permitieron relacionar dos de los eventos tempranos de polaridad descritos al comienzo de este capítulo, identificando que cuando se modifica la estabilidad de los MTs de las neuritas en neuronas en estadio 2, los RIGF-1 cambian su distribución subcelular en membrana, estas observaciones sugieren que existe un vínculo entre estos fenómenos de polaridad, se requiere una acumulación previa de MTs estables en el shaft de una neurita para que se produzca el enriquecimiento de los RIGF-1 activos en membrana desencadenando finalmente, una cascada de señalización (RIGF-1/PI3k/Cdc42) que estimula la formación de un axón.





El solo incremento de la estabilidad microtubular no es suficiente para generar un axón, si requiere la activación de los RIGF-1

Fig. 6: El incremento en los microtúbulos estables en una neurita señala la inserción polarizada de los RIGF-1. A) Micrografía de triple fluorescencia. Donde se observa, a los RIGF-1 fosforilados (verde, columna izquierda), tubulina acetilada (rojo, segunda columna de izquierda a derecha), y la tubulina tiosinada (azul, tercera columna de izquierda a derecha). Las neuronas cultivadas *in vitro* por 12hs, fueron tratadas con Nocodazol o Taxol según se indica. B) Índice de Polaridad del RIGF-1 activos, (n=10 p<0.004 por test-t). C) Distribución en una misma células de la tubulina acetilada y los pIGF-1R, se observa que la acumulación de MTs estables ocurre en el mismo proceso que presenta mayor cantidad de receptores IGF-1 en superficie.

3.2. Procesos vinculados en el establecimiento de polaridad neuronal: estabilización microtubular y activación de PI3k-Cdc42-RIGF-1.

A partir de los resultados expuestos anteriormente, cabe preguntarse si la formación de uno o varios axones inducida por la estabilización de los MTs con Taxol es independiente de la activación de los RIGF-1.

Para resolver este interrogante, neuronas hipocampales fueron cultivadas por 36h en medios condicionados (baja insulina) y definidos (alta insulina), en presencia o ausencia de 3nM Taxol o 45 nM Nocodazol (ver Materiales y Métodos). Los resultados se muestran en la figura 7.

A partir de ensayos de inmunofluorescencia, neuronas marcadas con anticuerpos anti tubulina β III (marcador neuronal) y Tau 1 (marcador de procesos axonales) fueron cuantificadas, identificando los diferentes estadios de desarrollo *in vitro* (estadio 1, 2 o 3) mediante los marcadores utilizados y el análisis morfológico de las neuronas. Observamos que el cultivo de alta insulina ~75% de las células cultivadas por 36h alcanzan un estadio 3 Tau 1 positivas, mientras que las neuronas sometidas al tratamiento del Nocodazol solo un ~20% tienen la habilidad de desarrollar un axón, no obstante el incremento en la estabilidad de los MTs con Taxol, no sólo estimula un alto porcentaje de células en estadio 3 (~45%) sino que también se encontró una cantidad significativa de neuronas con múltiples axones (~30%), morfología observada también por (Witte et al., 2008) (Fig. 7A y C). Analizando las neuronas cultivadas en el medio condicionado de baja insulina, se puede notar que sólo aquellas células que están en presencia del factor de crecimiento IGF-1 son capaces de adquirir una morfología



polarizada (~80%), sin embargo este fenómeno no se observó con las células cultivadas en presencia de Taxol (~ 20% de células en estadio 3). Es interesante acentuar que, incluso incrementando la estabilidad de los MTs con Taxol (droga que promueve la formación de múltiples axones), si la vía de Cdc42/PI3k/RIGF-1 esta inactiva, la neurona no es capaz de desarrollar un fenotipo polarizado (Fig 7B y C).

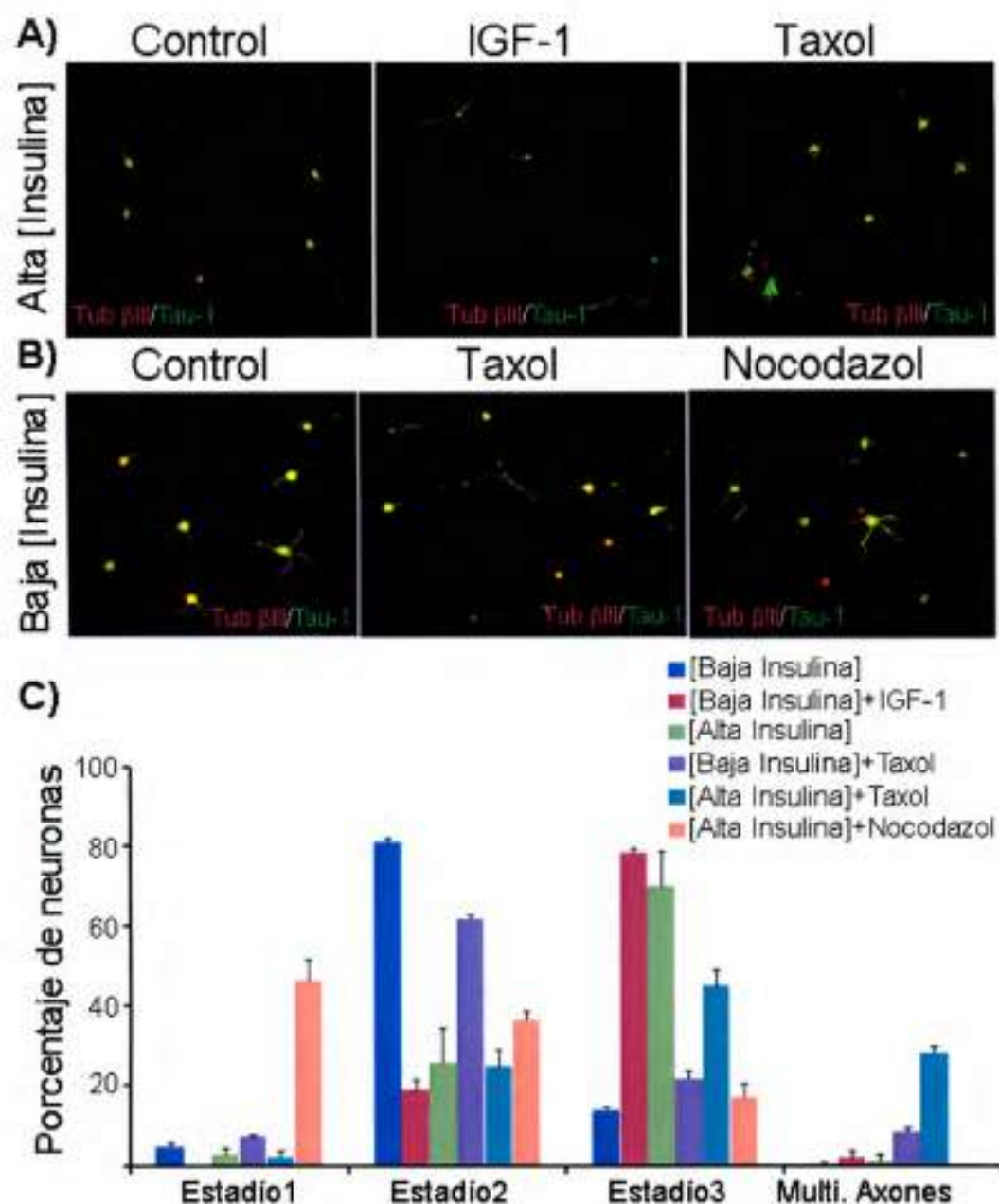




Fig. 7: La estabilización local de los MTs en una neurita sumado a la activación de la cascada de la PI3k-Cdc42 vía el RIGF1 son esenciales para la especificación axonal. A-B) Micrografía de doble fluorescencia. Donde se observa, a Tau 1 (verde), tubulina β III (rojo). Las neuronas cultivadas in vitro por 36hs en alta o baja insulina, fueron tratadas con Nocodazol o Taxol según se indica. C) Porcentaje de células en diferentes estadios de desarrollo. La sola acumulación de MTs estables en una neurita en estadio 2, no es suficiente para la formación de un axón. Es esencial la activación de la cascada PI3k-Cdc42-RIGF-1.

3.3 Estudio de la alteración por Nocodazol en el funcionamiento intracelular.

Los resultados detallados en la sección anterior demostraron que la desestabilización del citoesqueleto de tubulina con drogas como el Nocodazol en neuronas hipocampales in vitro impide el establecimiento de polaridad neuronal, además altera la localización subcelular de los pIGF-1r en neuronas en estadio 2 de desarrollo. A partir de estas observaciones nos planteamos si ¿La distribución aberrante de los pIGF-1r se debe a que la despolimerización del citoesqueleto de tubulina altera el transporte de los RIGF-1? Para responder este interrogante se realizó un cultivo primario de neuronas del hipocampo cultivadas por 12h y mediante inmunofluorescencia analizamos la localización subcelular de los RIGF-1 activos e inactivos. Realizamos la tinción de las células utilizando anticuerpos específicos contra la subunidad β de los receptores de IGF-1 enriquecidos en conos de crecimiento (β_{gr}) (Quiroga et al., 1995), anticuerpos contra tubulina acetilada (α -Tub) y tirosinada (t-Tub); estas micrografías, revelaron que dicho receptor se encuentra presente en todos los procesos menores de las neuronas hipocampales en estadio 2 de desarrollo tanto en la situación control (0,17% DMSO) como en aquellas células tratadas con Nocodazol o Taxol. Es decir, los RIGF-1 llegan normalmente a todas las neuritas independientemente de la alteración en la estabilidad de los MTs pudiendo sugerir que las vesículas positivas para los RIGF-1 son transportadas normalmente a todas las neuritas de células en estadio 2 (Fig. 8).

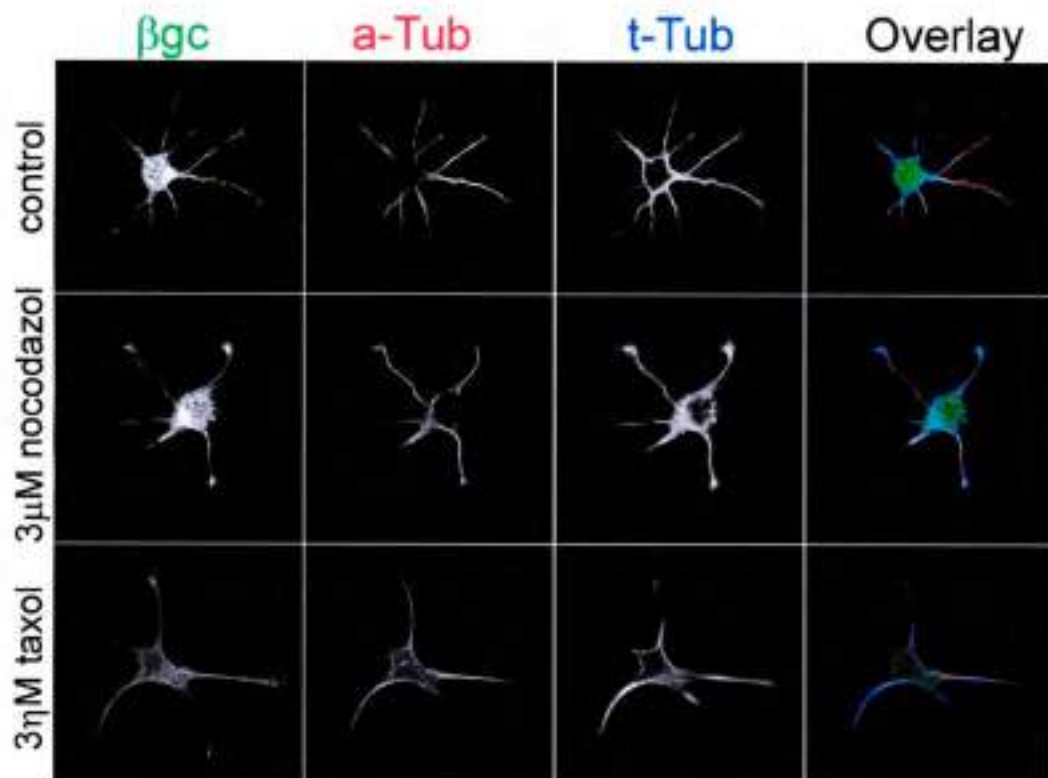
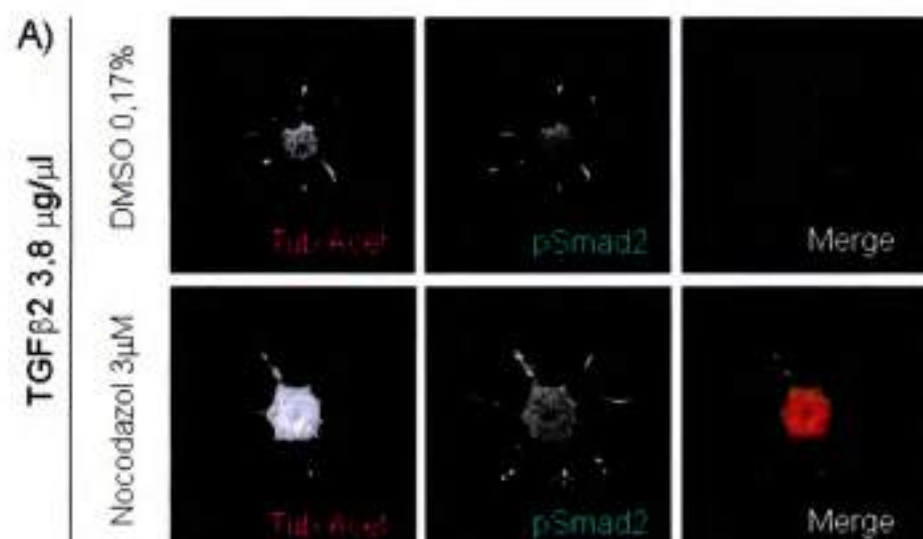


Fig. 8: Los RIGF-1 se transportan a todas las neuritas de neuronas hipocampales en estadio 2. A) Micrografía de triple fluorescencia; en verde vemos a los RIGF-1 (β gc), en rojo a la tubulina acetilada y en azul a la tubulina tirosinada. Se revela la presencia de RIGF-1 en todas las neuritas tanto en controles como en neuronas tratadas con Nocodazol o Taxol. La depolimerización parcial de los MTs por el Nocodazol y la mayor estabilidad inducida por el Taxol, no impiden la correcta distribución de los RIGF-1 en los procesos menores de células en estadio 2.

Por otra parte, las neuronas en cultivo tratadas Nocodazol son incapaces de desarrollar una morfología polarizada, un hipótesis para estos resultados fue que el tratamiento con la droga Nocodazol resultó muy agresivo impidiendo el desarrollo normal de una célula, para descartar esto se buscó evaluar el funcionamiento intracelular, en células cultivadas con dicha droga, mediante una vía de señalización implicada en la formación axonal. La vía de señalización seleccionada fue RTGF β II/pSmad2, ya que los RTGF β II (receptor del factor de crecimiento transformante II) se encuentran implicados en la especificación axonal tanto *in vitro* como *in vivo* (Yi et al., 2010) Sin embargo, los resultados expuestos en el trabajo Jason Yi 2010 se encuentran siendo revaluados en nuestro laboratorio.

Neuronas hipocampales cultivadas entre 12 a 16 h, con o sin el agregado de 3 μ M de Nocodazol, fueron estimuladas con el ligando TGF β II por 10min a 37°C y posteriormente fijadas. Dichas células fueron inmunomarcadas con anticuerpos contra la tubulina acetilada –marcador de MTs estables– y con anticuerpos contra la proteína activa (fosforilada) Smad2, efector secundario de la cascada de señalización del RTGF β II, con el objetivo de observar si dicha vía de señalización se encuentra activa en ambas condiciones experimentales.

A partir de las micrografías se observó que la proteína fosforilada Smad2 presenta la misma localización subcelular y que, los niveles de expresión no presentan una diferencia significativa entre las neuronas cultivadas con el vehículo de la droga (D.M.S.O 0,17%) o con Nocodazol, aun cuando los niveles de MTs estables (tubulina acetilada) disminuyen significativamente en las neuronas cultivadas en presencia de la droga. Por otro lado es importante destacar que las células no presentaron ninguna característica morfológica aberrante. Finalmente, estos ensayos nos permitieron observar que la vía del RTGF β II/pSmad2 se encuentra activa en células control o en aquellas tratadas con Nocodazol, indicando un correcto funcionamiento de las células cultivadas con dicha droga, pudiendo descartar de esta manera que el efecto morfológico observado (interrupción en la formación de un axón) en las neuronas hipocampales *in vitro* tratadas con dosis bajas del Nocodazol, no se debe a un mal funcionamiento celular a nivel global (Fig. 9 A y B).



