



Universidad
Nacional
de Córdoba

C I Q U I B I C



Reforma
1918 - 2018

Departamento de
QUÍMICA BIOLÓGICA
Ranwel Caputto



FCQ

Facultad de
Ciencias Químicas

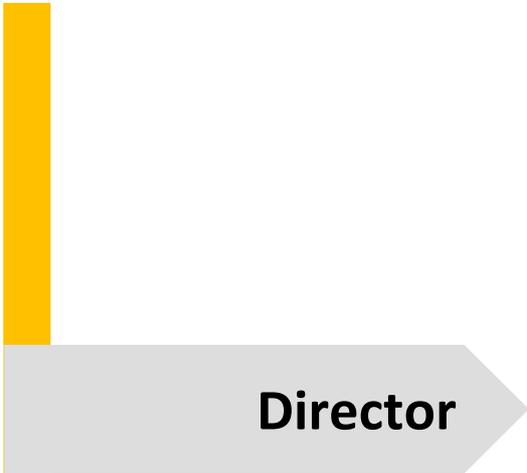
EFECTOS DIFERENCIALES DE SEC3 Y SEC8 EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD NEURONAL Y LA FORMACIÓN DEL NEOCORTEX

Tesis Doctoral en Ciencias Químicas

Julia Florentyna Bustos

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), CONICET
Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

2019
Córdoba - Argentina



Director

Dr. Santiago Quiroga

Comisión de Tesis

Dra. Cecilia Álvarez

Dr. Gastón Calfa

Dr. Gustavo Pigino

Dr. Damián Refojo

"Vita brevis, ars longa, occasio praeceps, experimentum periculosum, iudicium difficile."

"La vida es breve, el arte largo, la ocasión fugaz, la experiencia confusa, el juicio difícil."

Hipócrates

"Una cosa es reprimir la curiosidad; otra conquistarla"

El curioso caso del Dr. Jekyll y Mr. Hyde. Robert Stevenson

Agradecimientos

ÍNDICE

Resumen Español	7
Resumen Inglés	9
Abreviaturas	11
Introducción	12
1. La neurona y su morfología	13
2. La polaridad	15
3. Modelos de estudio de la polaridad	16
4. La participación de IGF1 en eventos tempranos de polaridad neuronal	21
• <i>El IGF1 y rol en el reordenamiento del citoesqueleto</i>	24
• <i>EL IGF1 y su efecto en la expansión de membrana</i>	25
5. Regulación de la expansión de membrana durante la polaridad neuronal	26
6. El Complejo Exocisto	30
• <i>Estructura del complejo</i>	31
• <i>Dinámica de formación del complejo</i>	32
• <i>Localización del complejo</i>	33
• <i>El complejo exocisto en neuronas</i>	34
Hipótesis y objetivos	37
Resultados	39
Capítulo 1 “Expresión de las subunidades del complejo exocisto en neuronas”	40
Resultados Capítulo 1	41
Conclusiones Capítulo 1	48
Capítulo 2 “Localización subcelular del complejo exocisto en neuronas”	49
Resultados Capítulo 2	50
1. Presencia de Sec5, Sec3 y Sec8 en el axón y cono de crecimiento	50
2. Sec3 y su asociación a membrana	54
3. Sec3 y su asociación a citoesqueleto microtubular y de actina	58
4. Cercanía de Sec3 y Sec8 en el cono de crecimiento	62
5. Sec3 y el transporte axonal	63
Conclusiones Capítulo 2	65

Capítulo 3 “Rol funcional de Sec3 y Sec8 en modelos de polaridad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ” -----	- 66 -
Resultados Capítulo 3 -----	- 67 -
1. Silenciamiento <i>in vitro</i> de Sec3 y Sec8 -----	- 67 -
2. Silenciamiento <i>in vivo</i> de Sec3 y Sec8 -----	- 71 -
Conclusiones Capítulo 3 -----	- 78 -
Discusión -----	- 79 -
Materiales y Métodos- diseño experimental -----	- 87 -
Referencias -----	- 99 -

RESUMEN ESPAÑOL

Las neuronas son células altamente polarizadas con dominios estructural y funcionalmente distintos llamados axones y dendritas. Esta polarización permite el flujo direccional de información en el sistema nervioso central, por lo que el establecimiento y mantenimiento de la polarización neuronal es crucial para el correcto desarrollo y la función. Los mecanismos de señalización subyacentes iniciales de establecimiento de la polaridad neuronal requieren de la formación de un axón funcional. Las señales iniciales que determinan la formación de esta prolongación son en parte desconocidas. Para que el proceso de especificación axonal sea posible son esenciales dos procesos interconectados: el ensamblado y estabilización del citoesqueleto y la expansión rápida de la membrana plasmática.

La expansión de membrana se produce por la fusión de vesículas precursoras de plasmalema (PPVs) en el cono de crecimiento, una estructura que lidera el axón. La fusión de las vesículas a membrana se encuentra regulada y es clasificada como parte de un proceso de exocitosis regulada con fines no secretorios. En este tipo de exocitosis, se presentan varios niveles de regulación que incluyen señales externas y mecanismos intracelulares. La exocitosis de PPVs se encuentra regulada por la estimulación externa del factor de crecimiento IGF1. Sin embargo, los procesos regulatorios de fusión de estas vesículas previos a la fusión se encuentran poco descriptos.

Previo al proceso de fusión, se ha demostrado que es necesaria una interacción física entre la vesícula que va a expandir la membrana y la membrana plasmática. Este proceso está mediado por complejos de *tethering*, cuyo rol activo en la polaridad neuronal aún se desconoce. Un complejo de *tethering* candidato para la regulación de la fusión de los PPVs es el complejo exocisto, del cual la composición total en neuronas aún es desconocida. El complejo exocisto es un complejo octamérico altamente conservado en diversas especies formado por las subunidades proteicas Sec3, Sec8, Sec5, Sec15, Sec10, Sec6, Exo84 y Exo70. Algunos indicios plantean que su rol en la polaridad neuronal sería esencial ya que en neuronas piramidales de hipocampo el IGF-1 desencadena que la subunidad Exo70 presente

en el complejo exocisto se trasloque a la membrana pudiendo ser este el primer paso en la formación del complejo. Además, el silenciamiento de Exo70 en neuronas piramidales de hipocampo inhibe la formación de axones.

En la presente tesis determinamos cuales de las proteínas del complejo exocisto están presentes en los cultivos de neuronas piramidales hipocampo desde estadios tempranos previos al proceso de polarización neuronal como así también la localización subcelular en conos de crecimiento y axones. Se ha logrado un gran progreso en nuestra comprensión de cómo las neuronas establecen su polaridad mediante el uso de neuronas del hipocampo cultivadas, mientras que los avances tecnológicos recientes han permitido el análisis *in vivo* de la especificación y elongación de los axones. En cuanto al estudio de su rol funcional en polaridad neuronal determinamos que dos proteínas de este complejo tienen efectos distintos en la diferenciación neuronal tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. El silenciamiento de Sec3 en cultivos de hipocampo y en experimentos de electroporación *in útero* provoca anomalías en la polaridad neuronal. En contraste, los efectos de suprimir Sec8 no incluyen defectos en la migración neuronal y la polaridad.

Todo esto demuestra que la regulación en pasos previos a la fusión de vesículas cuyo rol es la expansión de la membrana son necesarios para la polaridad neuronal.

RESUMEN INGLÉS

Neurons are highly polarized cells with structurally and functionally distinct domains called axons and dendrites. This polarization enables the directional flow of information in the central nervous system, thus the establishment and maintenance of neuronal polarization is crucial for proper development and function. The initial signaling mechanisms underlying the establishment of neuronal polarity entail the formation of a functional axon. The initial signs that determine the formation of this prolongation are partly unknown. Two interconnected processes are essential for the establishment of neuronal polarity: the assembly and stabilization of the cytoskeleton and the rapid expansion of the plasma membrane.

The membrane expansion is possible by the fusion of plasmalemma precursor vesicles (PPVs) in the growth cone, a structure that leads the axon. The fusion of the vesicles to the plasma membrane is regulated and is classified as part of a non-secretory regulated exocytosis. This type of exocytosis exhibits several levels of regulation that include external signals cues and intracellular mechanisms. The exocytosis of PPVs is regulated by the external stimulation of IGF1 growth factor. However, the regulatory processes of fusion of these vesicles prior to fusion remain elusive.

Prior to the fusion process, it has been shown that a physical interaction between the vesicle and the plasma membrane is necessary. This process is mediated by tethering complexes, whose active role in neuronal polarity is still unknown. A candidate of tethering complex for regulating the fusion of PPVs is the exocyst complex, of which the total composition in neurons is still unknown. The exocyst complex is an octameric complex highly conserved in several species formed by the protein subunits Sec3, Sec8, Sec5, Sec15, Sec10, Sec6, Exo84 and Exo70. Some indications suggest that its role in neuronal polarity is essential since in hippocampal pyramidal neurons, IGF-1 triggers the translocation of the Exo70 subunit present in the exocyst complex to the membrane. This might be the first step

in complex formation. In addition, the silencing of Exo70 in hippocampal pyramidal neurons inhibits the formation of axons.