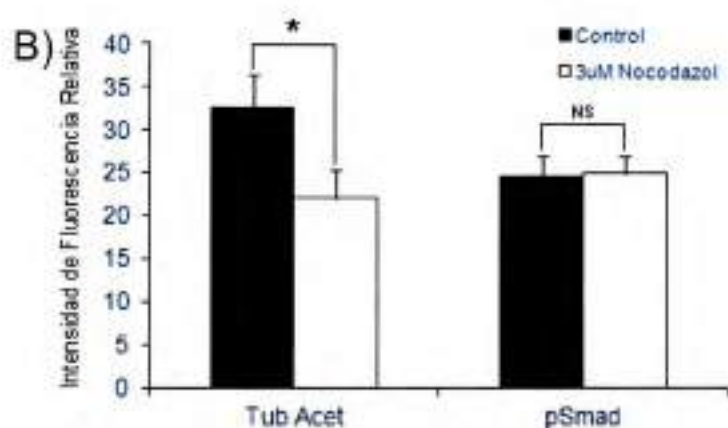


Fig. 9: La cascada de señalización RTGFBII/pSmad2 se encuentra activa en células tratadas con Nocodazol. A) Micrografía de doble fluorescencia donde se observa a pSmad2 (verde) y a la tubulina acetilada (Tub Acet-rojo). Las neuronas estimuladas en agudo con el ligando TGFβ2, presentan altos niveles de pSmad2 en todas las neuritas tanto en el control como en las células con Nocodazol. B) Comparación entre las unidades relativas de fluorescencia de la tubulina acetilada (Tub Acet) y pSmad2 en neuronas tratadas o no con nocodazol, se observó que la diferencia no es significativa.

DISCUSIÓN ·PARTE I

Analizar la conexión, en el fenómeno de desarrollo axonal, entre la distribución polarizada de los receptores de IGF-1 fosforilados (pIGF-1R) y el enriquecimiento de los Microtúbulos (MTs) estables en una neurita de células en estadio 2.

4.1 La reorganización del citoesqueleto de tubulina y la exocitosis de los RIGF-1 son procesos vinculados y esenciales para el establecimiento de polaridad neuronal.

4.1.1 Mecanismos de la polarización neuronal.

4.1.2 La estabilización de los MTs direcciona la exocitosis de los RIGF-1.

4. Discusión Parte I

El establecimiento de polaridad neuronal depende de la excitosis polarizada de los RIGF-1 en una neurita menor de neuronas hipocampales en estadio 2 (Sosa et al., 2006). Resultados de esta primera sección demostraron que esta distribución de los RIGF-1 en membrana, es señalizada por el enriquecimiento de microtúbulos estables en dicha neurita.

4.1 La reorganización del citoesqueleto de tubulina y la excitosis de los RIGF-1 son procesos vinculados y esenciales para el establecimiento de polaridad neuronal.

4.1.1 Mecanismos de la polarización neuronal

Estudios realizados en cultivos primarios de neuronas de hipocampo permitieron el estudio del proceso por el cual, una neurona no polarizada con varias neuritas morfológicamente equivalentes, adquiere su morfología típica altamente polarizada, pudiendo identificar varios procesos a nivel molecular que afectan la regulación del crecimiento inicial del axón y el establecimiento de la polaridad neuronal. Tal es el caso de la activación, en el cono de crecimiento del futuro axón, de la enzima PI3k causando una acumulación local del producto PIP3 (Laurino et al., 2005; Menager et al., 2004), a su vez esta activación desencadena una cascada de señalización que incluyen, entre otras, a la proteína la Cdc42 y al complejo Par3-Par6-aPKC (proteínas que juegan un rol crítico en la formación del axón) (ver esquema 1 pág. 64) (Schwamborn and Puschel, 2004).

PIP3: fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

Cdc42: pequeña GTP perteneciente a la familia Rho

Otro evento molecular es la acumulación de receptores del factor de crecimiento IGF-1 activables en el plasmalema de uno de los procesos menores (Sosa et al., 2006). La activación del RIGF-1 con su ligando, desencadenan una vía de señalización estimulando, cascada abajo, a la encima PI3k mediante sus subunidades p85 (subunidad reguladora) y p110 (subunidad catalítica). Como mencionamos anteriormente, esta vía de señalización resulta esencial para el establecimiento de polaridad neuronal. Además, el enriquecimiento de los RIGF-1 y PI3k en un proceso neurítico determinado de células en estadio 2, muestran los primeros indicios de polaridad en células que son morfológicamente no polarizadas (neuronas en estadio 2 de desarrollo).

Por otra parte, estudios en la temática también revelaron la importancia en el rearrreglo del citoesqueleto en la polaridad neuronal, dando a conocer que los conos de crecimiento altamente dinámicos, constituidos por MTs y filamentos de actina, deben atravesar diferentes etapas que implican fuertes rearrreglos esenciales en el citoesqueleto para permitir la elongación de un proceso menor. Estas son; la protrusión (derivada de la polimerización de filamentos de actina), el ensanchamiento (resultado de la polimerización de MTs y del transporte, dependiente de MTs, de organelas membranosas y vesículas) y finalmente la consolidación (despolimerización de los filamentos de actina)

Otra característica sustancial para el desarrollo normal de una neurona, es la organización del citoesqueleto. Por su parte, los MTs presentan una disposición particular en los diferentes compartimentos neuronales, en el axón el extremo + se posiciona en la región distal mientras que en las dendritas presentan una conformación mixta. Sin embargo, en una neurona en estadio 2, la orientación de los MTs en las neuritas menores es uniforme, con el extremo + en la zona distal el proceso. Estudios previos demostraron que la dinámica de los MTs en los axones es diferente de las dendritas. Los axones se caracterizan por tener MTs de una larga vida media ($t_{1/2} > 2h$) resistentes a la despolimerización con Nocodazol, es decir más estables. Estos MTs suelen presentar determinadas modificaciones post-traduccionales en la α -tubulina, como la detirosinación (tubulina Glu) y la acetilación. Estas modificaciones son el resultado, no la causa, de la estabilización de los MTs (Namba et al., 2015). Sin

embargo es importante destacar, que la región más distal de los axones es rica en tubulina tirosinada que hace que tengan MTs con una vida media corta ($t_{1/2} < 5 \text{ min}$) susceptibles a una rápida despolimerización con Nocodazol.

Existen evidencias sobre el rol de la estabilización de los MTs en el establecimiento de la polaridad neuronal. Estos estudios previos analizaron la distribución de los MTs dinámicos y estables en las neuritas menores de neuronas morfológicamente no polarizadas (estadio 2), encontrando que una neurita exhibe una relación significativamente alta de MTs estables sobre dinámicos comparada con las neuritas remanentes (Witte et al., 2008). Estos resultados sugieren que en células morfológicamente no polarizadas, la estabilización de MTs en un proceso menor, precede la formación del axón. Además también observaron que la estabilización de los MTs con drogas como el Taxol es suficiente para inducir la formación axones. Finalmente, los antecedentes en su conjunto sugieren que una neurona *in vitro* en estadio 2 para poder desarrollar una fibra axonal, requiere la acumulación de MTs estables (mayor proporción de tubulina acetilada) en el proceso menor especificado como axón, esta característica en la dinámica de los MTs es preservada en el axón.

4.1.2 La estabilización de los MTs direcciona la exocitosis de los RIGF-1

En los experimentos planteados en esta tesis pudimos relacionar el enriquecimiento de MTs estables en un proceso menor, con la acumulación en membrana de los RIGF-1 en una neurita de células en estadio 2 de desarrollo, dos de los eventos descritos de polaridad temprana en neuronas hipocampales. En las células en estadio 2 de desarrollo tratadas con drogas capaces de modificar la dinámica de los MTs (Taxol y Nocodazol) pudimos observar que el incremento en la estabilidad de los MTs o la despolimerización de los mismos cambiaba la distribución normal en membrana de los receptores de IGF-1; a su vez la neurita que presentaba mayores niveles de tubulina acetilada resulto ser el mismo proceso que acumula receptores IGF-1 activables en membrana. Estas observaciones sumadas a los conocimientos previos descritos en la introducción, permitieron sugerir que el incremento en la



estabilidad de los MTs en una neurita en particular, precede a la formación axonal y direcciona la exocitosis regulada de los RIGF-1 a dicho proceso.

El análisis del establecimiento de la polaridad neuronal en diferentes medios de cultivos (alta y baja concentración de insulina), con neuronas tratadas con las drogas Nocodazol o Taxol, nos permitió determinar la influencia de la reorganización del citoesqueleto y la implicancia de la vía de señalización PI3k/Cdc42/RIGF-1 en el desarrollo axonal y la polaridad neuronal; encontrando que células sometidas a la despolimerización con Nocodazol y en presencia de altos niveles de insulina no pueden desarrollar un axón mientras que el incremento en la estabilidad de los MTs inducida por el Taxol es capaz de generar múltiples fibras con características axonales. Así mismo, neuronas desarrolladas in vitro con niveles de insulina que no logran activar los RIGF-1 y tratadas con Taxol, permanecen arrestadas en una estadio 2 de desarrollo aún después de 48h de cultivo. Estos resultados son un fuerte indicio de que el incremento en la estabilidad de los MTs induce la formación axonal pero no sería suficiente para generar un axón si la vía de la PI3k/Cdc42/RIGF-1 se encuentra inactiva. Por lo tanto, la correcta activación de los RIGF-1 es esencial para el establecimiento de polaridad neuronal.

Por otro lado evaluamos los niveles de β gc en las neuritas de células tratadas o no, con Nocodazol. Antecedentes previos demostraron que la translocación dependiente de KIF2 de esta subunidad hacia los conos de crecimiento es una etapa importante para la posterior exocitosis de PPV regulada por IGF-1 permitiendo finalmente la expansión del plasmalema (Pfenninger et al., 2003). Por lo tanto, a partir de los resultados expuestos hasta el momento, la morfología no polarizada de neuronas tratadas con Nocodazol puede ser explicada por las siguientes hipótesis. Los RIGF-1 no son correctamente insertados a membrana lo que impide su activación y por ende tampoco se activa la cascada de señalización de PI3k imposibilitando la formación de un axón. Otras de las posibles causas, podría ser un problema en el transporte de dicho receptor, provocando una disminución del mismo en las neuritas en desarrollo. Finalmente los resultados que arrojaron los ensayos, claramente muestran que los RIGF-1 (marcados con el anticuerpo anti- β gc que reconoce a estos receptores independientemente de su estado de activación) se encuentran distribuidos en todos

β gc: subunidad β i RIGF-1 específica de conos de crecimiento

PPV: vesículas precursoras de plasmalema

los procesos menores de las neuronas en estadio 2 independientemente de la condición experimental (control o Nocodazol). Estos resultados abren la posibilidad de que los RIGF-1 tengan un impedimento en la inserción a membrana y no en su transporte.

Sin lugar a dudas la regulación en la dinámica del citoesqueleto es esencial para el establecimiento de la polaridad neuronal. Antecedentes previos demostraron que cambios en la dinámica de los microtúbulos dirigen la polarización neuronal y la estabilización de los microtúbulos precede la formación axonal (Witte et al., 2008). Sin embargo la actividad del factor de crecimiento IGF-1 adquiere un rol primordial en la formación de un axón (Sosa et al., 2006) y a partir de los resultados de la primera parte de este trabajo podemos decir que ambos eventos deben coexistir. En una neurona hipocampal en estadio 2, la estabilización de los MTs en una neurita direcciona hacia ese proceso menor, la exocitosis regulada de las vesículas precursoras de plasmalema que contienen los RIGF-1, a su vez la activación de los mismos y su cascada de señalización, desencadenan la formación de un axón.

RESULTADOS ·PARTE II

Determinar si el motor microtubular KIF5C (que "camina" preferencialmente sobre microtúbulos estables) transporta algún cargo necesario para la inserción polarizada del IGF-1R.

5.1 El motor KIF5C es necesario para el establecimiento de un axón.

5.2 KIF5C media la exocitosis polarizada de los IGF-1

5.3 La SNARE Sintaxina 6 (Sxt6) es transportada por el motor microtubular KIF5C.

5.4 Transporte selectivo de Sintaxina 6 en neuronas hipocámpales en estadio 2

5.1 El motor KIF5C es necesario para el establecimiento de un axón.

El motor KIF5C, en neuronas maduras, se encuentra localizado principalmente en axones mediando el transporte axonal rápido. Además tiene una preferencia para "caminar" selectivamente por una neurita en estadio 2, generando un transporte polarizado, dicho proceso se caracteriza por presentar una acumulación en MTs estables. Es por esto que se asume que esta proteína motora tiene una preferencia para "caminar" sobre MTs estabilizados. Así mismo, el dominio motor constitutivamente activo de KIF5C se acumula en la punta o "tip" de una neurita de neuronas no polarizadas, este proceso menor es el que se convertirá en el futuro axón (Jacobson et al., 2006). A partir de estos antecedentes se implicó al motor KIF5C en la especificación inicial del axón y la polaridad neuronal. En esta sección de resultados se plantea evaluar el rol que se le asigna al motor mencionado anteriormente. Para ello, en primera instancia, se realizaron experimentos de pérdida de función para esta proteína motora mediante el silenciamiento de la expresión génica, empleando los shRNAs (del inglés, *small hairping RNA*).

El silenciamiento de la expresión génica de KIF5C se llevó a cabo utilizando shRNAs insertados en plásmidos dicistrónicos (ver "Materiales y Métodos"). Éstos contienen 2 marcos de lectura abiertos, uno para insertar la secuencia específica que será procesada como shRNA y otro que contiene una secuencia que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) como marcador de transfección.

Como primer paso se seleccionaron y diseñaron secuencias de oligonucleótidos específicas, las cuales fueron insertadas dentro de los vectores descritos recientemente. Se produjeron 2 shRNA y 1 ssRNA control (Secuencia Scrambled) la

cual no es complementaria (y por ende no silencia) a ningún gen de rata. Los ssRNAs sirven para evaluar los efectos del tratamiento de transfección utilizado.

Posteriormente se analizó la eficiencia de los shRNA diseñados evaluando los niveles de expresión de la proteína en las células tras la transfección con los plásmidos shRNA o ssRNA. Dado que el método elegido en este estudio para expresar secuencias de DNA es la transfección (ver "Materiales y métodos") la validación de los shRNAs realizados por métodos de biología molecular, debió efectuarse utilizando líneas celulares derivadas de rata, específicamente la línea celular de glioma de cerebro de rata C6. Esto obedece al bajo nivel de transfección que poseen los cultivos primarios neuronales, lo cual impide detectar diferencias en la expresión proteica como resultado del silenciamiento génico. Por su mayor eficiencia de transfección, las líneas celulares permiten salvar este obstáculo.

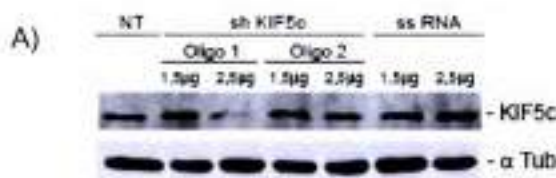
Se transfectó células de la línea C6 con los shRNAs diseñados, las células se cultivaron por un periodo de 24-30 horas permitiendo la correcta expresión de los constructos, finalmente se procesó las células con el buffer RIPA y se lisaron por sonicación para ser analizadas en última instancia por Western Blot, se evaluó los niveles del motor KIF5C mediante el uso de anticuerpos específicos. Realizamos un análisis cualitativo de los Blot observándose que la transfección con la secuencia ssRNA no alteró la expresión del motor analizado, mientras que los efectos de los dos shRNAs fueron variables, el oligonucleótido 1 es más eficiente en el proceso de silenciamiento que el oligonucleótido 2. A partir de estas observaciones se seleccionó el shRNA número 1, y se utilizó en los experimentos posteriores (Fig. 10 A).

El siguiente paso fue transfectar los shRNAs validados en cultivos primarios de neuronas de hipocampo y estudiar la morfología de aquellas neuronas que incorporaron dichos shRNAs. La metodología utilizada para la incorporación del DNA fue la transfección en suspensión con el objetivo de incorporar el plásmido a tiempo cero de cultivo, previo al plaqueo celular, además de aumentar la tasa de transfección (ver Materiales y Métodos).

Las neuronas transfectadas fueron cultivadas a las 40h de cultivo, fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos dirigidos contra la proteína KIF5C para evidenciar la disminución en la expresión proteica. A partir de estas micrografías se pueden analizar

que aquellas neuronas transfectadas con el shRNA presentaron una notable disminución en la expresión de la proteína KIF5C, esta disminución se hace evidente al compararlas con las células transfectadas con el control ssRNA, que exhiben una mayor expresión de KIF5C en toda la célula, observándose la distribución axonal típica para dicho motor (Fig. 10 B). De estos ensayos surgió una evidencia morfológica sustancial. La neurona transfectada con el shRNA KIF5C no presentó un axón discernible como es el caso de las células transfectadas con el ssRNA, considerando que estas neuronas fueron cultivadas por ~40h se espera normalmente un alto porcentaje de neuronas polarizadas en estadio 3-4. Por lo tanto, estos resultados nos aportan evidencias que involucran al motor microtubular KIF5C con el establecimiento axonal en neuronas piramidales de hipocampo.

Seguidamente se procedió a analizar si la falta de polarización, o diferenciación axonal, en aquellas neuronas que expresaron el shRNA se debía específicamente a la ausencia de KIF5C y no era resultado de efectos inespecíficos (*Off Target*) derivados del silenciamiento génico. Para ello se llevaron a cabo experimentos de recuperación de fenotipo en los cuales se realizó una co-transfección con el shKIF5C y una construcción llamada KIF5C-RFP que codifica para la proteína KIF5C de ratón (full length) fusionada a la proteína fluorescente roja. En las neuronas co-transfectadas la expresión de la proteína KIF5C-RFP fue suficiente para revertir la falta de polarización inducida por la expresión del shRNA. De hecho, estas neuronas co-transfectadas fueron capaces de polarizar, generando un proceso axonal discernible (Fig. 10 B).



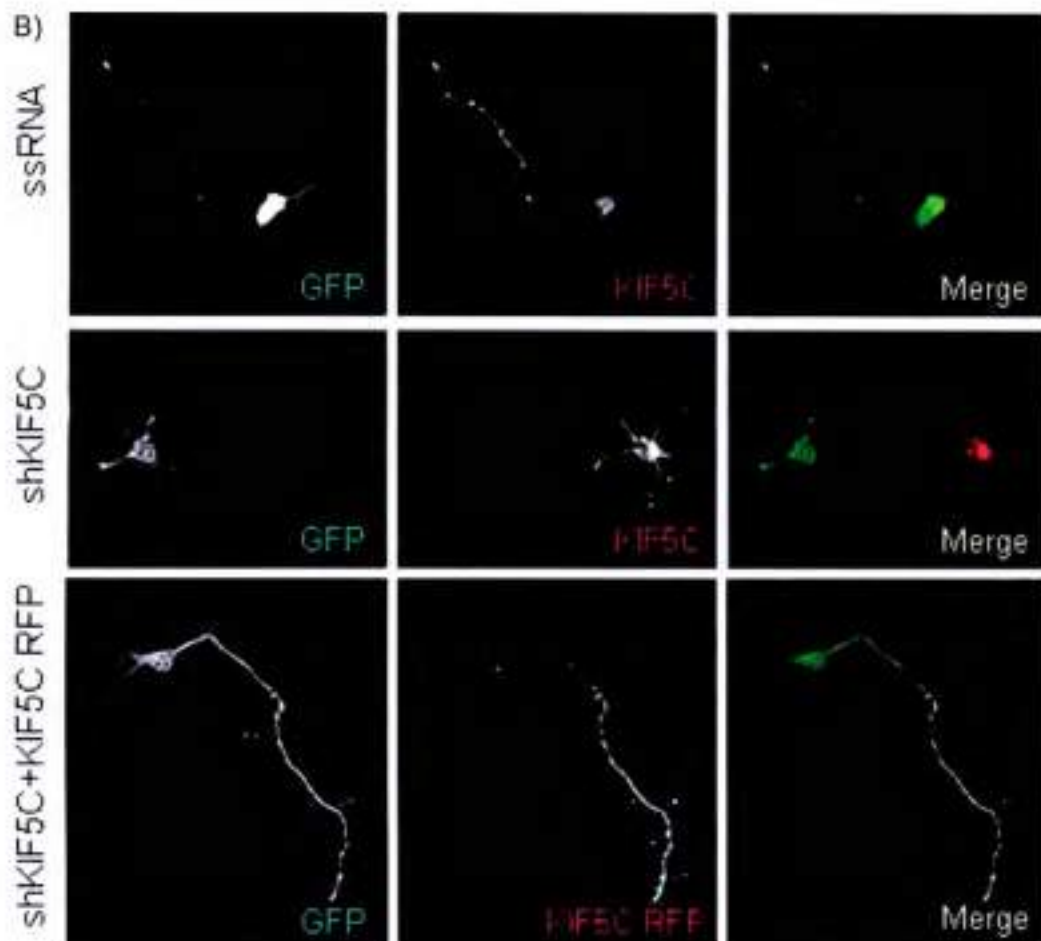


Fig. 10: KIF5C es necesaria para el establecimiento de un axón en neuronas piramidales de hipocampo. A) Western Blot de células C6 –cosechadas a las 24hs– no transfectadas (NT) y transfectadas con las secuencias ssRNA y shKIF5C. Mediante el uso de anticuerpos específicos para la proteína KIF5C, se pudo observar una disminución en los niveles de esta proteína en aquellas células tratadas con 2.5 μ g del oligonucleótido 1 B) Ensayos de pérdida de función y rescate fenotípico en neuronas de hipocampo en cultivo. Neuronas piramidales de hipocampo de ratas E18 fueron transfectadas a tiempo cero de cultivo con una secuencia sin sentido (ssRNA) como control (panel superior), con un shRNA secuencia específico dirigido contra KIF5C (panel central) o con el shRNA en conjunto con la construcción KIF5C RFP. La imagen muestra en verde la fluorescencia de la proteína GFP de las construcciones transfectadas, a la proteína KIF5C en rojo (paneles superior y central), y al RFP del plásmido KIF5C RFP co-transfectado en el panel inferior. Nótese que las neuronas expresando shKIF5C (GFP) tienen niveles bajos de la proteína endógena y no desarrollaron axones, a diferencia de las neuronas control (ssRNA), o de las neuronas cotransfectadas con el shRNAs y el motor full length donde sí hubo desarrollo de axones normales.

Estos experimentos fueron cuantificados, analizando después de 40 h de cultivo en que estadios de desarrollo se encontraban las células transfectadas, ya sea con la secuencia scrambled o el shRNA. El resultado de esta cuantificación mostró que menos

de un 30% de las neuronas transfectadas con el shKIF5C son capaces de generar un axón y que un 60% de las células quedan arrestadas en un estadio no polarizado (estadio 2). En contraste, se encontró que, el 70% de las neuronas transfectadas con el ssRNA presentaban un axón discernible. Quedando arrestadas en un estadio 2 solo alrededor del 20% (Fig. 10 C). Estos datos en conjunto nos permiten postular que el motor microtubular KIF5C estaría involucrado con el establecimiento de polaridad neuronal.

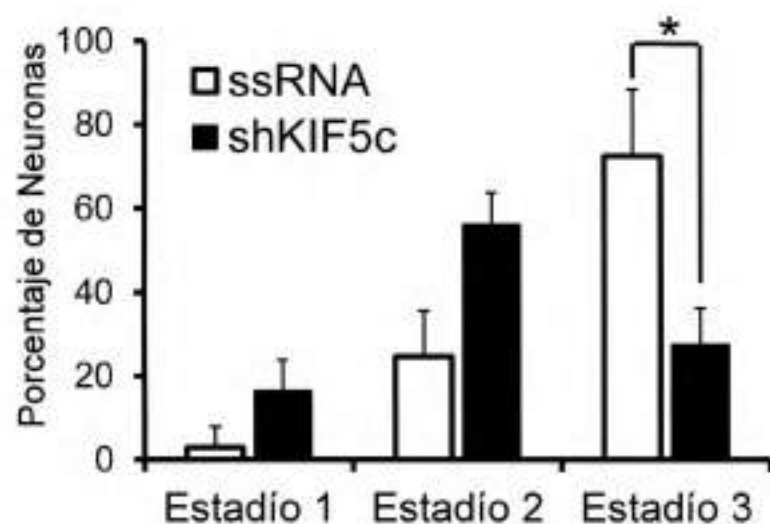


Fig. 10 C: El silenciamiento del motor KIF5C impide el establecimiento de polaridad neuronal. Cuantificación de ensayos de pérdida y recuperación de función. Se muestran los porcentajes (\pm SD) de neuronas transfectadas con ssRNA (control) y las transfectadas con shKIF5C en estadios específicos de diferenciación, después de 40 horas en cultivo *in vitro*. Un porcentaje significativo de las células transfectadas con shKIF5C quedaron arrestadas en estadio 2 de diferenciación. En contraste, la mayoría de las neuronas transfectadas con ssRNA exhibieron un axón (estadio 3 de diferenciación). *N*= 3 experimentos independientes.

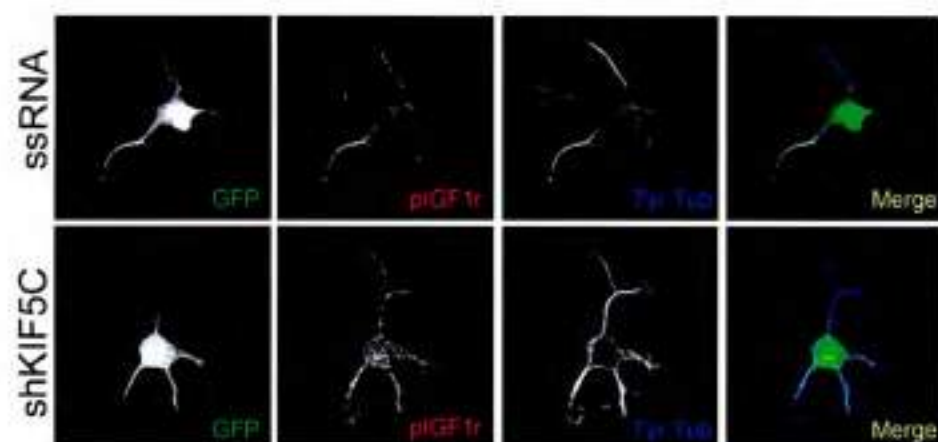
5.2 KIF5C media la exocitosis polarizada de los RIGF-1

Uno de los interrogantes que generaron estos resultados es: ¿La disminución en la proteína KIF5C por el silenciamiento con shRNA, afecta en alguna medida a la vía de señalización del RIGF-1/PI3k/Cdc42, cascada esencial para el establecimiento de polaridad neuronal? Con el objetivo de responder este interrogante, analizamos la distribución subcelular de los pIGF-1R (receptores de IGF-1 fosforilados o activos) en neuronas del hipocampo *in vitro* en estadio 2 posterior al silenciamiento génico para

el motor KIF5C. Específicamente, las neuronas fueron transfectadas a tiempo cero de cultivo (transfección en suspensión) con las secuencias shRNA o ssRNA, a las 12h de cultivo se realizó una estimulación con el ligando IGF-1 posterior a la privación de factores tróficos a la que se somete a las células por un tiempo aproximado de 5h. Después de 5 min de estimulación, las células se fijaron y se realizó una doble inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra los RIGF-1 activos y tubulina tiosinada.

Antecedentes previos de nuestro laboratorio demostraron que existe un enriquecimiento significativo de los pIGF-1R en la membrana de una neurita determinada en células morfológicamente no polarizadas (Sosa et al., 2006). Sin embargo, la disminución en la expresión de KIF5C en etapas tempranas del desarrollo neuronal altera la localización polarizada en membrana de los RIGF-1 fosforilados, la cual es normal en las neuronas transfectadas con ssRNA (Fig 11). Las micrografías fueron cuantificadas analizando la intensidad relativa de fluorescencia en pixel/cm en las distintas neuritas y a partir de estos datos se calculó el índice de polaridad (IP, ver Materiales y Métodos), se puede observar una diferencia significativa en el IP entre los controles (ssRNA) y las células silenciadas para KIF5C.

Estos resultados sugieren una correlación entre la actividad del motor axonal KIF5C con el fenómeno de exocitosis regulada y polarizada de las vesículas que transportan a los RIGF-1 en neuronas en estadio 2. Los experimentos que se describen a continuación fueron diseñados para estudiar si existe una relación causal entre estos fenómenos tempranos de polaridad.



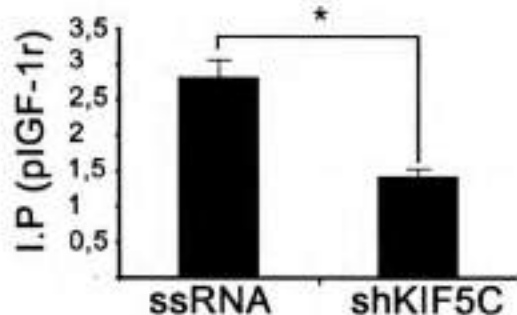


Fig. 11: El silenciamiento de KIF5C con el uso de shRNA altera la distribución polarizada de lo pIGF-1R. A) Inmunofluorescencia de neuronas en estadio 2 transfectadas (shKIF5C GFP o ssRNA GFP) teñidas con un anticuerpo contra los RIGF-1 fosforilados (pIGF-1 en rojo) y contra la tubulina tirosinada (Tyr Tub en azul). Se apreció la distribución subcelular típica de los receptores de IGF-1 activos en la situación control, y la pérdida de polaridad para el caso shKIF5C. B) Cuantificación del Índice de Polaridad para los pIGF-1R donde se muestra la diferencia significativa al comparar ambos casos (Test 't' $n=3$ $p \leq 0,0005$).

5.3 La SNARE Sintaxina 6 (Sxt6) es transportada por el motor microtubular KIF5C.

Los resultados descriptos en la sección anterior sugirieron que el arresto en estadio 2 observado en neuronas hipocampales en cultivos que no expresan KIF5C, puede deberse a la falta de transporte de alguna(s) proteína(s) necesarias para la inserción polarizada de los receptores de IGF-1. Por lo tanto mediante ensayos de inmunoprecipitación se analizó la presencia de una serie de proteínas tales como; proteínas del complejo exocisto (sec8, sec5, Exo70), proteínas SNARE (VAMP4, SNAP23, Sxt6) y el RIGF-1 en vesículas transportadas por KIF5C. Todas estas proteínas, como se detalló en la introducción, están relacionadas con la formación de un axón.

Se obtuvieron microsomas a partir de membranas de cerebros de 18 días de gestación (ver Materiales y Métodos). Y se realizó una inmunoprecipitación de vesículas utilizando el anticuerpo anti-KIF5C o ningún anticuerpo primario en los controles. Posteriormente se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se revelaron las membranas con los diferentes anticuerpos seleccionados. Los resultados se muestran en la Fig. 12, y demuestran que las SNAREs Sxt6 y VAMP4 se encuentran en la fracción

Inmunoprecipitada. Es importante notar que en la columna control podemos descartar posibles precipitaciones inespecíficas.

Estos resultados sugieren que la proteína KIF5C podría ser el motor microtubular encargado del transporte de vesículas conteniendo a las proteínas Sxt6 y/o VAMP4 hacia el (futuro) axón. Ambas proteínas han sido vinculadas con el complejo SNARE encargado del anclaje de vesículas que transportan a los RIGF-1 (Grassi, et al 2015), es decir, son proteínas que median la exocitosis regulada de estos receptores esenciales en la polaridad neuronal.

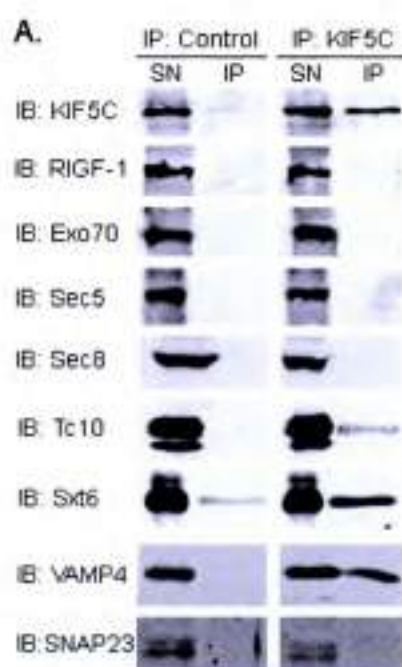


Fig. 12: Sintaxina 6 y Vamp4 como proteínas cargas del motor KIF5C. Inmunoprecipitados de microsomas obtenidos de cerebros de 18 días de gestación. En primer instancia se realiza un control positivo de precipitación revelando contra el motor utilizado para la precipitación (fila superior). Las filas restantes muestran el conjunto de proteínas seleccionadas en búsqueda de posibles cargos. Observándose claramente que tanto las proteínas Sxt6 y Vamp4 co-precipitan con el motor en estudio.