In the present thesis we determine which of the proteins of the exocyst complex are present in the hippocampal pyramidal neuron cultures from early stages prior to neuronal polarization as well as the subcellular localization in growth cones and axons. Great progress has been made in our understanding of how neurons establish their polarity through the use of cultured hippocampal neurons, while recent technological advances have enabled in vivo analysis of the specification and elongation of axons. Regarding the study of its functional role in neuronal polarity, we determined that two proteins of this complex have different effects on neuronal differentiation in both in vivo and in vitro models. The silencing of Sec3 in hippocampal cultures and in utero electroporation experiments causes anomalies in neuronal polarity. In contrast, the effects of deleting Sec8 do not include defects in neuronal migration and polarity.

Abreviaturas

BDNF - Brain derived neurotrophic factor

CdC - Cono de crecimiento

CE - Complejo Exocisto

GCPs - Growth Cone Particles

IGF1- Insulin like growth factor-1

IP - Progenitor intermedio

IZ - Zona intermedia

MTs- Microtúbulos

NGF - Nerve growth factor

NSC- Células madre neuronales

PPV - Plasmalemal Precursor Vesicles

RGs- Glias radiales

SVZ - Zona Subventricular

TGF - Transforming growth factor

TGN - Trans Golgi Network

VZ - Zona Vetricular

INTRODUCCIÓN

[...] ¡Como el entomólogo a caza de mariposas de vistosos matices, mi atención perseguía, en el vergel de la substancia gris, células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental! [...]

Ramon y Cajal

1. La neurona y su morfología

La percepción del entorno que nos rodea podría reducirse, desde un punto de vista biológico, a la interiorización, procesamiento y respuesta frente a estímulos externos. Gran parte de este procesamiento y respuesta ocurre en el sistema nervioso central. Frente a un estímulo, la respuesta se presenta gracias a las conexiones establecidas entre las diferentes células del sistema nervioso que permiten la transmisión de señales entre células. La información fluye a través del sistema nervioso. Entender esta red partiendo de su funcionalidad sistémica resultaría una tarea difícil, por ello es conveniente comenzar el estudio desde una de las células que junto a la glía componen la unidad básica de este sistema; las neuronas.

Existen muchos tipos de neuronas, la gran mayoría presenta una característica morfológica común: la asimetría. La neurona presenta dos dominios distintos tanto a nivel estructural como funcional. Uno es el dominio axonal compuesto por un proceso largo y angosto con forma tubular que se extiende desde el cuerpo celular alcanzando distancias de micrómetros a metros. Generalmente este proceso no presenta ramificaciones, aunque no siempre, hasta el extremo terminal en el cual se ramifica varias veces [1, 2]. El otro dominio definido es el somato-dendrítico compuesto por un cuerpo celular, soma, del cual se extienden unas prolongaciones citoplasmáticas señaladas como dendritas. Estas extensiones son relativamente anchas y cortas y presentan una alta ramificación [3, 4]. Un axón transmite las señales a otras neuronas mediante la liberación de neurotransmisores. Las dendritas poseen receptores de neurotransmisores para recibir señales provenientes desde otras neuronas. La esquematización de los dominios determinados en los párrafos anteriores se muestra en la **Figura 1 A**.

El axón es liderado por el cono de crecimiento, una estructura que permite al axón interceptar señales extracelulares y transformarlas en movimientos mecánicos ameboides de avance y retracción. Los eventos de retracción y avance se dan debido a la estructura dinámica del citoesqueleto presente en el cono. La estructura del cono de crecimiento (CdC) se divide en tres dominios: central, transicional y periférico. Cada dominio posee disposiciones citoesqueléticas distintas de filamentos de actina (actina F) y microtúbulos (**Figura 1 B**). A lo largo del eje del axón, los microtúbulos están agrupados estrechamente dirigiendo sus

extremos positivos hacia el extremo axonal. Al llegar al dominio central del CdC, los extremos positivos se extienden libremente creciendo y encogiéndose hasta que entran en contacto con los arcos de F-actina ubicados en la zona de transición. La mayoría de los microtúbulos (MTs) solamente se extienden hasta el dominio central exceptuando a los “microtúbulos pioneros”, que se abren paso hacia el dominio periférico. Conjuntamente, en el dominio de transición la actina se agrupa densamente formando “arcos de F-actina” que actúan como barreras que evitan la extensión de los MTs. En el dominio periférico la actina orienta su extremo positivo hacia la membrana celular y el negativo hacia la zona central del cono de crecimiento. Los filamentos de actina presentan un estado de polaridad dinámica, es decir están en constante estado de polimerización en su extremo positivo y despolimerización en su extremo negativo. Así la dinámica de polimerización y despolimerización de la actina y junto a la de los microtúbulos lleva a los movimientos característicos de avance y retracción del cono [5].

La compartimentalización en dos dominios demarcados se conoce como polaridad celular. La polarización celular es crucial para el desarrollo y el correcto funcionamiento de muchos tipos de células, ya que genera asimetría morfológica y funcional en respuesta a señales intrínsecas y extrínsecas.

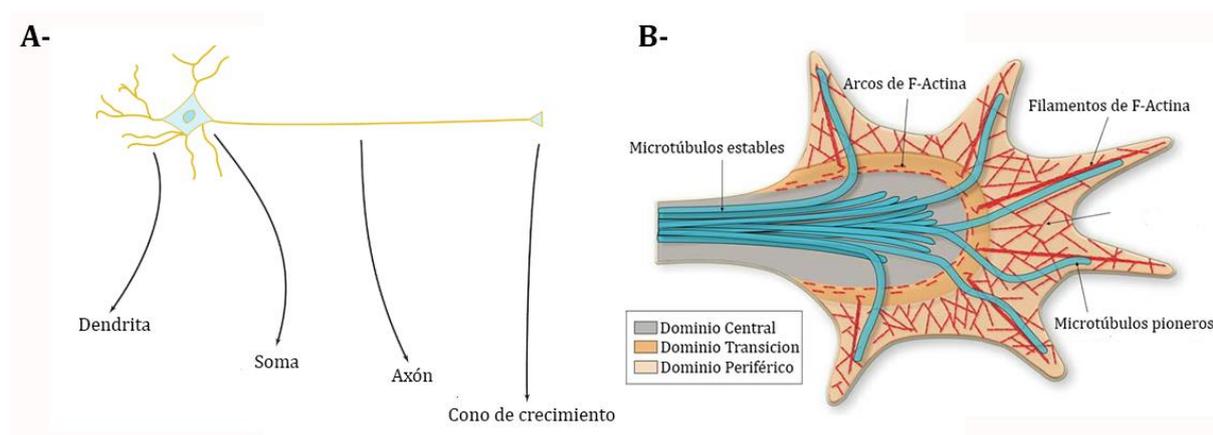


Figura 1- Morfología de la neurona. A- Ultraestructura de la neurona. Con flechas se indican aquellas estructuras características de las neuronas. (Imagen modificada de Levitan et.al. 2015 [3]). **B-** Ultraestructura del cono. Diferentes dominios del cono y organización de la actina (rojo) y microtúbulos (celeste). (Imagen Modificada de Cammarata et.al. 2016 [5])

2. La polaridad

El establecimiento de la polaridad puede explicarse como una sucesión de pasos en los que intervienen receptores, proteínas, factores solubles secretados, matriz extracelular y citoesqueleto que actúan de manera interrelacionada y que conllevan a la formación del axón. Existen una gran diversidad de estrategias en las células que permiten establecer los dominios somato-dendrítico y axonal.

El proceso de formación del axón puede ser generado por señales extracelulares, tales como los factores de crecimiento o por componentes de la matriz extracelular, como laminina y colágeno, capaces de activar diferentes cascadas de señalización que conducen a la distribución asimétrica de reguladores de polaridad [12]. Se necesitan numerosos factores que intervengan en el proceso de polaridad que permitan se activar varias cascadas de señalización a la vez. Luego esta señal es interpretada y amplificada por vías de señalización intracelular que dan como resultado la formación de distintos dominios subcelulares que difieren entre sí en composición de lípidos y proteínas. Aun cuando la célula no está morfológicamente polarizada la compartimentalización o segregación espacial de determinadas moléculas generan en primera instancia el re arreglo de la membrana y el citoesqueleto que permitirá el crecimiento rápido de una prolongación formando el axón [6]. Estos eventos se enumeran gráficamente en la **Figura 2**.