En consecuencia, a partir de los posibles cargos que arrojaron estos ensayos, buscamos nuevas evidencias que nos permitieran reforzar los mismos. La estrategia experimental utilizada en este caso, fue una separación de poblaciones vesiculares

(Peretti et al., 2000) para identificar una posible correlación entre las vesículas que transportan a la SNAREs Sxt6 o la VAMP4 y el motor microtubular KIF5C. El ensayo utilizado en este caso consistió en la centrifugación isopícnica de gradientes continuos de sucrosa de dos rangos de concentración diferente, 0,3-1,6M y 1-2M recolectando finalmente 12 fracciones por gradiente (ver Materiales y Métodos). Las vesículas por lo tanto fueron separadas de acuerdo a su densidad de flotación. Posteriormente se realizó un Western Blot, se identificaron las distintas poblaciones vesiculares con el uso de anticuerpos específicos contra KIF5C, VAMP4, Sxt6 y SNAP23, los resultados se muestran en la Fig. 13a y b.

Pudimos analizar que la población vesicular enriquecida en las proteínas Sxt6 como VAMP4, se encuentran en las fracciones intermedias del gradiente 0,3-1,6M, esto es coincidente con la localización en el gradiente de la enzima KIF5C, sin embargo es importante destacar que la correlación es más importante para las proteínas Sxt6 y KIF5C, ya que VAMP4 se encuentra enriquecida en fracciones más densas; SNAP23 fue utilizado como un control de una proteína que no co-precipitó con el motor KIF5C y como puede observarse la población vesicular que corresponde a SNAP23 se encuentra enriquecida en fracciones más densas a diferencia del motor KIF5C (Fig 13a). La correlación de las poblaciones vesiculares de Sxt6 y VAMP4 se repitió en el gradiente 1-2M aunque esta separación hace menos evidente este resultado, especialmente para VAMP4. En el gradiente de la Fig. 13b, las fracciones purificadas corresponden a poblaciones de vesículas más densas, y el resultado indicaría que hay más de una población de vesículas que contienen VAMP4 y algunas de ellas no colocalizan con KIF5C en los gradientes, por su lado la población vesicular positiva para SNAP23 siguió el mismo comportamiento descrito para el otro gradiente.

Tomados en conjunto, los datos obtenidos de este experimento y de ensayos anteriores, permitieron vincular al motor KIF5C en la misma población vesicular que Sxt6 y parcialmente VAMP4, por su parte las inmunoprecipitaciones revelaron una posible interacción con estas SNARE. Por lo tanto proponemos a las SNARE Sxt6 y VAMP4 como posibles cargos del motor anterógrado KIF5C.

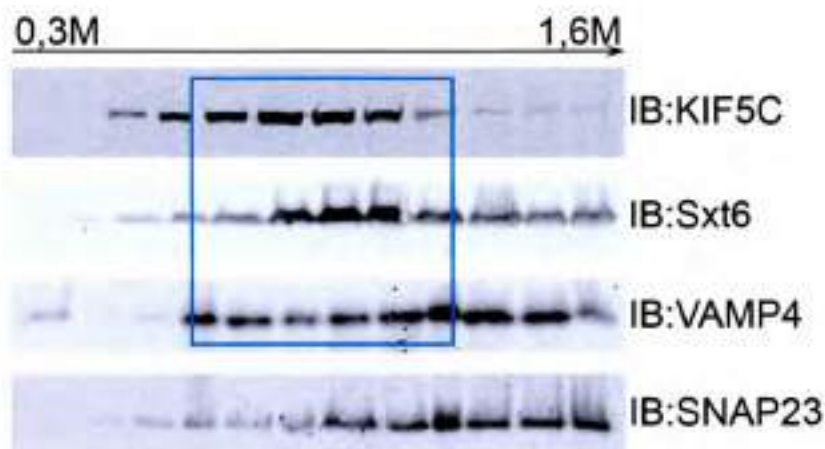


Fig. 13a: Sintaxina 6, VAMP4 y KIF5C se encuentra en la misma población vesicular. Gradientes continuos de sucrosa permiten una separación vesicular de acuerdo a su densidad de flotación. Como puede observarse en los blots, las fracciones 6 y 7 están enriquecidas en la proteína motora KIF5C como así también en Sxt6 y VAMP4, indicando que estas proteínas podrían pertenecer a la misma población vesicular. No es el caso para la SNARE SNAP23.

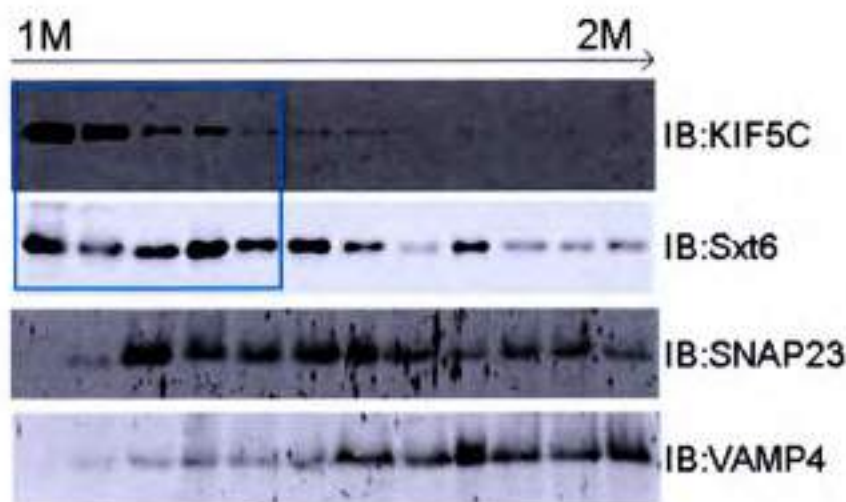


Fig. 13b: Sintaxina 6 y KIF5C se encuentran en la misma población vesicular. Gradientes continuos de sucrosa permiten una separación de vesículas de acuerdo a su densidad de flotación. Como puede observarse en los blots, las fracciones 1-4 están enriquecidas en la proteína motora KIF5C como así también en Sxt6 sin embargo en este caso VAMP4 no se encuentra enriquecidas en las mismas fracciones al igual que SNAP23.



Con el objetivo de generar nuevas evidencias sobre el transporte de las SNAREs Sxt6 y/o VAMP4 mediado por KIF5C, se planteó el siguiente diseño experimental. Cultivos primarios de neuronas hipocampales fueron transfectados a las 16h de cultivo (en este tiempo las neuronas hipocampales *in vitro* se encuentran entre los estadios 2 y 3 de desarrollo) con el shKIF5C o el plásmido control conteniendo ssRNA. Posteriormente, las células fueron fijadas a las 24h de transfección (40h de cultivo primario). Finalmente se realizó una doble inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos contra la proteína syntaxina 6 (Sxt6) o VAMP4 y la tubulina acetilada (a-Tub). Nuestro propósito fue el estudio de la localización subcelular de estas SNAREs tras el silenciamiento génico del motor KIF5C, proteína que por ensayos mostrados anteriormente podría estar implicada en el transporte de estas proteínas.

Por antecedentes previos se conoce que la localización subcelular de la SNARE Sxt6 en neuronas hipocampales *in vitro*, es preferencialmente axonal (en ocasiones se observa también una localización perinuclear) (Grassi et al., 2015). En el caso de las neuronas transfectadas con el plásmido ssRNA, Sxt6 se encontró enriquecida a lo largo de todo el proceso axonal, distribución típica para esta SNARE. Mientras que en las células transfectadas con el shKIF5C, se visualizó una marcada disminución en los niveles de Sxt6, principalmente en el tercio distal del axón, por lo tanto la menor disponibilidad del motor microtubular KIF5C tras el silenciamiento génico con shRNA disminuyó el transporte de vesículas positivas para Sxt6, alterando la distribución axonal de esta proteína (Fig. 14). Esta alteración atípica nos permitió encontrar un link directo entre estas dos proteínas, estableciendo al motor anterógrado KIF5C, como uno de los posibles motores vinculados en el transporte (especialmente hacia el axón) de las vesículas cargadas con la SNARE Sxt6.

La situación para la proteína VAMP4 fue diferente en comparación con Sxt6. En este caso no se observó ninguna diferencia significativa en la localización subcelular de VAMP4 en las neuronas transfectadas con los vectores ssRNA o shKIF5C, esta SNARE se localiza en la región perinuclear y el axón de neuronas del hipocampo *in vitro*.

Analizando el conjunto de evidencias presentadas en esta sección de resultados pudimos visualizar que VAMP4 co-inmunoprecipitó con KIF5C (datos mostrados en la Figura 12), sin embargo esta SNARE está presente en una población vesicular

heterogénea (datos mostrados en la Fig 13a y b), lo que implica que su transporte pueda ser mediado por más de un motor. Esta es, para nosotros, una posible explicación de lo que observamos en los resultados expuestos en la figura 14. Es decir que, podría existir un efecto compensatorio de otros motores microtubulares en el transporte de la SNARE VAMP4 cuando se encuentra silenciada la proteína KIF5C.



Fig. 14: El silenciamiento de KIF5C altera la localización axonal de Sxt6. Neuronas hipocámpicas transfecadas con los constructos shKIF5C (segunda y cuarta fila) o ssRNA (primera y tercera fila), inmunoteñidas con anti Sxt6 o VAMP4 (rojo) y anti tubulina acetilada (azul). Tanto para Sxt6 como VAMP4, las neuronas transfecadas con el ssRNA muestran una distribución axonal típica, mientras que las neuronas transfecadas con el shKIF5C presentan una marcada disminución de los niveles de Sxt6, principalmente, en la región distal del axón. Sin embargo, para el caso de VAMP4 no se observó cambios en la localización subcelular en ninguna de las condiciones de transfección utilizadas.



5.4 Transporte selectivo de Sintaxina 6 en neuronas hipocampales en estadio 2

La SNARE Sxt6 participa en la exocitosis polarizada de las vesículas que contienen a los RIGF-1, fenómeno esencial para el establecimiento de polaridad neuronal (Grassi, et al 2015); resultados de esta tesis doctoral demostraron que esta SNARE es transportada por el motor microtubular KIF5C, motor fundamental para la formación de un axón en neuronas del hipocampo *in vitro*. Con el objetivo de completar estos resultados se plantearon ensayos *in vivo* de neuronas piramidales de hipocampo co-transfectadas con los constructos Sxt6 GFP y KIF5C⁵⁶⁰ TdT (motor truncado constitutivamente activo, ver Materiales y Métodos). En este caso puntual, las neuronas fueron transfectadas mediante electroporación (ver Materiales y Métodos) y a las 12h de cultivo (estadio 2 de desarrollo) se comenzó con la toma de imágenes en un microscopio Spinning disk LIFA Leica DMI6000B (Petersen et al., 2014). Las secuencias de imágenes fueron sacadas, en la mayoría de los casos, con un intervalo de 100 ms. El objetivo fue analizar el transporte de las vesículas marcadas con GFP correspondientes a la proteína Sxt6. Para ello, en primera instancia se seleccionó neuronas hipocampales en estadio 2 de desarrollo que presentaron un enriquecimiento del motor truncado KIF5C⁵⁶⁰ en una neurita menor. Antecedentes previos demostraron que el proceso menor que acumula el motor truncado en la punta de una neurita en neuronas en estadio 2, es el proceso que dará origen al futuro axón (Jacobson et al., 2006; Petersen et al., 2014), es por ello que el constructo KIF5C⁵⁶⁰ es de gran utilidad ya que nos permite detectar al futuro axón previo a una polarización morfológica. Luego se realizó "time lapse" video-microscopía de la Sxt6 GFP (Fig 15) o de la proteína TfR GFP (Fig. 16). Este último es un constructo que sobreexpresa al receptor de Transferrina, una proteína dendrítica que se transporta preferencialmente hacia procesos menores que no concentran al motor truncado KIF5C⁵⁶⁰ (Petersen et al., 2014). El transporte selectivo de vesículas dendríticas en células morfológicamente no polarizadas es evidente varios días antes del ensamblaje del segmento inicial del axón (IAS), antes de la aparición de la malla de actina en el IAS y antes de que las dendritas

IAS: segmento inicial del axón. Región implicada en la generación de las potenciales de acción necesarios para la transmisión de información entre neuronas

adquieren la orientación mixta en la polaridad de los microtúbulos. Es por estas características que se emplea a dicha proteína como un control que no es transportado específicamente al futuro axón. El análisis del transporte vesicular se realizó mediante la utilización de "Kymographs" (ver Materiales y Métodos). Estos gráficos se presentan en Fig. 15 y 16 B representando el movimiento vesicular anterógrado y retrogrado de cada proceso menor (se enumeró cada neurita para su identificación). En la figura 15 se observó, que el proceso con una acumulación significativa del motor truncado (proceso que se convertirá en el futuro axón) es el que presenta un mayor número de vesículas positivas para Sxt6 que son direccionadas tanto de manera anterógrada como retrógrada. Es el objetivo de esta tesis el análisis del transporte que depende particularmente de KIF5C, es por ello que se analizaron exclusivamente los movimientos anterógrados. Para ello, como se mencionó anteriormente, se utilizaron los gráficos de "Kymograph", en este tipo de gráfica las líneas con pendiente positiva son las que representan el movimiento de una vesícula desde el soma hacia el cono de crecimiento. Por lo tanto se cuantificó cada una de estas líneas en todos los procesos (ver gráfico Fig 17). Este procedimiento se repitió para el receptor de transferrina (Fig 16). En este caso las vesículas conteniendo receptores de transferrina, presentaron un direccionamiento preferentemente hacia neuritas que no acumularon el motor constitutivamente activo.

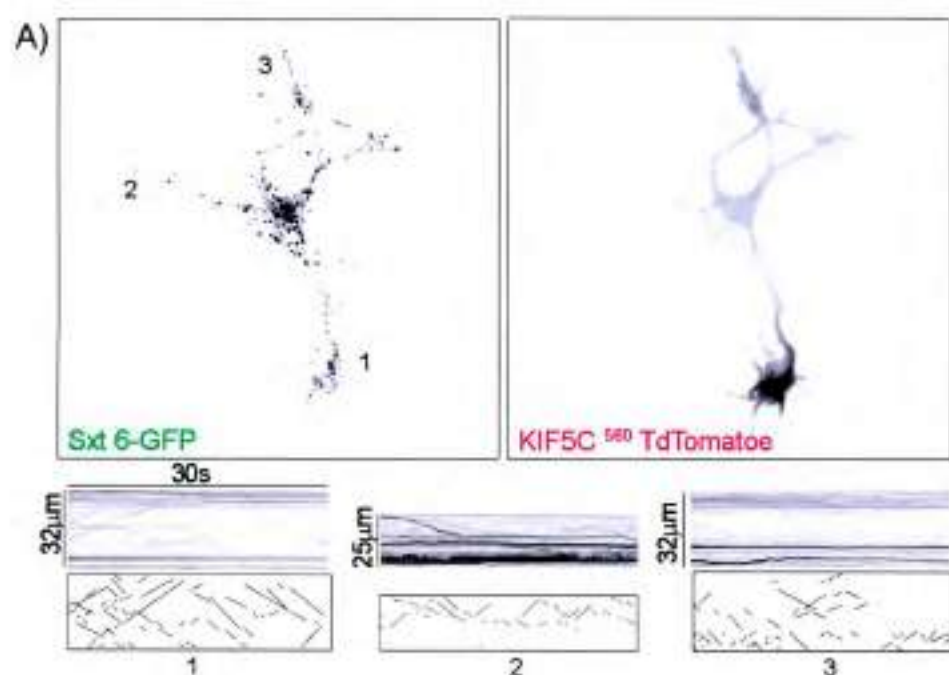


Fig. 15: Transporte polarizado de Sxt6 hacia la neurita que se convertirá en el axón. A) Neurona hipocampal en estadio 2 cotransfectada con Sxt6 GFP y KIF5C⁵⁶⁰TdT, se puede apreciar las vesículas Sxt6 positivas y la acumulación del motor constitutivamente activo en el tip de una neurita. B) Gráficos Kymograph donde se especifica los tamaños de los procesos y el tiempo de la película. Las líneas representan el movimiento vesicular, donde el proceso 2 presenta mayor transporte de vesículas Sxt6, proceso que coincide con el enriquecimiento del motor truncado, señalado la neurita que generará el futuro axón.