Es primordial comprender que la función de la neurona es transmitir información tanto intracelularmente entre los dominios que posee la neurona como también extracelularmente con otras células vecinas estableciendo conexiones sinápticas funcionales. Si bien la "conectómica" funcional tiene como objetivo proporcionar un mapa del cerebro humano, comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la conectividad neural es una pieza igualmente crítica. Para poder transmitir información entre el soma y el axón son necesarios ciertos requerimientos estructurales relacionados al re arreglo del citoesqueleto y la elongación rápida de membrana, así como bioquímicos ubicando en sitios específicos determinados receptores, proteínas y lípidos que permitirán brindar la respuesta celular. La interpretación y el establecimiento de los mecanismos moleculares del desarrollo neuronal requieren un sistema modelo simplificado [6]. Afortunadamente, las etapas del desarrollo

neuronal se pueden estudiar de manera eficiente en diversos modelos de polaridad ampliamente descritos.

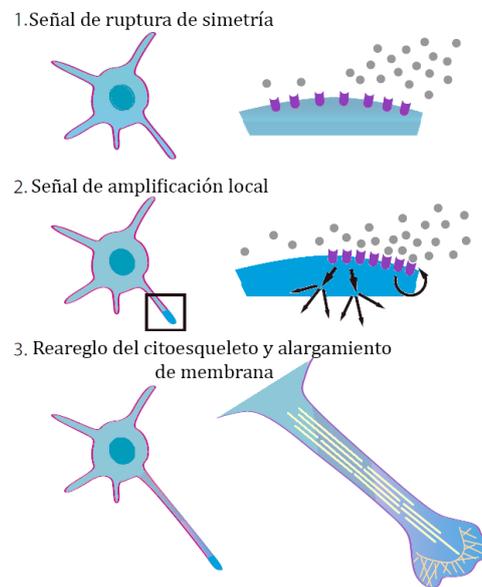


Figura 2- Fases en el establecimiento de la polaridad neuronal. El primer paso en la formación axonal es la exposición de la neurona no polarizada a señales que inducen la ruptura de la simetría (panel superior). Estas señales pueden ser externas o internas. En este punto la célula está expuesta a un gradiente poco profundo de esta señal. La segunda etapa involucra la amplificación local de la señal de polaridad, generando un dominio distinto en el extremo neurítico (panel central, región azul en la punta de una neurita). La amplificación puede ocurrir por la agrupación de receptores, así como por la activación y retroalimentación de las vías de señalización intracelular (esquematizadas en el panel central a la derecha). Finalmente, la ruptura morfológica de la célula es lograda mediante el reordenamiento del citoesqueleto e inserción acelerada de la membrana celular, que conducen al rápido crecimiento de una neurita transformándola en el axón (panel inferior). Modificado de Yogev et.al 2017

3. Modelos de estudio de la polaridad

Desde el punto de vista funcional una morfología neuronal deficiente sobrelleva a la pérdida total o parcial de respuesta frente a los diversos estímulos. Por ello estudiar la asimetría neuronal y los mecanismos que permiten lograrla establece un marco referencial para posteriores estudios o explicaciones de pérdida de funcionalidad.

El modelo por excelencia que ha brindado un progreso notable en las últimas décadas en el conocimiento de los mecanismos responsables de la polaridad neuronal de mamíferos es el trabajo realizado en neuronas de hipocampo de roedores en cultivo. En contraste, recientemente se han comenzado a explorar los modelos de polarización neuronal *in vivo*

donde las funciones de las moléculas de señalización extracelular e intracelular y sus efectores son estudiadas utilizando electroporación y ratones knock-out/knock-in. Cada modelo presenta sus ventajas ya que si bien el modelo *in vitro* es accesible y confiable para determinar los mecanismos involucrados en la polaridad, la formación de un axón puede ser un proceso más complejo *in vivo* y requerir modelos de estudio más competentes [7]. En la presente tesis utilizaremos como sistemas modelo el cultivo primario de neuronas piramidales de hipocampo de rata y la electroporación *in utero* de ratones.

En el modelo de cultivo primario de neuronas piramidales de hipocampo presenta la ventaja de ser homogéneo ya que casi el 90% de las células presentes son piramidales. Además, las células son relativamente fáciles de cultivar y pueden permanecer largos periodos de tiempo en este estado. Sin embargo, la ventaja más grande que presenta este modelo es que su crecimiento se encuentra temporalmente descrito en estadios estereotipados consecutivos que permite un marco referencial muy útil. Estos estadios se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1 [8]		
Estadio	Eventos predominantes	T.I.V
1- Avance y retracción de lamelipodia y filopodia	Posterior al plaqueo de las células aparece una estructura móvil en la periferia de la célula denominada lamelipodio. Esta estructura es particular de estos cultivos y no es observable <i>in vivo</i> . Esta estructura se agrega en pequeños cúmulos dando origen a los conos de crecimiento de las proyecciones que se formarán inmediatamente demarcando el comienzo del próximo estadio.	4 a 12h
2- Extensión de procesos menores	Se forman pequeños procesos de crecimiento que alcanzan un largo máximo de 10-15µm. Una vez que alcanzan este largo lo mantienen. A nivel morfológico estas proyecciones, llamadas neuritas, son equivalentes, aunque a nivel bioquímico y citoesquelético presentan diferencias.	12 a 18h
3- Formación y crecimiento del axón	Un cambio abrupto ocurre en este punto, el crecimiento de una neurita a una velocidad mayor que el resto. Esta neurita formará el axón con un largo entre 80-100 µm mientras que el resto de las neuritas mantiene su largo. Se considera que una neurona está polarizada cuando una de sus prolongaciones es 5 veces más larga que las restantes.	24 a 36h

<p>4- Crecimiento de las dendritas</p>	<p>Las neuritas que no formaron un axón pasaran a ser dendritas. En este punto las dendritas crecen, aunque a una velocidad mucho menor que el axón.</p>	<p>36 a 72h</p>
<p>5- Sinapsis funcional</p>	<p>En esta etapa se forman las espinas dendríticas en la membrana de las dendritas como también así sufren ramificaciones formando un tupido árbol dendrítico. Se establecen conexiones sinápticas capaces de transmitir señales.</p>	<p>Más de 7 días</p>

T.I.V: tiempo *in vitro*

Quizás debido a la falta de activación de algunas cascadas o la pérdida de factores las neuronas cultivadas *in vitro*, parecen representar un sistema a veces reduccionista donde las manipulaciones de algunas moléculas ya que a menudo conducen a múltiples axones o fenotipos sin axones [9]. Otra desventaja que se ha enfatizado a este modelo es concerniente al hecho que las neuronas plaqueadas ya son postmitóticas¹, es decir ya han polarizado, por lo que el proceso que se desarrolla en cultivo es estrictamente una repolarización pudiendo mantener estas células algunas características previas de polaridad [1].

Debido a estas desventajas, se han planteado diferentes modelos incluyendo la electroporación *in utero*. Este modelo plantea el estudio de las etapas presentes en la migración neuronal a lo largo de la corteza cortical teniendo en cuenta que para poder migrar las células deben poseer una correcta morfología celular. Para poder comprender este modelo se requiere el conocimiento del proceso de formación de neuronas, neurogénesis, en la corteza cerebral.

La corteza cerebral recubre los hemisferios de los cerebros y esta subdividida en capas. Originalmente las capas corticales fueron definidas por características anatómicas. Sin embargo, se ha demostrado que varios genes (en particular aquellos que codifican factores de transcripción o proteínas involucradas en la señalización sináptica) exhiben una clara expresión con patrón que delimita las capas corticales. Además, los tipos de células neuronales con diferentes patrones de proyección axonal mostraron una expresión génica diferencial que sugiere que la laminación cortical no es solo un concepto anatómico, sino que

¹ Neuronas postmitóticas. Estas neuronas quedan arrestadas en una fase celular G0, es decir no pueden replicarse.

refleja la segregación de diferentes tipos de neuronas en diferentes capas corticales [10]. Las neuronas presentes en la corteza cortical madura se acumulan en 6 capas cuya estructura se organiza temporalmente en un modelo denominado “*insight-out*” (“de adentro hacia afuera”) de modo que las neuronas primitivas pueblan capas neocorticales más profundas (VI, luego V), y las neuronas tardías emigran más allá de ellas para poblar progresivamente capas más superficiales (IV, luego II / III) [11]. Las células de la corteza cerebral pueden ser excitatorias o inhibitorias. En esta tesis nos limitaremos al estudio de las neuronas excitatorias que migran radialmente desde la zona ventricular hasta el plato cortical pasando por las diversas capas que presenta la corteza.