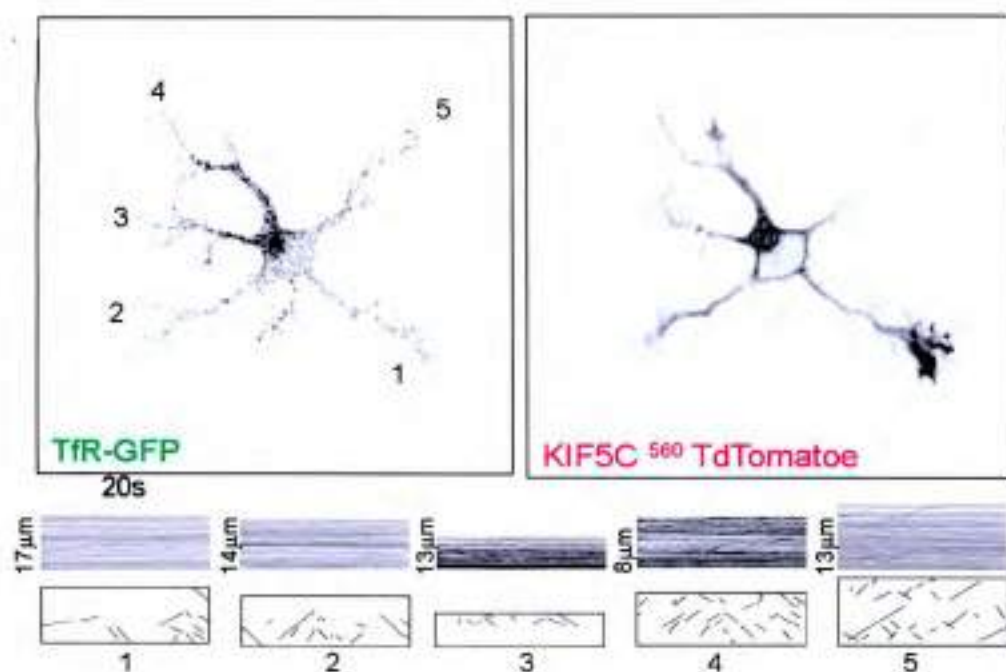


Fig. 16: Transporte selectivo de vesículas dendríticas positivas para TIR. A) Neurona hipocampal en estadio 2 cotransfectada con TIR GFP y KIF5C⁵⁶⁰TdT. Se puede apreciar las vesículas TIR positivas y la acumulación del motor constitutivamente activo en el tip de una neurita. Las micrografías ya señalan un transporte polarizado de dichas vesículas, en un proceso opuesto (proceso 5) al enriquecido en el motor truncado (proceso 2). B) Gráficos Kymograph donde se especifica los tamaños de los procesos y el tiempo de la película. Las líneas representan el movimiento vesicular, donde el proceso 5 presenta mayor transporte de vesículas TIR.

A partir de los ensayos *in vivo* analizamos el transporte de vesículas cargadas con la SNARE Sxt6. En la figura 17, se muestra la cuantificación de estos ensayos, donde se aprecia claramente que ambas proteínas tienen un transporte polarizado en células en estadio 2, sin embargo las vesículas con Sxt6 son direccionadas hacia los procesos que presentan una acumulación del motor constitutivamente activo KIF5C⁵⁶⁰, neurita que se convertirá en el futuro axón.

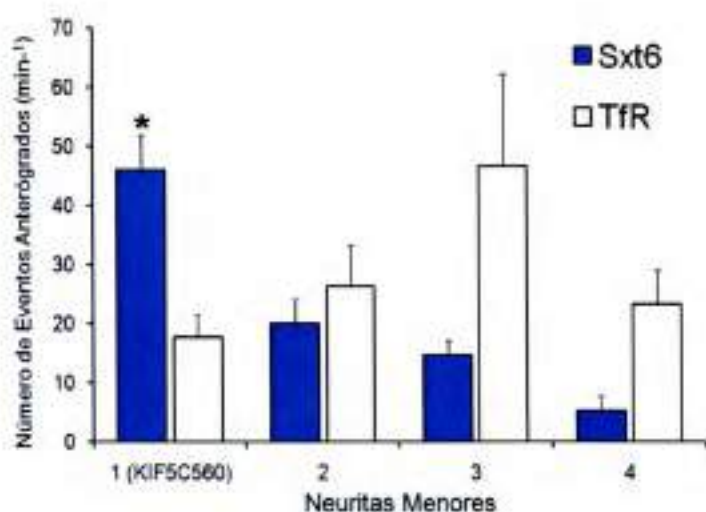


Fig. 17: Las vesículas positivas para las proteínas Sxt6 y TfR son transportadas anterógradamente a un proceso definido. Cuantificación del transporte anterógrado en cada proceso neurítico. Se observa una selectividad del proceso enriquecido en el motor truncado KIF5C por las vesículas Sxt6, mientras que las vesículas TfR se direcciona preferentemente a un proceso contrarios. Se realizó un ANOVA aplicando el Post Hoc Tukey HSD, donde se observó que el número de vesículas Sxt6 transportadas en el proceso 1 (KIF5C⁵⁶⁰) con el resto de las neuritas es significativamente mayor $p \leq 0.02$. En el caso de las vesículas que transportan los receptores de transferrina, se aplico la misma estadística, en este caso la diferencia no es significativa $p \leq 0.16$. este último resultado se debe a que si bien existe un transporte polarizado, este no se encuentra en el mismo proceso generando una gran dispersión de datos que traen aparejados un error significativo.

Los resultados obtenidos en esta sección permitieron demostrar de diferentes maneras una fuerte correlación entre la SNARE Sxt6 y el motor microtubular KIF5C. Se demostró, mediante inmunoprecipitación, la presencia de una interacción entre la SNARE y el motor, además ambas proteínas comparten la misma población vesicular. Además las vesículas cargadas con la proteína Sxt6 se transportan al futuro axón por el motor KIF5C constitutivamente activo. Además, mientras que el silenciamiento génico de KIF5C con el uso de shRNA, disminuyó los niveles de Sxt6 en el axón. En consecuencia este motor microtubular tan importante en la formación inicial de un axón, es el encargado de transportar una de las proteínas del complejo SNARE que permiten la exocitosis polarizada de los RIGF-1, esenciales para el establecimiento de polaridad neuronal (ver Grassi et al., 2015).

DISCUSIÓN ·PARTE II

Determinar si el motor microtubular KIF5C (que "camina" preferencialmente sobre microtúbulos estables) transporta algún cargo necesario para la inserción polarizada del IGF-1R.

6.1 KIF5C y el establecimiento de polaridad neuronal.

6.2 Transporte selectivo mediado por KIF5C

Los resultados presentados nos permiten postular que el motor KIF5C es necesario para el establecimiento del axón, su implicancia en este fenómeno podría radicar en las proteínas cargo que KIF5C transporta, ya que alguna de estas proteínas podrían ser las SNAREs Sxt6 y VAMP4, proteínas que participan de la exocitosis de las vesículas PPVs que transportan los RIGF-1. Antecedentes de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación, han demostrado que dicho receptor y su ligando, el factor de crecimiento similar a insulina tipo I, resultan esenciales para el establecimiento de polaridad neuronal (Sosa, et al 2006).

6.1 KIF5C y el establecimiento de polaridad neuronal

El transporte intracelular de proteínas citosólicas, estructuras membranosas, y organelas es un regulador crítico de la polaridad de la célula. Este proceso es mediado por diferentes proteínas motoras que incluyen a la dineína y la kinesina. En general, tanto la dineína como la kinesina, son motores dependientes de MTs. En el caso de la familia de kinesinas, una de las más estudiadas es la kinesina convencional o kinesina-1 (KIF5). Este motor anterógrado participa en el transporte de mitocondrias hacia el axón, o de vesículas conteniendo receptores neurotróficos TrkB, entre otros cargos (Namba et al., 2015).

Este motor ampliamente estudiado, está vinculado con el establecimiento axonal. Resultados de este trabajo de tesis demostraron que el silenciamiento de KIF5C impide la polaridad en neuronas hipocampales en cultivo. La disminución en la expresión génica de este motor bloquea la elongación de una neurita para generar el futuro axón, quedando células arrestadas en un estadio 2, morfológicamente no polarizadas. Estas observaciones fueron acordes a la amplia evidencia que demuestra un rol claro de este motor en el establecimiento de polaridad neuronal.



La KIF5, en neuronas maduras se encuentra localizada preferentemente en el axón (Hirokawa et al., 2009). Esta selectividad depende de las diferentes estabilidades de los MTs en el segmento inicial del axón (región proximal), al modificar esto con drogas específicas como el paclitaxel (inhibidor de la dinámica de los MTs) se altera la localización subcelular de este motor (Hammond et al., 2010; Nakata and Hirokawa, 2003) además de afectar directamente el establecimiento de la polaridad neuronal. En neuronas en estadio 2 de desarrollo KIF5 se encuentra enriquecida particularmente en una neurita menor (Huang and Banker, 2012). ¿Cómo las proteínas KIF determinan su selectividad? Es un interrogante ampliamente estudiado, se cree que las modificaciones postraduccionales de la tubulina determinan la preferencia del dominio motor de las kinesinas. El dominio motor de KIF5, por ejemplo, aumenta o disminuye su afinidad con los MTs dependiendo si la modificación postraduccional de la tubulina es la acetilación o la tirosinación, respectivamente (Namba et al., 2015). Como mencionamos anteriormente la utilización de paclitaxel cambia la distribución subcelular del motor KIF5, esto puede deberse a que esta droga induce la acetilación, detirosinación y la poliglutaminación de la tubulina. Por lo que, este conjunto de evidencias indican que la preferencia axonal-dendrítica del motor KIF5 es controlada por múltiples modificaciones postraduccionales de la tubulina y la correcta localización subcelular tanto en neuronas hipocámpales en estadio 2 como en estadio 3 de dicho motor, es esencial para el establecimiento inicial y el mantenimiento del axón.

6.2. Transporte selectivo mediado por KIF5C

La familia de las proteínas kinesinas (KIFs) participa en el establecimiento y en el mantenimiento de la polaridad neuronal a través del transporte selectivo de varias proteínas y vesículas ya sea al axón o a las dendritas.

Mis resultados permitieron identificar nuevos cargos para el motor microtubular KIF5C mediante ensayos de inmunoprecipitación y fraccionamiento subcelular de microsomas, pudimos identificar dos SNAREs como posibles cargos de la KIF5C. la

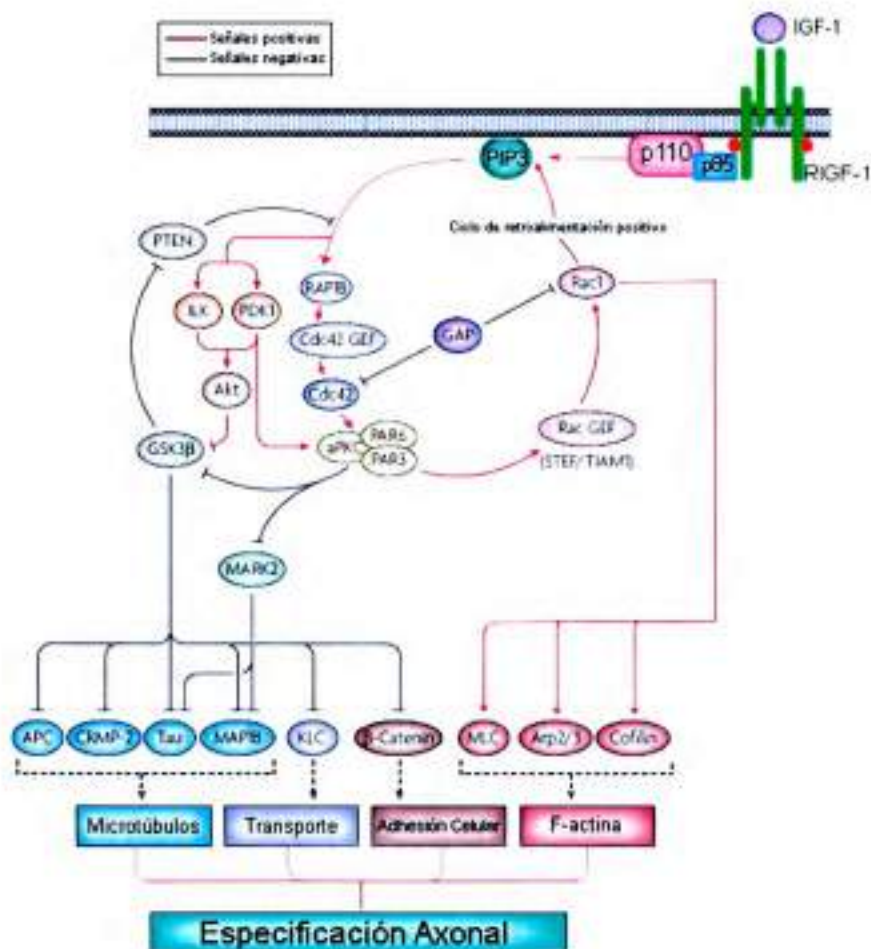


Sintaxina 6 y la VAMP4. Estas proteínas comparten ciertas similitudes, se expresan en etapas tempranas de diferenciación en cultivos neuronales, y presentan una localización perinuclear (probablemente en el TGN) además de un paulatino enriquecimiento axonal durante la polarización neuronal (Bock et al., 1996; Steegmaier et al., 1999). Antecedentes, indican la participación de varias proteínas SNARE en el crecimiento neurítico, tales como VAMP7 (Martinez-Arca et al., 2001), VAMP4 (Cocucci et al., 2008; Liu et al., 2013), Sintaxina 1 (Sakisaka et al., 2004), Sintaxina 6 (Kabayama et al., 2008), SNAP23, SNAP25 (Washbourne et al., 2002) entre otras. Sin embargo resultados de nuestro grupo de investigación revelaron un conjunto de 5 proteínas SNARE (VAMP2, VAMP4, VAMP7, Sintaxina 6 y SNAP23) que se expresan de manera temprana en neuronas hipocampales previo a la polarización morfológica. Mediante el uso de shRNA se encontró que las proteínas VAMP4, SNAP23 y Sintaxina 6 están involucradas específicamente en la regulación temprana del crecimiento inicial del axón, necesaria para el establecimiento de polaridad neuronal. El silenciamiento de esta SNAREs impide la exocitosis polarizada de los RIGF-1, evento clave para el establecimiento inicial del axón, así mismo la estimulación de partículas de conos de crecimiento axonal con IGF-1 dispara la asociación de VAMP4, Sintaxina 6 y SNAP23 a vesículas que transportan los receptores de IGF-1. Por lo que se concluyó que dichas SNAREs participan en la exocitosis regulada de PPVs y en la inserción polarizada de IGF-1R, eventos esenciales para el establecimiento de polaridad neuronal (Grassi et al., 2015).

Las kinesinas juegan un rol importante en la maduración y en el mantenimiento de la polaridad neuronal, mediante el transporte de proteínas cargos. Antecedentes previos han reportado el transporte, mediado por KIFs, de moléculas importantes en el establecimiento inicial del axón. Un ejemplo de esto es la proteína Par3 transportada hacia los axones por KIF3A (Nakata and Hirokawa, 2007). Par3, es parte del complejo Par3/Par6/aPKC, el cual se acumula en las puntas de los axones, esta localización resulta esencial para la especificación axonal. En la localización de Par3, resulta fundamental la actividad de la encima PI3K que produce PIP3. Este fosfolípido se considera cascada arriba en la vía de señalización, del complejo Par3/Par6/aPKC (Insolera et al., 2011; Shi et al., 2003).