Dentro de las diversas células que pueblan la corteza, las células madre neuronales (NSCs) diferencian en lo que finalmente serán casi todas las células de la corteza. La mayoría de estas células se ubica en la zona denominada ventricular (VZ) donde se dividen simétricamente dando origen a otro tipo celular, las glías radiales (RGs). Estas sirven como guía para establecer la conformación espacial de la corteza teniendo una polaridad apico-basal donde extienden un proceso hacia la corteza y otro hacia el ventrículo. Las RGs pueden experimentar división simétrica u división asimétrica. La división asimétrica da origen a una glía radial y a un progenitor intermedio (IP). Estos IP, los cuales se ubican en la zona subventricular (SVZ), y toda su progenie se transforma en neuronas post mitóticas [12, 13]. De acuerdo con esto la neurona pasa por una serie de pasos estereotipados que pueden compararse de alguna manera a los desarrollados en cultivo *in vitro*. Primero, las neuronas recién formadas se ubican en la parte inferior de la zona intermedia (ZI) extendiendo múltiples neuritas presentando una morfología similar a la que presentan las neuronas cultivadas en estadio 2, por lo cual se las denomina células multipolares. La mayoría de las células multipolares se convierten en bipolares extendiendo tangencialmente el proceso que será el axón y luego generan el proceso principal, futura dendrita. Las células bipolares migran hacia la placa cortical (PC) y se convierten en neuronas piramidales maduras. La transición de multipolar a bipolar es un paso crítico de polarización neuronal *in vivo* [14].

En este modelo *in vivo* es importante destacar que las células deben migrar hasta ocupar su destino final presentando la característica que el proceso de polarización celular se alcanza durante esta migración. Aunque la polarización neuronal ocurre de manera concomitante con la migración neuronal, la forma en que estos dos procesos se coordinan sigue siendo difícil de

explicar. Los gradientes de factores tróficos secretados pueden estar involucrados en la migración direccional y el alargamiento del axón, en lugar de la especificación del axón *in vivo*. No obstante, a los fines de interpretación de este modelo, es posible proponer que un problema en la polaridad celular se puede manifestar en muchos casos con defectos en la migración neuronal.

Las ventajas que presenta este modelo en contraposición al cultivo de neuronas radica en la posibilidad de la manipulación de la expresión de genes en progenitores (es decir, antes de que se produzca la polarización neuronal en la salida del ciclo celular) mientras que permite visualizar las etapas más tempranas de la polarización neuronal en un entorno celular y molecular [15]. Debido a que una de las principales críticas del modelo clásico es la repolarización que atraviesan las células, el hecho que en el modelo *in vivo* las células progenitoras intermedias se desprenden de las superficies tanto apical como basal, por lo tanto, pierden su polaridad. Es pertinente destacar que las neuronas piramidales neocorticales se derivan de las células progenitoras intermedias no polarizadas, por ello no pueden heredar la polaridad y pueden formar morfologías multipolares [14].

En un resumen gráfico en la **Figura 3** se muestran los estadios de crecimiento de los dos modelos, junto a las principales aberraciones morfológicas que manifiestan defectos en la polaridad neuronal.

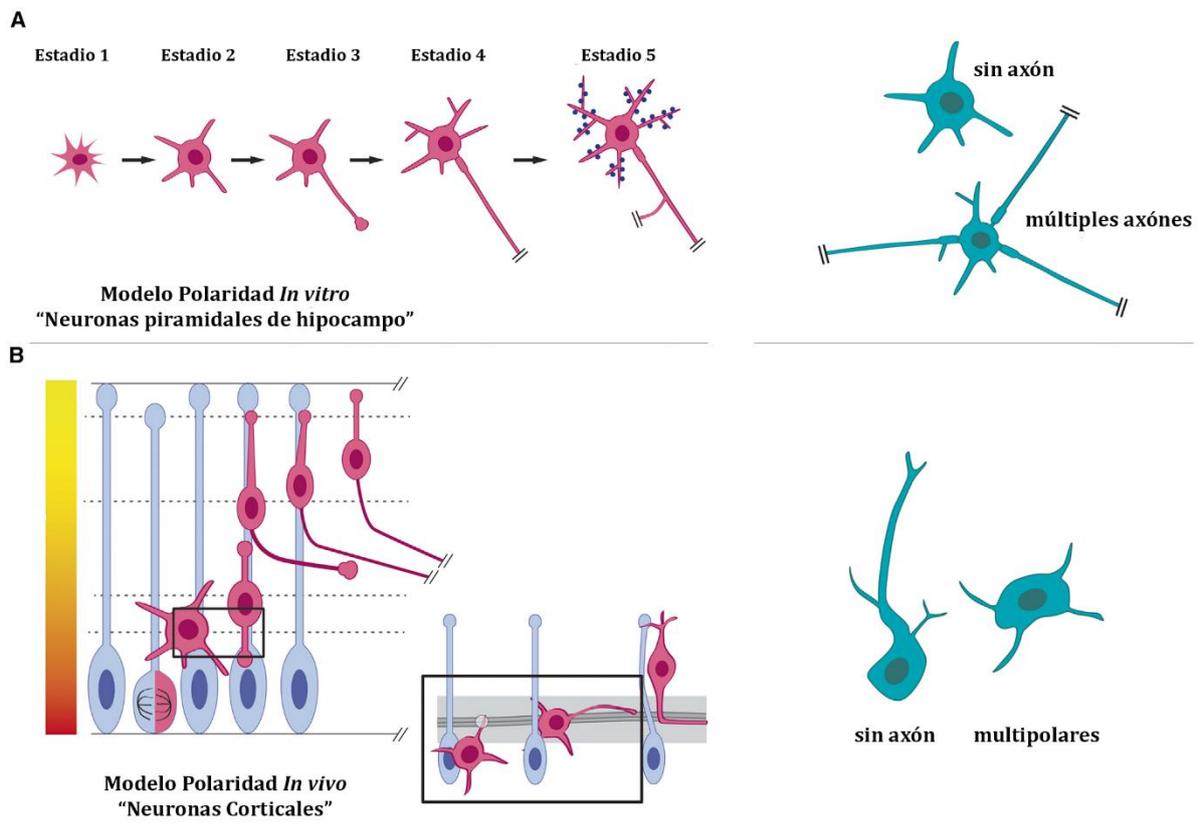


Figura 3- Polarización neuronal en diferentes sistemas experimentales. Los paneles de la izquierda con neuronas rosadas representan el desarrollo de tipo salvaje, mientras que los paneles de la derecha con neuronas verdes muestran ejemplos de fenotipos mutantes. **A-** Las neuronas de mamíferos cultivadas se someten a una diferenciación estereotipada después de la siembra (ver Tabla 1 para más detalles). **B-** Durante el desarrollo cortical en mamíferos, la polarización neuronal ocurre concomitantemente con la migración radial. Modificado de Yogev et.al 2017 [9].

4. La participación de IGF1 en eventos tempranos de polaridad neuronal

Durante el proceso de polarización neuronal y hasta obtener su forma madura, el axón experimenta un crecimiento neto mientras que las restantes dendritas experimentan eventos de crecimiento y retracción por igual, manteniendo su largo promedio [16].

Los axones durante el crecimiento necesitan ser guiados adecuadamente a sus objetivos para formar conexiones sinápticas, y esto requiere interacciones entre los ligandos transmembrana y extracelulares altamente conservados y sus receptores de la superficie celular [17]. Dentro de los ligandos que se unen a la membrana se encuentran los factores de crecimiento. Los factores de crecimiento son proteínas que regulan muchos aspectos de la función celular, incluidos la supervivencia, la proliferación, la migración y la diferenciación.

Algunos de los factores neurotróficos externos descritos en el crecimiento inicial de axones son el “factor neurotrófico derivado del cerebro” o también conocido como BDNF (del inglés: *brain-derived neurotrophic factor*), “factor de crecimiento nervioso” o NGF (del inglés: *nerve growth factor*), “factor de crecimiento transformante β ” o TGF- β (del inglés: *transforming growth factor type β*) y el “factor de crecimiento insulínico tipo 1”, IGF-1 (del inglés: *insulin-like growth factor-1*) entre otros. El entendimiento de los efectores involucrados en la cascada de señalización de cada uno de estos factores y el efecto final que poseen permite comprender como las neuronas logran esta especificación morfológica. La mayoría de los estudios sobre vías de señalización de crecimiento de axones se han centrado en el papel de estas vías en la reorganización del citoesqueleto local y la membrana plasmática en conos de crecimiento y axones [18].

Los factores neurotróficos han sido ampliamente estudiados, uno de estos factores resulta de especial interés para la presente tesis. El IGF-1 es un péptido activo liberado por muchos tejidos y afecta prácticamente a casi todas las células del cuerpo. El principal órgano sintetizador de IGF-1 es el hígado. Su principal acción es mediada por la unión a su receptor específico, el receptor de IGF1, abreviado como rIGF1. Este receptor es altamente expresado en el cerebro durante estadios embrionicos tardíos y posnatales tempranos; sus niveles bajan a basales en la adultez sugiriendo que su marco temporal de expresión está altamente relacionada a eventos tempranos del desarrollo como lo es la polaridad neuronal. El receptor de IGF1, es un hetero tetrámero ($\alpha_2\beta_2$, siendo las cadenas α los dominios extracelulares y los β transmembrana) con una variante inmunoquímica diferente enriquecida en el cono de crecimiento axonal llamada β_{gc} [19]. Para convertirse en activable, el rIGF-1 debe insertarse en la membrana plasmática neuronal y exponer los motivos de unión de IGF-1 al espacio extracelular.