En el caso particular de la kinesina estudiada en esta tesis, KIF5, media el transporte de la proteína mediadora de respuesta a colapsinas 2 (CRMP-2), hacia la región distal del axón naciente a través de la unión con las cadenas livianas (KLC). Esto juega un rol esencial en la especificación axonal (Namba et al., 2015). Debido a que, la proteína CRMP-2 modula la dinámica de la tubulina y se encuentra cascada abajo a GSK-3 β , proteína que a su vez se encuentra en la vía de señalización de PI3K y de la quinasa Akt en neuronas hipocampales. Por lo tanto, dentro de las proteínas cargo que el motor KIF5C transporta, solo se conocía a CRMP-2 como implicada en la especificación inicial del axón. Los resultados presentados en esta tesis doctoral encontraron nuevos cargos (Sxt6 y VAMP4) esenciales para el establecimiento de polaridad neuronal. Permitiendo la exocitosis de los RIGF-1, que una vez insertados al plasmalema del cono de crecimiento, estos receptores pueden ser estimulados por IGF-1 desencadenando la activación de una vía de señalización que involucran a la encima PI3K, Cdc42, al complejo Par3/Par6/aPKC y a GSK-3 β (Esquema 1).

Como se resume aquí, nuestros estudios y antecedentes previos sugieren que la KIF5C media el transporte de la SNARE Syntaxina 6, y probablemente VAMP4, proteínas que junto a SNAP23 interaccionan con PPVs que transportan RIGF-1 permitiendo su exocitosis regulada en un proceso menor de neuronas en estadio 2, su correcta inserción en membrana permiten la activación de la vía de señalización PI3K/Cdc42 y cascada abajo la formación del complejo Par3/Par6/aPKC, GSK-3 β y CRMP-2. Regulando el crecimiento inicial de axones y el establecimiento de la polaridad neuronal.



Esquema 1: Cascada de señalización RIGF-1/PI3k/Cdc42. La estimulación de los RIGF-1 desencadena la activación de la enzima PI3k originando el fosfolípido PIP3 que, cascada abajo, encuentran a la proteína Cdc42 y al complejo Par3/Par6/aPKC modulando finalmente la dinámica de la F-actina. Por su parte la proteína GSK-3 β cascada arriba de CRMP-2 modifican la dinámica de la tubulina (MTs). Todos estas señalizaciones participan en los fenómenos de la especificación axonal y la polaridad neuronal.

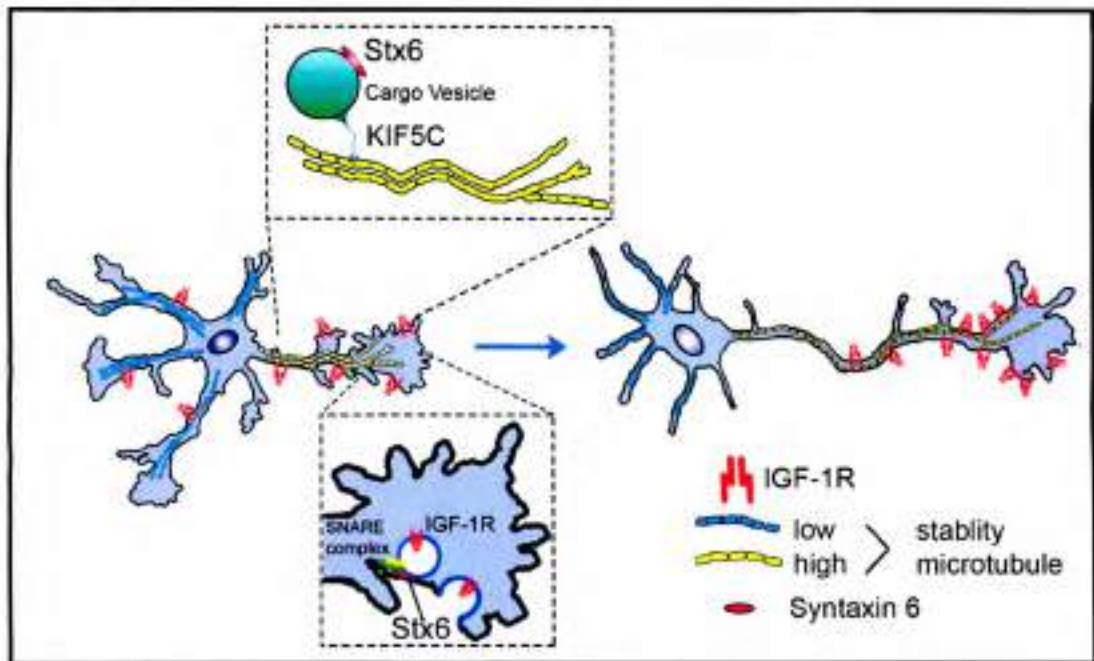
CONCLUSIONES

7. Conclusiones

Uno de los interrogantes más estudiados en el campo de la neurobiología es cómo las neuronas establecen su polaridad. La herramienta más utilizada en esta área es el cultivo primario de neuronas de hipocampo, que permite el análisis de los mecanismos en la polarización neuronal y la identificación de las moléculas implicadas en la formación axonal.

Este trabajo de tesis doctoral, permitió un análisis general de diferentes eventos de polaridad a nivel molecular en neuronas hipocámpales en estadio 2 de desarrollo. Encontrando que los motores microtubulares KIF5 son encargados del transporte polarizado de vesículas cargadas con la SNARE Sxt6 y posiblemente de vesículas con VAMP4. Estas vesículas son dirigidas a la neurita que presenta mayores niveles de MTs estables, ya que, por antecedentes previos se conoce que el dominio motor de la kinesina-1 se une preferencialmente a MTs con un bajo nivel de recambio, más estables (Reed et al., 2006). Por otro lado, la neurita enriquecida con MTs estables, donde predominan las modificaciones post-traduccionales de la tubulina acetilación, poliglutaminación y detirosinación, es el mismo proceso menor donde se insertan en mayor proporción los RIGF-1. Cabe destacar que en esta excitosis polarizada de los RIGF-1 interviene como complejo de anclaje, las SNARE Sintaxina 6, SNAP23 y VAMP4.

Finalmente, nosotros proponemos que la regulación inicial del crecimiento de axones necesaria para el establecimiento de la polaridad neuronal depende de la acumulación de microtúbulos estables y receptores activables (insertados a membrana) de IGF-1. Estos dos procesos están, a su vez, interconectados por la actividad del motor microtubular KIF5C, el cual se acumula también en el futuro axón (ya que tiene preferencia para interactuar con microtúbulos estables) y, además, transporta selectivamente a este proceso a la proteína SNARE Sintaxina 6, la cual es esencial para la inserción polarizada de los RIGF-1 (Esquema 2).



Esquema 2: Conexión entre los eventos tempranos de polaridad neuronal. La estabilización local de los MTs en una neurita sumado a la activación de la cascada de la PI3k-Cdc42 vía el IGF1 son esenciales para la especificación axonal. En este proceso interviene la proteína KIF5C que se encarga del transporte polarizado de la SNARE Stx6, proteína vinculada con la exocitosis de los IGF-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata

8.1.1 Tratamiento con drogas

8.2 Inmunofluorescencia

8.2.1 Fijación con PFA

8.2.2 Fijación con Buffer PHEM

8.3 Anticuerpos Primarios

8.4 Anticuerpos Secundarios

8.5 Transfección

8.5.1 Transfección Convencional

8.5.2 Transfección en Suspensión

8.5.2 Nucleofección

8.6 Biología Molecular: Preparación de construcciones

8.6.1 Construcción de los vectores para expresión de shRNAs

8.6.2 Obtención y subclonado de construcciones utilizadas para experimentos de recuperación de fenotipo

8.7 Purificación de GCPs

8.8 Purificación de Microsomas

8.9 Inmunoprecipitación de estructuras membranosas derivadas de conos de crecimiento axonales y Microsomas

8.10 Electroforesis y Western Blot

8.11 Cuantificaciones

8.11.1 Índice de polaridad.

8.11.2 Análisis del Transporte Vesícula.

8.1 Cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata:

Para los cultivos de neuronas piramidales de hipocampo, se utilizan embriones de rata de 18 días de vida intrauterina. Las ratas preñadas fueron anestesiadas con CO₂ y se les practicó una cesárea. Los embriones fueron inmediatamente decapitados en campana de flujo laminar. Se extrajeron los cerebros y se los colocó en cápsulas de Petri conteniendo solución estéril de Hank (HEPES 10 mM, NaCl 4 g, KCl 200 mg, Glucosa 500 mg, KH₂PO₄ 30 mg, NA₂HPO₄ 23,7 mg, H₂O csp 500 ml, pH= 7.4) a 4°C. Los hipocampos se extrajeron mediante microcirugía bajo lupa estereoscópica Carl Zeiss y se incubaron en solución de tripsina al 0,25% p/v a 37°C durante 18 minutos para digerir la matriz de adhesión intercelular. Luego fueron lavados 3 veces durante 5 minutos cada vez con solución de Hank a 4°C y colocados en tubo plástico estéril de 15 ml conteniendo entre 3 a 1 ml medio de cultivo DMEM/HS10% (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Gibco®) a 37°C, dependiendo del número de hipocampos extraídos. En los casos en los que las células fueron destinadas a experimentos de transfección en suspensión el medio de cultivo antes mencionado, fue reemplazado por medio de transfección OPTIMEM® (Gibco). Los hipocampos fueron disociados utilizando pipetas Pasteur de vidrio de diámetros decrecientes hasta lograr una suspensión homogénea. Las células disociadas fueron sembradas sobre discos de vidrio-cubreobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina (1mg/ml en buffer borato pH: 8; el exceso de poli-L-lisina es eliminado con 4-5 lavados de agua miliQ) con una densidad aproximada de unas 5000 células/cm² y mantenidas en medio de cultivo DMEM/HS10%. Las células fueron cultivadas durante 1-2 horas en estufa a 37°C, CO₂ al 5% y humedad constante, lo que les permite asociarse a los cubreobjetos con poli-L-lisina. Una vez adheridas las neuronas, el medio DMEM/HS10% fue sustituido por un medio definido comprendido por la mezcla N2-Neurobasal (suplementos B27 2%v/v y N2 1%v/v, piruvato 0,1mM, glutamina 0,2mM y albumina 0,1%p/v. disueltos en medio definido Neurobasal - Gibco® -). Para permitir la supervivencia y el crecimiento

neuronal, este medio de cultivo contiene niveles altos de insulina, suficiente para estimular los receptores de insulina como así también los receptores de IGF-1.

En algunos experimentos (donde se especifica) las células se incuban con un medio condicionado, el cual consiste en una mezcla N2-Neurobasal con bajo contenido de insulina ($5 \eta M$); ésta se encuentra en cantidad suficiente para permitir la sobrevivencia celular pero no para promover la activación de receptores de IGF-1. Esta condición es la que se define como *baja insulina*.

8.1.1 Tratamiento con drogas

Las neuronas del hipocampo en cultivo, en algunos casos, fueron tratadas con drogas que alteran la estabilidad del citoesqueleto de tubulina. Dependiendo del ensayo se utilizaron las siguientes concentraciones de las drogas, $3 \mu M$ o $45 nM$ de Nocodazol –droga desestabilizadora de microtúbulos– y $45 nM$ de Taxol –droga estabilizadora de microtúbulos–, estas fueron preparadas con el medio definido de cultivo N2-Neurobasal entre unas 6 a 24h antes del agregado a las células, las neuronas control fueron tratadas con D.M.S.O que es el vehículo de las drogas utilizadas. Para una correcta distribución de las drogas en las placas, las mezclas fueron pasadas por el vórtex e inmediatamente puestas en las placas con las neuronas.

8.2 Inmunofluorescencia

Las neuronas crecidas en cultivo primario, son sometidas a 3 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con la solución salina de buffer fosfato (PBS, que contiene: NaCl 4,25 gr; NA_2HPO_4 , 6,4 gr; NAH_2PO_4 1.01 gr; H_2O csp 500 mL). Posteriormente se fijan, en esta tesis se utilizaron dos métodos de fijación explicados a continuación:

8.2.1 Fijación con PFA: se utiliza una solución de paraformaldehído-sucrosa al 4% (p/v) durante 20 min a temperatura ambiente, lavadas 3 veces por 5 minutos cada vez con PBS 1X, subsecuentemente las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.2% v/v en PBS 1X durante 6 minutos y lavadas nuevamente.

8.2.2 Fijación con Buffer PHEM: para los experimentos donde necesitábamos analizar la tubulina tirosinada, acetilada o la tubulina total sin observar aquellas moléculas de tubulina no polimerizadas para realizar un análisis de únicamente los microtúbulos. Las neuronas fueron simultáneamente fijadas y permeabilizadas por 15min con el buffer PHEM (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 5 mM EGTA y 1 mM MgCl₂) a 37°C. Este, además, contiene 0,25% de glutaraldehído, 3,7% paraformaldehído, 3,7% sucrosa y 0,1% Tritón X-100 (adaptación de Witte., et al, 2008; Smith., et al 1994). Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces consecutivas con PBS 1X, y se inactivaron los grupos aldehídos con 50mM de NH₄Cl en PBS a temperatura ambiente por 15min y nuevamente lavadas 3 veces con PBS 1X

Los discos de vidrio con las células adheridas fueron trasladados a cámara húmeda donde se los cubrió con una solución bloqueante (Suero de caballo al 5% y Tritón X-100 al 0,05% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente con el fin de cubrir epítopes inespecíficos presentes en la muestra. Posteriormente las células fueron incubadas con el/los anticuerpo/s primario/s durante 1 a 3 horas a temperatura ambiente o 12 horas a 4°C y lavadas con PBS (3 veces por 5 minutos).

Los cultivos fueron teñidos usando anticuerpos secundarios fluorescentes durante 1 hora a temperatura ambiente y lavados con PBS (3 veces por 5 minutos). Para el montaje de los cubreobjetos se utilizó FluorSave (Calbiochem).

8.3 Anticuerpos primarios

Especificidad	Procedencia	Diluciones de Trabajo	Número de Catálogo
Vamp4	Policlonal de conejo	WB: 1/250; IF: 1/100; IP: 1/150	Synaptic Systems (Cat. 136 002)
Syntaxin 6	Policlonal de conejo	WB: 1/600; IF: 1/75; IP: 1/150	Synaptic Systems (Cat. 110 062)
B ₂₂ (RIGF-1)	Policlonal de conejo	WB: 1/200; IF: 1/75; IP: 1/150	Quiroga, et al 1995
Tubulina β III	Policlonal de conejo	IF: 1/2000; WB: 1/4000	Sigma (Cat. T2200)
Tubulina Tirosinada	Monoclonal de ratón (clon TUB-1A2)	IF: 1/2000	Sigma (Cat. T-9028)
α -Tubulina	Monoclonal de ratón (clon DM1A1)	WB: 1/2000	Thermo Scientific (Cat. MA1-25052)
Tubulina acetilada	Monoclonal de ratón (clon 6-11B-1)	IF: 1/4000	Sigma (Cat. T0793)
Tau 1	Monoclonal de ratón (clon PC1C6)	IF: 1/400	Millipore (Cat. MAB3420)
pIGF1R	Policlonal de conejo (Y980)	IF: 1/20	Cell Signalling (Cat. C14A11)
KIF5C	Policlonal de conejo	WB: 1/2000; IP: 1/400; IF: 0,8 μ g/ μ l	Abcam (Cat. ab5630)
Exo7D (Z2-7)	Policlonal de ratón	WB: 1/250	Santa Cruz (Cat. sc-100733)
Sec8 (LB-2)	Monoclonal de ratón	WB: 1/100	Santa Cruz (Cat. sc-100734)
Sec8	Monoclonal de ratón	WB: 1/1000	BD Bioscience (Cat. 610658)
Sec5 (N15)	Policlonal de cabra	WB: 1/100	Santa Cruz (Cat. sc-30285)
Tc10 (E13)	Policlonal de cabra	WB: 1/100	Santa Cruz (Cat. sc-26592)

8.4 Anticuerpos secundarios

Especificidad	Marcador	Procedencia	Diluciones de Trabajo	Número de Catálogo
IgG de conejo	Alexa Fluor 488 (fluorescente verde)	Policlonal de conejo	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A21441)
IgG de ratón	Alexa Fluor 488 (fluorescente verde)	Policlonal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A11001)
IgG de conejo	Alexa Fluor 546 (fluorescente rojo)	Policlonal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A11035)
IgG de ratón	Alexa Fluor 568 (fluorescente rojo)	Policlonal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A11031)
IgG de conejo	Alexa Fluor 633 (fluorescente azul)	Policlonal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A21086)
IgG de rata	Alexa Fluor 633 (fluorescente azul)	Policlonal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A21094)
IgG de ratón	Alexa Fluor 633 (fluorescente azul)	Policlonal de cabra	IF: 1/1000	Molecular Probes (Cat. A21052)
IgG de conejo	Odyssey IRedye CW 800 (Infrarrojo)	Policlonal de cabra	WB: 1/15000	LI-COR (Cat. 926-32210)
IgG de ratón	Odyssey IRedye CW 800 (Infrarrojo)	Policlonal de cabra	WB: 1/15000	LI-COR (Cat. 926-32210)

Para el registro de las imágenes confocales se utilizó un microscopio confocal espectral FluoView® FV1000 con objetivo 60x (AN 1.42) y 100x (AN 1.4). Para el registro de las videos microscopía se utilizó un microscopio spinning disk LIFA Leica DMI6000B con objetivos 100x. Las cámaras utilizadas en este último caso son, la cámara EMCCD muy sensible (Photometrics Quantem 512) y una cámara CCD resolutive (Photometrics HQ2).