Varios efectos de este receptor en la polaridad neuronal han sido ampliamente descritos por este laboratorio. La segregación de receptores activados a una neurita en particular en una neurona que aún no exhibe un axón discernible, demuestra una marcación bioquímica previa del que va a ser el futuro axón. En concordancia con estos resultados se ha descrito que en cultivos primarios transfectados con secuencias dirigidas para el silenciamiento del rIGF1 o en presencia de anticuerpos que bloquean este receptor, se exhibe una disminución en el

porcentaje de neuronas capaces de polarizar [20]. Estos resultados han centrado al IGF1 como un regulador de la polaridad neuronal.

Si bien la implicancia del IGF1 en la polaridad neuronal se explicó en el párrafo anterior las vías de señalización axonal específicas cuyos efectores son activables por IGF1 se describen a continuación. Una vía de señalización típica de especificación axonal procede de la siguiente manera. La activación de PI3K (fosfatidil inositol 3-quinasa) por estímulos externos genera la acumulación de su producto PIP3, lo que lleva al reclutamiento y activación de la proteína quinasa C atípica (aPKC) -PAR6-PAR3 o también llamado complejo de polaridad PAR, en la punta del axón en crecimiento[21]. Estudios previos del laboratorio determinaron que en neuronas piramidales de hipocampo a las que se le silenció el rIGF-1, la proteína PI3K activa que en condiciones fisiológicas normales presenta una localización preferencial en la porción distal del axón y el cono de crecimiento axonal, exhibe una distribución aberrante en el soma celular. Más aun, en las mismas condiciones, PAR3 que presenta una distribución análoga a PI3K es prácticamente indetectable en neuritas. Otros factores de crecimiento fueron evaluados, tanto BDNF como NSF no lograron revertir el efecto de deslocalización de estas dos proteínas cuando el rIGF1 se encontraba silenciado [20, 22]. Estas neurotrofinas "clásicas" si bien no estimulan directamente el crecimiento de la membrana axonal, activan el transporte distal y la acumulación del rIGF1 que contiene la subunidad β en el cono de crecimiento axonal, lo que permite el control de la expansión de la membrana por IGF1 [23]. En el caso de TGF β , la supresión de este factor a través de shRNA no tuvo efecto alguno en la polaridad neuronal en el modelo de cultivo primario (Nieto, A. Tesis Doctoral).

Resultados similares se obtuvieron en un modelo de electroporación *in utero*. La supresión de IGF1 impidió la correcta migración de las neuronas corticales de la región II/III, las cuales no desarrollaron axones maduros, en analogía a lo establecido en cultivo. Además en este mismo modelo, la sobreexpresión de PI3K constitutivamente activa en células silenciadas para rIGF1, permite restablecer el perfil migratorio indicando que las señales ambientales provenientes de IGF1 son traducidas vía PI3K [24].

En conjunto toda esta información proveniente de modelos *in vitro* e *in vivo* determina que el receptor de IGF1 es necesario para el establecimiento de la polaridad neuronal y su vía de activación es a través de PAR3/PI3K. Dentro de las células eucariotas, ciertas proteínas celulares desempeñan papeles conservados a través de los diversos tipos de células en la

polarización de la célula. Por ejemplo, al complejo PI3K/PAR3 se le ha atribuido una función conservada evolutivamente en la formación axonal. Esta vía de activación ha estado ampliamente descrita en fenómenos de remodelamiento de membrana y cambios en la dinámica del citoesqueleto permitiendo la elongación del axón [25]. De esta manera la influencia del IGF1 en la polaridad deben estar relacionados a estos dos fenómenos que permiten el crecimiento axonal.

- *El IGF1 y rol en el reordenamiento del citoesqueleto*

Muchos *targets* relacionados a la remodelación del citoesqueleto están relacionados a la señalización de la polaridad. Casi concomitantemente con las cascadas de señalización internas y externas de especificación axonal se podría establecer que el comienzo de la polaridad iniciaría con cambios en el citoesqueleto [26].

La actina y el citoesqueleto de microtúbulos se remodelan en gran medida durante el proceso de polaridad neuronal. El cono del futuro axón presenta una disminución en la estabilidad de la actina lo que permitiría reducir la obstrucción en el crecimiento de los MTs. Muchas proteínas relacionadas a la polaridad han demostrado tener una relación con la desestabilización del citoesqueleto de actina [27].

En cuanto a los microtúbulos, hay dos particularidades de estos que facilitan notablemente el reordenamiento del citoesqueleto que propicia el proceso de formación axonal. La primera particularidad se manifiesta en la polaridad que presentan los MTs exhibiendo un extremo positivo, que presenta un crecimiento rápido y un extremo negativo con muy poca capacidad de propagación. En los axones, todos los microtúbulos apuntan su extremo positivo hacia el cono de crecimiento axonal. Esto beneficia a dirigir el dinamismo del crecimiento en una sola dirección. Por otro lado, las neuronas contienen un conjunto de subunidades de tubulina libre y un conjunto de microtúbulos ensamblados. Estas dos poblaciones se intercambian dinámicamente entre sí, de modo que los microtúbulos se someten a ciclos de polimerización y despolimerización. En las células vivas, una cierta porción de los microtúbulos se estabiliza de tal manera que el intercambio de las subunidades con la tubulina libre es mucho más lenta [28]. La formación de MTs estables precede y predice la formación del axón y ha demostrado ser suficiente para la polaridad neuronal [29].

Para posibilitar el transporte de determinadas proteínas hacia el axón existe una super familia de motores moleculares, las kinesinas. Los MTs estables brindan una señal para kinesinas específicas para transportar su carga al futuro axón. Las kinesinas fueron descubiertas como motores de transporte intracelular anterógrado que convierten la energía química de la hidrólisis de ATP en trabajo mecánico permitiendo el desplazamiento sobre los MTs a los cuales están asociadas. Por ejemplo, Kinesina 1C transporta preferencialmente vesículas cargo sobre MTs estables las cuales pueden contener proteínas involucradas en la polaridad neuronal [30, 31]. La expresión silenciada de Kinesina 1C evita la inserción polarizada de rIGF1 en cultivos primarios de neuronas y, por lo tanto, la polarización neuronal. La interrelación de estos eventos parece estar sujeta al transporte de proteínas necesarias para la exteriorización de rIGF1; que al no poder ser transportadas por el motor molecular no permiten activar la maquinaria necesaria para la activación vía IGF1 [31].

- *EL IGF1 y su efecto en la expansión de membrana*

El proceso anabólico predominante de la neurona mientras sus neuritas se forman es la síntesis de membrana. De hecho, una sola neurita que se alarga a una velocidad de 1 mm por día requiere la adición a la membrana plasmática o plasmalema de 0,5 a 1 / μm^2 de membrana por minuto. Las vesículas de membrana recién formada se mueven por transporte axoplásmico desde los sitios de síntesis en el soma hasta cono de crecimiento. La inserción de membrana se da en la parte central del cono de crecimiento axonal. En esta zona del cono de crecimiento se encuentra un gran compartimento membranoso irregular lleno de vesículas, cuyo tamaño disminuye concomitantemente al traspaso de componentes de membrana a la superficie plasmática. Estos clústeres de vesículas han sido denominados como vesículas precursoras de plasmalema o PPVs por sus siglas en inglés (*Plasmalemmal Precursor Vesicles*) [32]. Existe un flujo de membrana selectivo incluso precedente a la diferenciación morfológica de un axón que se evidencia en la formación de un cono de crecimiento agrandado en una de las neuritas de las neuronas del hipocampo en estadio 2 [33].

Trabajos previos del laboratorio permitieron asociar por primera vez la exocitosis de PPVs a una señal específica. Estudios anteriores demostraron que la estimulación aguda con IGF1 en

neuronas piramidales promueve que los clústeres de PPVs observados en conos de crecimiento de neuronas piramidales de hipocampo se disiparan rápidamente [34]. Experimentos conjuntos demostraron que si se bloquea el efector cascada debajo de IGF1, la proteína PI3K, se inhibe la inserción de precursores de membrana. Se puede concluir que la activación de IGF1 vía PI3K tiene un rol fundamental en el control de la inserción de vesículas en la membrana. Este hallazgo fue fundamental para comprender la regulación de este proceso de crecimiento de membrana tan fundamental en la polaridad neuronal [22].

5. Regulación de la expansión de membrana durante la polaridad neuronal

La expansión de membrana plasmática requiere del transporte específico hacia el axón nascente. Por ello, la expansión de la membrana neuronal es única en términos de su gran escala, la larga distancia entre los sitios de síntesis y el crecimiento de las neuritas y la aparición de dominios de membrana distintos.

Las PPVs provienen desde la red trans-Golgi y son destinadas a través de transporte de MTs hacia la membrana plasmática cuyo destino final, como se nombró anteriormente, es la adición de nueva membrana que permite al axón expandirse. La inserción de membrana es un fenómeno determinante que debe estar altamente regulado temporal y espacialmente. El agrupamiento de PPVs en clusters cercanos a la zona de inserción de membrana sugiere que la expansión en el cono de crecimiento es un fenómeno regulado. Entre los estímulos que promueven la inserción de estas vesículas se define que pueden moverse hacia la membrana plasmática por la depolarización de K^+ o flujo de Ca^{2+} . Todos estos datos sugieren que la unión

Exocitosis: definición y clasificación

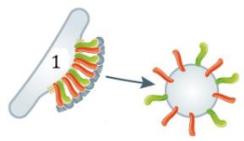
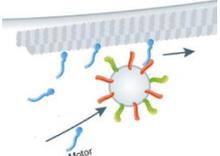
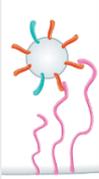
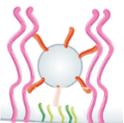
La exocitosis se define como la fusión de una vesícula de tráfico intracelular con la membrana plasmática.

Hay dos tipos de exocitosis: constitutiva y regulada. La exocitosis constitutiva es un proceso constante de producción, desplazamiento y fusión de vesículas, con diferente intensidad de tráfico según el estado fisiológico de la célula sin estar sujeta a cualquier regulación de corto término. La exocitosis regulada generalmente requiere que las membranas precursoras se almacenen en grupos intracelulares especializados desde los cuales se movilizan solamente tras la activación de las cascadas de señalización en respuesta a un estímulo.

Dentro de la exocitosis regulada tenemos aquella con fines secretorios y aquella con fines no secretorios. Aquella con fines secretorios permite liberar el contenido de la vesícula al espacio extracelular (por ej. las vesículas sinápticas). Aquella con fines no secretorios puede tener dos objetivos; transferir determinadas proteínas a la membrana plasmática o transferir simplemente la membrana de la vesícula para agrandar la superficie.

de estas vesículas a membrana forma parte del proceso conocido como exocitosis regulada con fines no secretorios.

El proceso de exocitosis se basa en un modelo de transporte vesicular el cual ha sido descrito de manera progresiva desde la formación de vesículas a la inserción final en cinco pasos que son descritos en la **Tabla 2** [35] [36].

Tabla 2	
<p>1. Formación y clasificación de vesículas</p> 	<p>La formación y clasificación de vesículas es mediada por proteínas de cubierta. Estas proteínas forman múltiples capas sobre las vesículas. Una capa incluye complejos de proteínas adaptadoras (PA) cuyo dominio transmembrana le permite reconocer y seleccionan moléculas cargo. Otra capa incluye proteínas de jaula (PJ). Las PJ se ensamblan en la superficie de la membrana para formar un andamio que recubre los complejos de carga AP. Esto combina la clasificación con la deformación de la membrana, lo que eventualmente conduce a la formación de vesículas recubiertas. La identidad de las proteínas de cubierta es el primer paso de clasificación de los diferentes grupos de vesículas. Las PPVs estas son formadas directamente desde la deformación de estructuras membranosas.</p>
<p>2. Transporte</p> 	<p>Las vesículas son transportadas de manera anterógrada a lo largo de los MTs por proteínas motoras. Otro grado de especificidad se da en este punto ya que diferentes kinesinas transportan vesículas con diferentes cargos. Como interaccionan los motores moleculares para poder realizar un transporte selectivo resulta un gran interrogante.</p>
<p>3. Acercamiento o Tethering</p> 	<p>Este proceso involucra la interacción inicial entre una vesícula y su membrana objetivo. Normalmente es una interacción laxa y física de larga distancia que permite un acercamiento y agrupamiento inicial cerca de los sitios de unión de la vesícula. Normalmente este paso es realizado por complejos multiprotéicos.</p>
<p>4. Prefusión</p> 	<p>Una vez que las vesículas están cerca necesitan la activación de complejos intermediarios que promuevan la fusión, es decir el cebado de la fusión. Existen muchos casos en los que alguna proteína del complejo de <i>tethering</i> tiene esta función de activación.</p>
<p>5. Fusión</p> 	<p>En este paso se genera la continuidad de las dos bicapas intervinientes. Las encargadas de mediar esta unión son un grupo de proteínas conocidas como SNAREs (del acrónimo del inglés: <i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment protein receptor</i>). Estas se ubican tanto en la membrana de la vesícula como de la membrana plasmática y se asocian generando un supererrollamiento y tensionando la vesícula contra la membrana dando como resultado la inserción de la vesícula.</p>

Imágenes modificadas de Rizzoli et. al. [37]

Se ha explicado anteriormente que el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1) es esencial para la inserción de vesículas y la expansión de membrana en el cono de crecimiento axonal, siendo éste un estímulo externo regulador. Un modelo para la regulación de la

expansión de membrana en el axón en crecimiento es planteado a continuación y ejemplificado en la **Figura 4**.

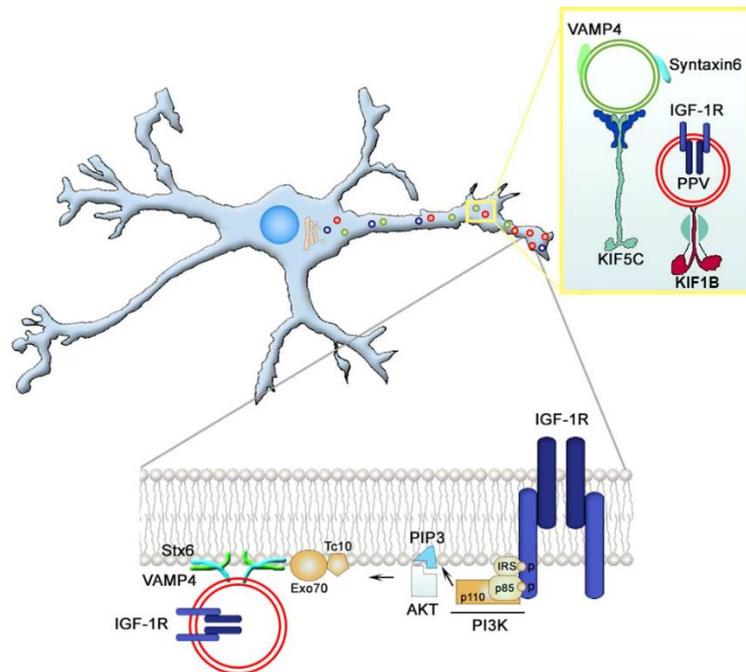


Figura 4 - Un modelo de la exocitosis de PPVs. En la imagen se explica el mecanismo de retroalimentación positiva planteado por el laboratorio desarrollando el dinamismo de rIGF1 en los diversos pasos de exocitosis hasta su exteriorización final.

La neurona en crecimiento sintetiza vesículas que contienen el receptor del factor de crecimiento tipo 1 (rIGF1) inserto en la membrana vesicular y se transporta al cono de crecimiento axonal mediante un mecanismo anterógrado dependiente del motor molecular KIF1B β (vesículas rojas) [38].

Claramente la regulación en neuronas de la inserción de PPVs no está solamente dada a nivel de transporte, sino se determinaron otros grupos de proteínas involucradas en los diversos pasos que abarca el proceso de exocitosis de estas vesículas. Una vez transportadas las vesículas requieren de la formación de un complejo de *tethering*. La formación de estos complejos requiere energía la cual debe ser suministrada de algún proceso. A lo largo de todo el proceso secretorio se ha involucrado a una familia de proteínas, las Rab como principal

suministro de energía [39]. El IGF1 estimula a una GTPasa de la familia de las Rab denominada TC10 la cual se trasloca a membrana. A su vez TC10 puede reclutar a otra proteína, Exo70 a la membrana plasmática siendo este uno de los primeros pasos de formación del complejo de *tethering* ya que esta proteína forma parte de un complejo de *tethering* altamente conservado, el complejo exocisto [40]. Estudios previos del laboratorio permitieron determinar las proteínas de fusión SNARE involucradas en la fusión de PPVs arribando a la conclusión que VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 son necesarios para la polaridad neuronal y la inserción polarizada del receptor IGF-1 [41]. De manera conjunta, el motor microtubular Kinesina 1C transporta las proteínas SNARE necesarias para la polaridad Stx6 y VAMP4 preferentemente a la neurita donde se enriquecen los microtúbulos estables (vesículas verdes) [31].

Todo esto origina un mecanismo de retroalimentación positiva que promueve la expansión de la membrana promoviendo la formación de complejos necesarios para la fusión vesicular y la inserción en la superficie celular de los componentes involucrados en la señalización de IGF1, incluyendo al mismo rIGF1. Este mecanismo se auto refuerza exponiendo más receptores de IGF1 a la superficie celular demostrando ser necesario para la especificación axonal y la polarización neuronal.

La principal conclusión del material revisado aquí es que la expansión de membrana en la neurona utiliza mecanismos celulares universales bien establecidos de la biogénesis de la membrana por la vía secretora, el transporte a la periferia de la célula y la inserción exocítica en sitios periféricos [23].