Las fotografías fueron procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop CS. Para las cuantificaciones de las mismas se utilizaron los software ImageJ y Metamorph según se indique.

8.5 Transfección

8.5.1 Transfección convencional: Este protocolo cuenta para células en cultivo adheridas al sustrato (líneas o cultivo primario). Se utilizaron placas de plástico de 35 mm con alta densidad de células (~60-75%).

Se preparó la solución de transfección mezclando 250 μ l de medio de transfección OPTIMEM® a 37 °C con 5 μ l del agente Lipofectamina® 2000 (Invitrogen), incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente, y agregando posteriormente 50 μ l de OPTIMEM® a 37 °C con una cantidad de DNA determinada según el experimento (entre 1,5 a 4 μ g). Se incubó la solución resultante durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 700 μ l de OPTIMEM® a 37 °C y posteriormente se procedió a reemplazar con este medio de transfección el medio definido en el que se encontraban creciendo las células. El proceso de transfección tuvo una duración de entre 60 a 90 minutos. Posteriormente se reemplazó el medio transfectante por medio de cultivo a 37 °C y se permitió la expresión de las diferentes construcciones por un lapso de 12-40 horas dependiendo del experimento.

8.5.2 Transfección en suspensión: Este protocolo fue utilizado para células aún no adheridas al sustrato, posterior a la obtención de neuronas disociadas.

Se preparó la solución de transfección mezclando 50 μ l de medio de transfección OPTIMEM® a 37 °C con 1,2 μ l de Lipofectamina® 2000 (incubados durante 10 minutos) y agregando posteriormente 30 μ l de OPTIMEM® a 37 °C con una cantidad de DNA determinada según el experimento (entre 0,4 a 1,2 μ g). Se incubó la solución resultante durante 20-30 minutos a temperatura ambiente.

Por otro lado, se determinó en cámara de Neubauer la cantidad de células presentes en la suspensión celular. Se agregó el equivalente a 50000-70000 células (~15-20 μ l) al complejo OPTIMEM®/Lipofectamina®/DNA y posteriormente se depositó esta mezcla sobre los vidrios tratados con poli-L-lisina, formando una gota sobre los mismos. Se permitió que la reacción de transfección tuviera lugar durante 60 a 90 minutos, luego que las células se adhirieron al sustrato se retiró la gota de complejo transfectante y se reemplazó con medio definido N2-neurobasal. Una vez finalizada la transfección (tiempo cero de cultivo primario) se permitió la expresión de las diferentes construcciones por un lapso de 12-40 horas.

8.5.3 Nucleofección: Para esta técnica se utilizó un electroporador Lonza 4D y el kit Lonza P3 células primarias 4D-Nucleofector X Kit L (Cat.No. V4XP-3024). En primera instancia se preparó 3ml de medio de cultivo N2-Neurobasal en tubos cónicos de 15ml por condición y se precalentaron a 37°C. En estos tubos se agregó 500.000 células de hipocampo disociadas y se centrifugó a 7000rpm por 5min para precipitar las mismas. Por otro lado, se realizó la mezcla de los DNAs de interés (es importante no exceder los 5 μ g de DNA por condición). La cantidad de DNA utilizado depende de cada plásmido. Bajo campana de flujo laminar se retiró el sobrenadante de las células precipitadas, estas se re-suspendieron en 100 μ l de la solución de nucleofección P3. Esta suspensión de neuronas se transfirió al eppendorf con la mezcla de DNA y se

mezcló suavemente 2 a 3 veces con la ayuda de micropipetas evitando la formación de burbujas, inmediatamente después se colocaron en las cubetas de electroporación. Finalmente para su transformación se llevaron las cubetas con las neuronas al electroporador Lonza y utilizando el programa de células neuronales en cultivo, específicamente "neurona, rata, hipocampo/cortical/Alta viabilidad" se realizó la electroporación de las células. Estas fueron removidas de las cubetas con el medio de cultivo precalentado, y fueron transferidas a las placas e incubado en estufa a 37°C, 5% CO₂ y humedad constante.

8.6 Biología Molecular: Preparación de construcciones

8.6.1 Construcción de los vectores para expresión de shRNAs

Para generar los diferentes shRNAs se utilizó un vector comercial denominado pSuperNeo+GFP (Oligoengine). Éste fue digerido con las enzimas de restricción *Bgl*III y *Hind*III (Promega). El plásmido en esta configuración abierta fue utilizado para insertar diferentes secuencias de oligonucleótidos. Éstos fueron previamente diseñados en base a algoritmos y programas específicos y sintetizados comercialmente (GBT Oligos). Es importante destacar que cada oligonucleótido consta de una secuencia complementaria (no mostrada) diseñada de tal manera que al hibridar ambas se formen extremos que empalman con los sitios de restricción *Bgl*III y *Hind*III del vector abierto. Dicha hibridación entre pares de secuencias complementarias se logra mediante gradientes de temperatura que pueden programarse en una PCR (por ejemplo). Las secuencias utilizadas se detallan a continuación:

KIF5c: 5'-gatccccagcagaagaatggaagaattcaagagattctccattctctgctgtttta-3'

KIF5c': 5'-gatccccctgattaacattaacaattcaagagattgtttaatgttaatcaggttttta-3'

Scrambled: 5'-gatccccagacaatgaagcgaagaagttcaagagacttcttcgcttcattgtctttttta-3'



Subrayado en cada oligonucleótido se indican las secuencias a las que se dirige el ARN antisentido. Para la ligación entre vector y oligonucleótido hibridado se utilizó T4 ADN ligasa. Una vez que la ligación fue exitosa se procedió al chequeo de los clones mediante enzimas de restricción y, posteriormente, por secuenciación de los mismos.

8.6.2 Obtención y subclonado de construcciones utilizadas para experimentos de recuperación de fenotipo

En principio las construcciones codificando a la proteína KIF5C, fueron adquiridas de diferentes grupos de investigación. El Dr. Gary Banker donó generosamente las construcciones KIF5c full length RFP, KIF5C⁵⁶⁰ TdT (construcciones descritas en Jacobson, et al 2006), la Dra. Sima Lev tuvo el mismo gesto y donó la construcción HA-Syntaxin6 (descrita en Laufman y col, 2010)

8.7 Purificación de GCPs

Las partículas de conos de crecimiento aislados o GCPs (del inglés *Growth Cone Particles*) fueron obtenidos a partir del homogenato de cerebros de embriones de rata de 18 de vida intrauterina, en una solución de sucrosa 0,32 M, $MgCl_2$ 3mM y HEPES 1mM conteniendo inhibidores de proteasas y de fosfatasa (Aprotinina 2 g/ml, Leupeptina 2 g/ml, Pepstatina 1 g/ml, PMSF 100 g/ml y Ortovanadato 2 g/ml). El homogenato se centrifugó a baja velocidad (15 minutos a 3500 rpm. en rotor SA-600) y el sobrenadante LSS (del inglés *Low Speed Supernatant*) fue sometido a una ultra centrifugación isopícnica en un gradiente discontinuo de sucrosa con densidades de 0,32 M (aportada por el LSS) 0,83 M, 1M, y 2,66 M a una velocidad de 50.000 rpm.

durante 40 minutos con el rotor vertical VTi50 (Beckman). Se tomó la fracción ubicada en la interface LSS-0,83 M (fracción que contiene un enriquecimiento en partículas de conos de crecimiento aislados o GCPs, designada fracción "A"). Los restantes elementos del LSS fueron separados en dos fracciones ubicadas en las interfaces 0,83-1 M ("B") y 1 M-2,66 M ("C").

Si se centrifuga la fracción "A" a 16.000 rpm por 1h, (en rotor TYPE60, Beckman) a 4°C, utilizando además, un colchón de sucrosa 2,66 M. Se obtiene una interface altamente enriquecida en conos de crecimiento aislados, que pueden ser o no, diluidos en buffer isotónico y ser utilizados en las determinaciones pertinentes.

8.8 Purificación de Microsomas

Esta técnica consiste en la obtención de estructuras membranosas mediante la disgregación mecánica de cerebros embrionarios de rata de 18 días de gestación. En primer lugar, se extrajeron quirúrgicamente los cerebros a los cuales se les agregó 10 volúmenes de una solución denominada como solución "A", la cual está comprendida por sucrosa 0,32 M, HEPES 10 mM pH= 7,4, MgCl₂ 3 mM más los inhibidores de proteasas y fosfatasa (para las concentraciones véase "Purificación de GCP").

Dichos cerebros fueron disgregados mecánicamente mediante el uso de un homogeneizador -la homogeneización es suave y se repite hasta ver una suspensión homogénea- posterior a este proceso el homogeneizado fue sometido a una centrifugación a 3000 x g, 10 min a 4°C (Rotor F34-6-38). El precipitado P1, correspondiente a la fracción nuclear y mitocondrial, fue descartado. El sobrenadante S1 fue recolectado y centrifugado a 9000 x g durante 15 min a 4°C (Rotor TLA 100.3). De dicha centrifugación se descartó el precipitado P2 comprendido principalmente por sinaptosomas y lisosomas. La fracción soluble S2 se centrifugó a 100.000 x g por 60 min (rotor TLA 100.3). Finalmente el sobrenadante S3 obtenido, se descarta, quedando

el precipitado P3 correspondiente a la fracción microsomal. Los Microsomas obtenidos fueron re suspendidos en la solución A.

Estas estructuras vesiculares pueden ser separadas de acuerdo a su densidad de flotación al ser sometidas a un gradiente continuo de sucrosa (Peretti., et al 2000). Dichos gradientes fueron formados con sucrosa de 0,3 M a 1,6M o con sucrosa de 1 M a 2 M. Para realizar los gradientes continuos, se utilizó una bomba peristáltica a una velocidad de 6,05 ml/min. Luego, se sometió a una centrifugación de 48.000 rpm por 2 h (Rotor Sorvall STS 60.4). Las fracciones fueron colectadas en 12 alícuotas y centrifugadas a 90.000 rpm por 30 min (Rotor TLA 100.3). Finalmente el pellet obtenido fue resuspendido en Sample Buffer 5 X.

8.9 Inmunoprecipitación de estructuras membranosas derivadas de conos de crecimiento axonales y Microsomas.

En esta técnica, se utilizan microesferas de sefarosa unidas a proteína A, también conocidas como **beads** (Protein A-Sepharose 4B Fast Flow - SIGMA). Éstas reconocen e interaccionan específicamente con la región Fc de las inmunoglobulinas presentes en los anticuerpos primarios.

Se tomó una alícuota de 20 μ l por cada condición a efectuar. Las microesferas fueron lavadas en agitación por 3 min, centrifugadas a 4000 rpm, durante 5 min y resuspendidas con solución de sucrosa 0,32 M o con la solución "A" (ver Microsomas) dependiendo de la muestra de partida. Todos los procedimientos mencionados anteriormente fueron realizados a 4°C y repetidos de 4 a 5 veces. Una vez concluidos los lavados las beads fueron agregadas a las vesículas obtenidas de GCPs o Microsomas (previamente incubadas con anticuerpo primario) durante 3 horas a 4°C en agitación constante. Para favorecer la interacción del complejo beads-anticuerpo, este se incubó por 12 h a 4 °C

Se agregó además un control en el cual las estructuras membranosas no fueron incubadas con anticuerpo primario, de modo de evidenciar unión inespecífica de las microesferas a las vesículas. Luego de la incubación del complejo vesícula/ Anticuerpo primario /Microesferas la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 4000 rpm y 4 °C, se recolectó el sobrenadante (SN) – en algunos casos se procedió a concentrarlo por el método de metanol/cloroformo que se describe a continuación –.

Al volumen de sobrenadante inicial se le agregó 1 volumen de metanol y 0.25 volúmenes de cloroformo. Esta mezcla se agitó vigorosamente y fue centrifugada a 14000 g por 2 minutos a 4 °C. Paso seguido se eliminó el sobrenadante (fase superior) cuidando de no perder la interface donde se encontraban las proteínas. Posteriormente se agregó un volumen de metanol a la muestra, la cual fue nuevamente agitada y centrifugada a 14000 g por 2 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado, el pellet de proteínas se secó en estufa a 37 °C y finalmente fue resuspendido en 50 µl de sample buffer 5X (ver Western Blot).

Paralelamente, el precipitado que está constituido por el complejo beads-anticuerpo-vesícula denominado IP, fue lavado como se explicó anteriormente a fines de eliminar cualquier traza de material inespecífico. Paso seguido dicho pellet fue resuspendido en sample buffer 5X.

IP y sobrenadante fueron entonces calentados a 90-95 °C por 5 minutos e inmediatamente almacenados a -20 °C para su posterior análisis mediante Western Blot. Este último paso además de promover la desnaturalización de las proteínas en general es necesario para romper la unión entre el complejo microesferas-anticuerpo-vesícula.

8.10 Electroforesis y Western Blot



Para realizar electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS se utilizó el sistema descrito por Laemli (1970). La composición del gel separador fue de 10% al 15% de poliacrilamida según el peso molecular de la proteína a resolver. Para un gel al 10% la composición fue: poliacrilamida 10% (p/v), bis-acrilamida (N,N-metilen-bis-acrilamida) 0,27% (p/v), TEMED (N,N,N,N,tetrametilendiamina) 0,025% (v/v), persulfato de amonio 0,09% (p/v), Tris-HCl 0,375 M pH: 8,8, y SDS 0,1% (p/v).

La composición del gel concentrador fue: poli-acrilamida 3% (p/v), bis-acrilamida (N,N-metilen-bis-acrilamida) 0,08% (p/v), TEMED (N,N,N,N,tetrametilendiamina) 0,1% (v/v), persulfato de amonio 0,15% (p/v), Tris-HCl 0,125 M pH:6,8, y SDS 0,1% (p/v). A las muestras analizadas se les adicionó inhibidores de proteasas y de fosfatasa (aprotinina 2 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 2 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina 1 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 100 $\mu\text{g/ml}$ y ortovanadato 2 $\mu\text{g/ml}$). Cuando las muestras procedían del raspado, con buffer RIPA, de células crecidas en cultivo estas se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm, en centrifuga refrigerada. Se tomó la fracción ubicada en el sobrenadante y se le agregó buffer de muestra "Sample Buffer" (glicerol 3% (v/v), 2-mercaptoetanol 1,6% (v/v), SDS 1% (p/v), Tris-HCl 0,0625 M pH: 6,8). Luego las muestras se calentaron a 100°C durante 3 minutos. El buffer de la corrida electroforética consistió en Tris 0,0025 M - Glicina 0,2 M pH: 8,3, conteniendo SDS 0,1% (p/v). La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente, a 8V\cm hasta que las proteínas se concentraron en el gel separador y luego el voltaje se incrementó a 12V\cm hasta que el frente de la corrida llegó al final del gel. Para la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (p-polyvinylidene difluoride) se utilizó el método húmedo, manteniéndose constante una intensidad de corriente de 270 mA, durante 1:30 horas en buffer Tris-Glicina (Tris 0,0025 M, Glicina 0,2 M pH: 8,3, con 0,1% (p/v) de SDS) conteniendo 20% de metanol. Las membranas se colorearon con Ponceau S 0,2%(p/v) en ácido acético al 1% (v/v) y luego lavadas con ácido acético al 1% (v/v) para corroborar si la corrida y la transferencia se realizaron correctamente. Luego de lavar el Ponceau con agua, las membranas fueron bloqueadas durante una hora en

TTBS (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, 0,05% (v/v) de Tween 20) conteniendo 5% de leche descremada, albúmina sérica bovina (BSA) o albúmina sérica humana (HSA), según la calidad y procedencia del anticuerpo a utilizar. Los blots se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en PBS conteniendo Tween 20 al 0,05% durante 3 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C en cámara fría. Luego de ser lavados en agitación durante 10 minutos con PBS conteniendo Tween al 0,05%, fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Tras los 3 lavados del anticuerpo secundario con PBS conteniendo Tween 20 al 0,05% los blots fueron revelados usando un equipo de detección para quimioluminiscencia (ECL, Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL).