A pesar de las brechas que evidentemente permanecen en nuestra comprensión del mecanismo de inserción de la membrana en el cono de crecimiento, podemos extraer una serie de conclusiones a partir de la evidencia que se resume aquí: la expansión de membrana en el axón en crecimiento se produce principalmente en el cono de crecimiento a través de un mecanismo de exocitosis regulada que involucra el complejo exocisto y está regulado por IGF1.

6. El Complejo Exocisto

La exocitosis de PPVs se encuentra clasificada como exocitosis regulada con fines no secretorios. El análisis de la exocitosis regulada comenzó en estudios realizados en levaduras donde se caracterizaron diversos componentes involucrados en procesos de lo que después se conocería como *tethering*. Luego de la presentación de la hipótesis del transporte vesicular resultó pertinente estudiar los factores moleculares involucrados en tal proceso. Schekman y su equipo de investigación [42] identificaron 23 genes involucrados en la secreción de vesículas. Varios de los productos proteicos de estos genes tomaron el nombre de *sec* por secretorio o bien *exo* por exocitosis. Muchos de los resultados obtenidos en levaduras fueron coincidentes con los encontrados en células eucariotas ya que poseen un aparato secretorio de vesículas similar.

En primera aproximación de las etapas de regulación de la exocitosis se postuló que estaba mediada por la especificidad que presentan las proteínas de fusión localizadas en la membrana plasmática y la membrana vesicular. La fusión intracelular es mediada en todos los casos por complementos de proteínas SNAREs. Esta familia de proteínas posee un dominio C-terminal transmembrana tipo α -hélice muy conservado conocido como dominio SNARE cuyas características son hidrofóbicas. Solamente en el centro de este dominio se encuentra una excepción en la zona intermedia formada por cuatro cadenas laterales polares, incluidas tres glutaminas (Q) y una arginina (R). De acuerdo con su posición el dominio, los motivos SNARE se clasifican en Qa-, Qb-, Qc- y R-SNARE. Esto sugiere que cada complejo SNARE funcional tiene una composición de QabcR. En la exocitosis regulada en las neuronas, R-SNARE se localiza predominantemente en la vesícula, mientras que los Q-SNARE se concentran en la membrana plasmática, lo que indica que, en este caso, la membrana donante contribuye con el R-SNARE, mientras que los Q-SNARE funcionan como aceptores. Inicialmente se sostenía que el complemento entre la vesícula y su membrana target estaba dado y era suficiente por los complejos SNARE. No obstante, la formación de estos complejos no es lo suficientemente rápida comparada con los eventos de fusión rápidos como lo es el crecimiento de membrana y además la ubicación de estas proteínas en membrana celular muchas veces resultaba poco sectorizada para garantizar la fusión localizada. Por lo tanto, la especificidad debería estar dada en estadios previos a la reacción de fusión [43].

El *tethering* está definido como la de unión física muchas veces a distancias considerables entre dos membranas que están destinadas a fusionarse. Este proceso involucra muchos pasos, algunos antes y otros después de la formación de un complejo proteico estable que permita la interacción entre la membrana de la vesícula y la membrana *target*. Existen dos grandes grupos de moléculas involucradas en el anclaje, proteínas largas tipo espiral (normalmente asociadas al aparato de Golgi por lo que reciben el nombre de “golginas”) y complejos multiprotéicos de gran peso molecular compuestos por varias unidades. En el presente trabajo nos centraremos en los complejos de *tethering* multiprotéicos conformados por varias subunidades. Debido a la multiplicidad de pasos que requiere la formación de estos complejos resulta un *target* interesante para poder regular los procesos de inserción de vesículas.

Entre los complejos de *tethering* se han identificado 7 complejos altamente conservados en diferentes especies cuya localización y función se mantiene según las vesículas que transportan y entre que organelas destinan sus vesículas. El complejo exocisto (CE) es asociado a mediar la fusión de vesículas provenientes del TGN que serán insertadas en la membrana plasmática [44-49]. Como nombramos anteriormente, las PPVs son destinadas a la membrana plasmática desde la red trans-Golgi, por lo que el CE podría mediar el proceso de tethering de esta subpoblación de vesículas.

- *Estructura del complejo*

El exocisto pertenece a la familia de los complejos cuatrilobulares, es decir que la cantidad de subunidades que lo componen es múltiplo de 4. Está compuesto por 8 subunidades ordenadas de mayor a menor peso molecular: Sec3, Sec8, Sec5, Sec15, Sec10, Sec6, Exo84 y Exo70 y posee un peso aproximado de 734kDa. Las secuencias de homología entre las proteínas del complejo de mamíferos y levaduras son entre el 17% y el 24% y ambos complejos poseen 8 proteínas con pesos similares (entre los 70kDa y los 110kDa). Estos datos respecto a la conformación del complejo permiten demostrar que es altamente conservado entre levadura y células eucariotas.

Las estructuras cristalinas de las subunidades de exocisto muestran un motivo N terminal común de alfa hélices en tándem que permite formar estructuras terciarias similares a varillas

extendidas enrolladas entre sí sobre un eje común. Debido a estas características este complejo pertenece a los complejos “CATCHR” acrónimo proveniente del inglés por “*Complexes Associated with Tethering Containing Helical Rods*” [50]. Los estudios de microscopía electrónica del exocisto cerebral en mamíferos y los estudios bioquímicos predicen que las subunidades se agrupan juntas en el holocomplejo ensamblado. Las imágenes por *quick freeze electron microscopy* muestran que el complejo de exocisto fijado en glutaraldehído presenta una estructura en 'Y', con un cuerpo robusto alargado y dos brazos extendidos que sugieren que pueden conectar miembros que se unen para mediar su función de *tethering* putativa [51]. La forma de este complejo puede visualizarse en el *cartoon* de la **Figura 5**.

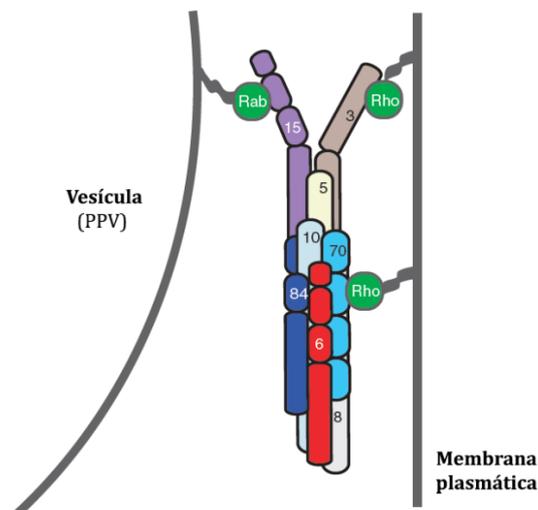


Figura 5- Modelo del complejo exocisto. Representación esquemática del complejo de exocisto de levadura, con la hipótesis de que cada una de las subunidades del exocisto tiene una estructura alargada de haz helicoidal y que se agrupan para formar una estructura en forma de Y. Las interacciones proteína-proteína utilizadas para crear este modelo se dan en la **Figura 7**. Modificado de Munson y Novick 2006 [51]

- *Dinámica de formación del complejo*

Los primeros estudios en levaduras involucraron a Sec3 como un marcador espacial para la exocitosis, ya que la localización de Sec3-GFP no se vio afectada por las alteraciones de la vía secretora, la actina y las proteínas del ciclo celular. No obstante, Sec3 no es suficiente para determinar y/o retener el complejo exocisto en sitios de secreción [52]. Por otro lado, Exo70-

GFP pareció utilizar tanto vías dependientes como independientes del tráfico de vesículas hacia sitios polarizados. El modelo propuso que las subunidades de Exo70 y Sec3 se localizaban en la membrana plasmática y se ensamblaban con el resto de las subunidades, aunque no está claro si el resto de las subunidades llegan individualmente o preensambladas. La existencia de sub complejos o monómeros libres conduciría a una mayor variedad de posibilidades funcionales y mecanismos de regulación de exocisto [46].

El ensamblaje de las subunidades en el complejo octamérico completo en el lugar y el momento adecuados aseguraría la especificidad espaciotemporal de un evento de anclaje de vesículas. El resto de las proteínas presentes en el complejo interactúan entre sí y han sido estudiadas en diversos organismos y por diferentes técnicas. Estas interacciones se encuentran resumidas en la **Figura 6**. El ensamblado de estas subunidades es altamente dependiente de un grupo de proteínas con actividad GTPasa, las Rabs. Estas proteínas permiten obtener la energía necesaria para que la formación de los subcomplejos y también el complejo final sea termodinámicamente posible. Estas también se especifican en la **Figura 6**

- *Localización del complejo*

La localización del CE se ha descrito en diversos tipos celulares de varios organismos. El comienzo del estudio del complejo comenzó en levaduras. En este modelo, se describió que algunas de las proteínas del CE se encontraban en sitios de rápido crecimiento de membrana. En otros modelos de células eucariotas, como las células epiteliales polarizadas, se demostró la presencia en sitios de contacto célula-célula y el extremo distal de los procesos de motilidad celular también se observó concentración de proteínas del exocisto [53, 54]. El exocisto en plantas se localiza en los extremos en crecimiento de los tubos de polen, las puntas del cabello de la raíz y la placa celular para la división [55, 56].