8.11 Cuantificaciones

- ♦ **8.11.1 Índice de polaridad:** Para la realización de este cociente, se necesita calcular la intensidad de fluorescencia relativa, esta se define como pixeles por cm en el área seleccionada. Para lo cual se utiliza el programa *ImageJ*. A continuación se realiza una breve descripción de los procedimientos seguidos para este fin.

En primer lugar, las imágenes compuestas fueron separadas en los diferentes canales, para ello se utilizaron los siguientes comandos, *Color-RGB Split*. Posteriormente, situados en el canal de interés, se seleccionó cada procesos individualmente con la herramienta *Freehand Selections*. Una vez finalizada la selección se procedió a medir la intensidad de fluorescencia relativa promedio (media), mediante los comandos *Analyze-Measure*. En el caso de imágenes de inmunofluorescencia es posible encontrar "señal de ruido o background", para evitar la cuantificación de fluorescencia inespecífica, se resta el ruido a cada imagen, para ello se utilizan los comandos *Process-Math-Subtract*. El número relativo que se utiliza va a depender de cada imagen.

♦ **8.11.2 Análisis del Transporte Vesicular:** En este caso se analizó el transporte vesicular de casa proceso neurítico mediante Kymographs (Petersen., et al 2014). Para tal caso se usó el software *MetaMorph*. En primer lugar el contraste de las imágenes fue invertido de manera que las organelas fluorescentes en la imagen original corresponden a las líneas oscuras en el Kymograph. Posteriormente, se selecciona la región a estudiar con la herramienta *Multi-Line* y finalizada la selección se ejecutó el comando *Kymograph*. Dando como resultado un gráfico de líneas, las cuales representan las vesículas en movimiento en la región seleccionada. Sobre el Kymograph, se trazaron líneas rectas para aproximar cada excursión de la vesícula y las coordenadas de las líneas fueron transferidas a una hoja de cálculo de Excel para determinar el número total de eventos de transporte (normalizado para tener en cuenta variaciones en la longitud de las neuritas y la duración de la grabación)

REFERENCIAS

Adio, S., Reth, J., Bathe, F., and Woehlke, G. (2006). Review: regulation mechanisms of Kinesin-1. *J Muscle Res Cell Motil* 27, 153-160.

Arimura, N., and Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 194-205.

Baas, P.W., Black, M.M., and Banker, G.A. (1989). Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 109, 3085-3094.

Baas, P.W., Deitch, J.S., Black, M.M., and Banker, G.A. (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8335-8339.

Banker, G., and Goslin, K. (1988). Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336, 185-186.

Barnes, A.P., and Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* 32, 347-381.

Bartlett, W.P., and Banker, G.A. (1984). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci* 4, 1954-1965.

Bito, H., Furuyashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2000). A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron* 26, 431-441.

Bock, J.B., Lin, R.C., and Scheller, R.H. (1996). A new syntaxin family member implicated in targeting of intracellular transport vesicles. *J Biol Chem* 271, 17961-17965.

Bradke, F., and Dotti, C.G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science* *283*, 1931-1934.

Caceres, A., Banker, G., Steward, O., Binder, L., and Payne, M. (1984). MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res* *315*, 314-318.

Cai, H., Yu, S., Menon, S., Cai, Y., Lazarova, D., Fu, C., Reinisch, K., Hay, J.C., and Ferro-Novick, S. (2007). TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Nature* *445*, 941-944.

Coco, S., Raposo, G., Martinez, S., Fontaine, J.J., Takamori, S., Zahraoui, A., Jahn, R., Matteoli, M., Louvard, D., and Galli, T. (1999). Subcellular localization of tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein (VAMP)/VAMP7 in neuronal cells: evidence for a novel membrane compartment. *J Neurosci* *19*, 9803-9812.

Cocucci, E., Racchetti, G., Rupnik, M., and Meldolesi, J. (2008). The regulated exocytosis of enlargeosomes is mediated by a SNARE machinery that includes VAMP4. *J Cell Sci* *121*, 2983-2991.

Conde, C., and Caceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* *10*, 319-332.

de Forges, H., Bouissou, A., and Perez, F. (2012). Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol* *44*, 266-274.

Deng, C.Y., Lei, W.L., Xu, X.H., Ju, X.C., Liu, Y., and Luo, Z.G. (2014). JIP1 mediates anterograde transport of Rab10 cargos during neuronal polarization. *J Neurosci* *34*, 1710-1723.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* *8*, 1454-1468.

Dunn, S., Morrison, E.E., Liverpool, T.B., Molina-Paris, C., Cross, R.A., Alonso, M.C., and Peckham, M. (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci* 121, 1085-1095.

Dupraz, S., Grassi, D., Bernis, M.E., Sosa, L., Bisbal, M., Gastaldi, L., Jausoro, L., Caceres, A., Pfenninger, K.H., and Quiroga, S. (2009). The TC10-Exo70 complex is essential for membrane expansion and axonal specification in developing neurons. *J Neurosci* 29, 13292-13301.

Futerman, A.H., and Banker, G.A. (1996). The economics of neurite outgrowth—the addition of new membrane to growing axons. *Trends Neurosci* 19, 144-149.

Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamberg, J.R., and Bradke, F. (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci* 27, 13117-13129.

Grassi, D., Bustos, Plonka F., Oksdath, M., Nieto Guil, A., Sosa, L. J. and Quiroga, S. (2015). Selected SNARE proteins are essential for the polarized membrane insertion of IGF-1 receptor and the regulation of initial axonal outgrowth in neurons. *Cell Discovery* 1, doi:10.1038/celldisc.2015.23

Goslin, K., Schreyer, D.J., Skene, J.H., and Banker, G. (1988). Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature* 336, 672-674.

Hammond, J.W., Blasius, T.L., Soppina, V., Cai, D., and Verhey, K.J. (2010a). Autoinhibition of the kinesin-2 motor KIF17 via dual intramolecular mechanisms. *J Cell Biol* 189, 1013-1025.

Hammond, J.W., Cai, D., Blasius, T.L., Li, Z., Jiang, Y., Jih, G.T., Meyhofer, E., and Verhey, K.J. (2009). Mammalian Kinesin-3 motors are dimeric in vivo and move by processive motility upon release of autoinhibition. *PLoS Biol* 7, e72.

Hammond, J.W., Huang, C.F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G., and Verhey, K.J. (2010b). Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol Biol Cell* 21, 572-583.

Hirokawa, N., and Noda, Y. (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* 88, 1089-1118.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 682-696.

Hoebeke, J., Van Nijen, G., and De Brabander, M. (1976). Interaction of oncodazole (R 17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin. *Biochem Biophys Res Commun* 69, 319-324.

Huang, C.F., and Banker, G. (2012). The translocation selectivity of the kinesins that mediate neuronal organelle transport. *Traffic* 13, 549-564.

Igarashi, M., Tagaya, M., and Komiya, Y. (1997). The soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attached protein receptor complex in growth cones: molecular aspects of the axon terminal development. *J Neurosci* 17, 1460-1470.

Insolera, R., Chen, S., and Shi, S.H. (2011). Par proteins and neuronal polarity. *Dev Neurobiol* 71, 483-494.

Jacobson, C., Schnapp, B., and Banker, G.A. (2006). A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron* 49, 797-804.

Jiang, K., and Akhmanova, A. (2011). Microtubule tip-interacting proteins: a view from both ends. *Curr Opin Cell Biol* 23, 94-101.

Kabayama, H., Tokushige, N., Takeuchi, M., and Mikoshiba, K. (2008). Syntaxin 6 regulates nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. *Neurosci Lett* 436, 340-344.

Konishi, Y., and Setou, M. (2009). Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci* 12, 559-567.

Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K., and Caceres, A. (2001). Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J Neurosci* 21, 2361-2372.

Larcher, J.C., Boucher, D., Lazereg, S., Gros, F., and Denoulet, P. (1996). Interaction of kinesin motor domains with alpha- and beta-tubulin subunits at a tau-independent binding site. Regulation by polyglutamylation. *J Biol Chem* 271, 22117-22124.

Laurino, L., Wang, X.X., de la Houssaye, B.A., Sosa, L., Dupraz, S., Caceres, A., Pfenninger, K.H., and Quiroga, S. (2005). PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J Cell Sci* 118, 3653-3662.

Leoni, C., Menegon, A., Benfenati, F., Toniolo, D., Pennuto, M., and Valtorta, F. (1999). Neurite extension occurs in the absence of regulated exocytosis in PC12 subclones. *Mol Biol Cell* 10, 2919-2931.

Liu, Y., Xu, X.H., Chen, Q., Wang, T., Deng, C.Y., Song, B.L., Du, J.L., and Luo, Z.G. (2013). Myosin Vb controls biogenesis of post-Golgi Rab10 carriers during axon development. *Nat Commun* 4, 2005.

Lockerbie, R.O., Miller, V.E., and Pfenninger, K.H. (1991). Regulated plasmalemmal expansion in nerve growth cones. *J Cell Biol* 112, 1215-1227.

Maldonado-Baez, L., Dores, M.R., Perkins, E.M., Drivas, T.G., Hicke, L., and Wendland, B. (2008). Interaction between Epsin/Yap180 adaptors and the scaffolds Ede1/Pan1 is required for endocytosis. *Mol Biol Cell* 19, 2936-2948.

Mandell, J.W., and Banker, G.A. (1996). A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* 16, 5727-5740.

Martinez-Arca, S., Coco, S., Mainguy, G., Schenk, U., Alberts, P., Bouille, P., Mezzina, M., Prochiantz, A., Matteoli, M., Louvard, D., et al. (2001). A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. *J Neurosci* 21, 3830-3838.

McNiven, M.A., and Thompson, H.M. (2006). Vesicle formation at the plasma membrane and trans-Golgi network: the same but different. *Science* 313, 1591-1594.

Menager, C., Arimura, N., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2004). PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J Neurochem* 89, 109-118.

Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.

Munson, M., and Novick, P. (2006). The exocyst defrocked, a framework of rods revealed. *Nat Struct Mol Biol* 13, 577-581.

Nakata, T., and Hirokawa, N. (2003). Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J Cell Biol* 162, 1045-1055.

Nakata, T., and Hirokawa, N. (2007). Neuronal polarity and the kinesin superfamily proteins. *Sci STKE* 2007, pe6.

Namba, T., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Xu, C., Takano, T., and Kaibuchi, K. (2015). Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity. *Physiol Rev* 95, 995-1024.

Neukirchen, D., and Bradke, F. (2011). Neuronal polarization and the cytoskeleton. *Semin Cell Dev Biol* 22, 825-833.

Osen-Sand, A., Catsicas, M., Staple, J.K., Jones, K.A., Ayala, G., Knowles, J., Grenningloh, G., and Catsicas, S. (1993). Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Nature* 364, 445-448.

Osen-Sand, A., Staple, J.K., Naldi, E., Schiavo, G., Rossetto, O., Petitpierre, S., Malgaroli, A., Montecucco, C., and Catsicas, S. (1996). Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. *J Comp Neurol* 367, 222-234.

Peretti, D., Peris, L., Rosso, S., Qulroga, S., and Caceres, A. (2000). Evidence for the involvement of KIF4 in the anterograde transport of L1-containing vesicles. *J Cell Biol* 149, 141-152.

- Petersen, J.D., Kaech, S., and Banker, G. (2014). Selective microtubule-based transport of dendritic membrane proteins arises in concert with axon specification. *J Neurosci* 34, 4135-4147.
- Pfenninger, K.H., Laurino, L., Peretti, D., Wang, X., Rosso, S., Morfini, G., Caceres, A., and Quiroga, S. (2003). Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J Cell Sci* 116, 1209-1217.
- Quiroga, S., Garofalo, R.S., and Pfenninger, K.H. (1995). Insulin-like growth factor I receptors of fetal brain are enriched in nerve growth cones and contain a beta-subunit variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4309-4312.
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., and Verhey, K.J. (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16, 2166-2172.
- Sakakibara, A., Ando, R., Sapir, T., and Tanaka, T. (2013). Microtubule dynamics in neuronal morphogenesis. *Open Biol* 3, 130061.
- Sakisaka, T., Baba, T., Tanaka, S., Izumi, G., Yasumi, M., and Takai, Y. (2004). Regulation of SNAREs by tomosyn and ROCK: implication in extension and retraction of neurites. *J Cell Biol* 166, 17-25.
- Schiff, P.B., Fant, J., and Horwitz, S.B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277, 665-667.
- Schiff, P.B., and Horwitz, S.B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1561-1565.
- Schoch, S., Deak, F., Konigstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Sudhof, T.C., and Kavalali, E.T. (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* 294, 1117-1122.
- Schwamborn, J.C., and Puschel, A.W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* 7, 923-929.

Segal, M. (1983). Rat hippocampal neurons in culture: responses to electrical and chemical stimuli. *J Neurophysiol* 50, 1249-1264.

Shi, S.H., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112, 63-75.

Sosa, L., Dupraz, S., Laurino, L., Bollati, F., Bisbal, M., Caceres, A., Pfenninger, K.H., and Quiroga, S. (2006). IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat Neurosci* 9, 993-995.

Steegmaier, M., Klumperman, J., Foletti, D.L., Yoo, J.S., and Scheller, R.H. (1999). Vesicle-associated membrane protein 4 is implicated in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* 10, 1957-1972.

Verhey, K.J., Kaul, N., and Soppina, V. (2011). Kinesin assembly and movement in cells. *Annu Rev Biophys* 40, 267-288.

Washbourne, P., Thompson, P.M., Carta, M., Costa, E.T., Mathews, J.R., Lopez-Bendito, G., Molnar, Z., Becher, M.W., Valenzuela, C.F., Partridge, L.D., et al. (2002). Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci* 5, 19-26.

Weinberg, J., and Drubin, D.G. (2012). Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol* 22, 1-13.

Witte, H., and Bradke, F. (2008). The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr Opin Neurobiol* 18, 479-487.

Witte, H., Neukirchen, D., and Bradke, F. (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180, 619-632.

Ye, B., Zhang, Y.W., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2006). The secretory pathway and neuron polarization. *J Neurosci* 26, 10631-10632.

Yi, J.J., Barnes, A.P., Hand, R., Polleux, F., and Ehlers, M.D. (2010). TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell* 142, 144-157.

Abreviaturas

ATP: adenosin trifosfato

BDNF: factor de crecimiento derivado de cerebro

β gc: subunidad β del RIGF-1 localizada en conos de crecimiento axonales

Cdc42: proteína de control de la división celular 42

DMSO: dimetilsulfóxido

EGF: factor de crecimiento epitelial

GAP43: proteína asociada al crecimiento de 43 kd

GCPs: partículas de conos de crecimiento aisladas

GDNF: factor de crecimiento derivado de glia

GFP: proteína fluorescente verde

GSK3 β : glucógeno sintasa quinasa 3

GTPasa: enzima hidrolizante de guanosina trifosfato

IGF-1: Factor de Crecimiento similar a Insulina tipo I

RIGF-1: Receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo I

IAS: segmento inicial del axón

IP: inmunoprecipitado

IRS: sustrato del receptor de insulina 1

KIF5C: kinesina 5C

KHC: cadenas pesadas de la kinesina

KLC: cadenas livianas de la kinesina

MAP2: proteína asociada a microtúbulos 2

mRNA: RNA mensajero

MTs: microtúbulos

NGF: factor de crecimiento nervioso

Par: proteínas de partición defectiva

PBS: buffer fosfato salino

pIGF-1R: receptor de IGF-1 fosforilado

PI3K: enzima fosfatidil inositol 3 quinasa

PIP3: fosfatidilinositol-(3-,4,5)-trifosfato



BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

p110: subunidad catalítica de la enzima PI3K

p85: subunidad reguladora de la enzima PI3K

PPVs: vesículas precursoras de plasmalema

RFP: proteína fluorescente rojo

shRNA: RNA de horquilla pequeña

SN: sobrenadante

SNAP23 y 25: proteínas asociadas a sinaptosomas de 23 y 25 kd respectivamente

SNARE: receptores del factor SNAP

ssRNA: secuencia shRNA sin sentido

SEM: error estándar de la media

Sxt6: Sintaxina 6

Tc10: GTPasa pequeña

TfR: receptor de Transferrina

TGN: red del trans Golgi

t-SNARE: SNARE de la membrana blanco

v-SNARE: SNARE presente en la membrana de la vesícula

R-T

611.0188

O

13853



^13853^