La localización del complejo en sitios de crecimiento prominente ayudó a definir rápidamente el rol del complejo en la adición de membrana. Por ello rápidamente resultó de interés estudiar un modelo por excelencia donde la adición de membrana debe sucederse rápidamente: la neurona.

	Interacciones entre subunidades		Interacción con GTPasas	
	Levadura	Animal	Levadura	Animal
Sec3	Sec5p (ref. 1) ^{a,b}	Sec5 (ref. 2) ^a Sec8 (ref. 2) ^a	Rho1p (ref. 7) ^c Cdc42p (ref. 8) ^c	
Sec5	Sec3p (ref. 1) ^{a,b} Sec6p (ref. 1) ^b Sec10p (ref. 1) ^a Exo84p (ref. 3) ^a Exo70p (ref. 1) ^b	Sec3 (ref. 2) ^a Sec6 (ref. 2) ^a Exo84 (ref. 40) ^a		RalA/B (ref. 9, 10) ^{a,c}
Sec6	Sec5p (ref. 1) ^b Sec6p (ref. 17) ^c Sec8p (ref. 5, 1) ^{b,c} Sec10p (ref. 5) ^c Exo70p (ref. 4) ^c	Sec5 (ref. 2) ^a Sec8 (ref. 2 , 6) ^{a,c} Sec10 (ref. 6) ^c Exo70 (ref. 2) ^a		
Sec8	Sec6p (ref. 5, 1) ^{b,c} Exo70p (ref. 4) ^c	Sec3 (ref. 2) ^a Sec6 (ref. 2 , 6) ^{a,c} Sec10 (ref. 2 , 6) ^{a,c} Exo70 (ref. 6) ^c		
Sec10	Sec5p (ref. 1) ^a Sec6p (ref. 5) ^c Sec15p (ref. 1) ^{a,b} Exo70p (ref. 4) ^c Exo84p (ref. 3) ^a	Sec6 (ref. 6) ^c Sec8 (ref. 2 , 6) ^{a,c} Sec15 (ref. 2) ^a Exo70 (ref. 6) ^c		Arf6 (ref. 11) ^a
Sec15	Sec10p (ref. 1) ^{a,b}	Sec10 (ref. 2) ^a Exo70 (ref. 2) ^a Exo84 (ref. 2) ^a	Sec4p (ref. 1) ^{a,b}	Rab11 (ref. 12) ^{a,c}
Exo70	Sec5p (ref. 1) ^b Sec6p (ref. 4) ^c Sec8p (ref. 4) ^c Sec10p (ref. 4) ^c	Sec6 (ref. 2) ^a Sec8 (ref. 6) ^c Sec10 (ref. 6) ^c Sec15 (ref. 2) ^a Exo84 (ref. 2) ^a	Rho3p (ref. 14) ^{a,c}	TC10 (ref. 13) ^a
Exo84	Sec5p (ref. 3) ^a Sec10p (ref. 3) ^a	Sec5 (ref. 40) ^a Sec15 (ref. 2) ^a Exo70 (ref. 2) ^a		RalA/B (ref. 15,,16) ^{a,c}

a. Estas interacciones se determinaron con ensayos doble híbrido en levadura
b. Se detectaron estas interacciones proteína-proteína por coimmunoprecipitación de proteínas de reacciones de transcripción-traducción in vitro o por reticulación de las dos proteínas en lisados
c. Estas interacciones proteína-proteína se detectaron utilizando proteínas recombinantes purificadas en ensayos de extracción.

Figura 6 -Interacciones entre las subunidades del complejo exocisto y las GTPasas asociadas a su interacción. Esta información ha sido recopilada de los siguientes trabajos. 1-[57], 2-[58], 3-[59], 4-[60], 5-[61], 6-[62], 7-[63], 8- [64], 9-[65],10- [66], 11-[67], 12-[68], 13-[69],14-[70], 15-[71],16-[72]. Modificado de Munson y Novick 2006 [51]

- *El complejo exocisto en neuronas*

Si bien se ha descrito la presencia de proteínas del complejo exocisto en diversos tipos celulares, casualmente la mayor concentración del CE está dada en el cerebro donde hay una gran cantidad de células polarizadas [73]. En neuronas piramidales de hipocampo Sec6 y Sec8 se observó en dominios periódicos a lo largo del axón coincidentes con marcadores vesiculares[74]. En células PC12, un modelo ampliamente utilizado para el estudio del desarrollo neuronal y diferenciación, presentó la misma marcación de Exo70 en células diferenciadas que en cultivo de hipocampo ubicándose en locaciones discretas a lo largo del axón. Además, determinaron que en fraccionamientos subcelulares de estas células Sec8, Sec6 y Exo70 presentaban una localización subcelular coincidente con Tubulina [62].

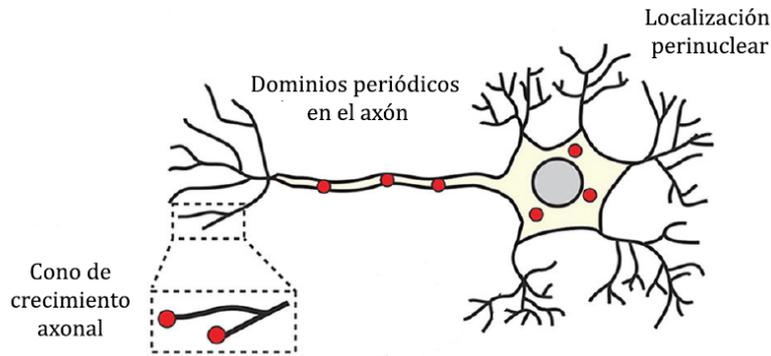


Figura 7- Sitios de localización preferencial de lagunas proteínas del CE en neuronas. En puntos rojos se demuestra que la localización preferencial del complejo en neuronas en el soma es perinuclear mientras que en el axón se encuentra en localizaciones discretas a lo largo del mismo y en cono de crecimiento axonal. Modificado de Martin-Urdinoz et.al. (2016) [75]

Más allá de la localización subcelular en neuronas algunos estudios a nivel funcional permitieron exponer al CE como una pieza fundamental en la polaridad neuronal. En neuronas corticales el silenciamiento de algunas proteínas del complejo como, por ejemplo, Sec6 y Exo84 demostraron que las neuronas se veían imposibilitadas de polarizar. Es interesante que en el caso de Exo84 la neuritas arrestadas en estadio 2 presentaban una longitud mayor [76]. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que el silenciamiento de Exo70 en neuronas piramidales de hipocampo impide la formación de un axón. **(Figura 8).**

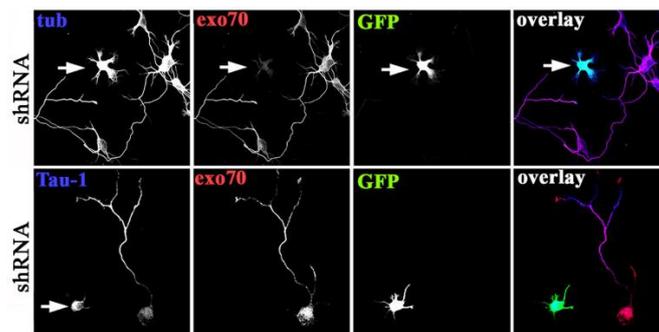


Figura 8- Silenciamiento de Exo70 en neuronas piramidales. Micrografías de triple inmunofluorescencia de neuronas del hipocampo (36 h en cultivo) que muestran las distribuciones de tubulina tiosinada (azul), Exo70 (rojo) y el marcador de transfección GFP. Las neuronas se transfectaron con shRNA dirigido. La neurona transfectada con shRNA no desarrolló un axón (la flecha indica la célula arrestada en estadio 2). En la segunda hilera, se muestra la distribución de tau-1 (azul), Exo70 y GFP como marcador de transfección. Tenga en cuenta la falta de enriquecimiento de Tau-1 en cualquier neurita de la neurona suprimida por Exo70 (flecha; segunda fila desde la parte superior).

En cuanto a las vías de especificación axonal que están relacionadas con el CE se encuentran descritas de manera incompleta. En levaduras se demostró que la deslocalización de algunas subunidades del complejo afectaba en la localización de Par3 resultado coincidente con el observado en neuronas indicando que posiblemente también en neuronas las vías de señalización del exocisto estén relacionadas a las mismas que en levadura [76]. Resultados previos de nuestro laboratorio son coincidentes con estos resultados ya que demostraron que en neuronas de hipocampo la estimulación con IGF1 activa la translocación de la GTPasa TC10 a membrana reclutando en su paso a Exo70. Exo70 trasloca a membrana siendo este uno de los posibles primeros pasos de formación del complejo (**Figura 9**) [40]. La respuesta frente al estímulo de IGF1 es un fuerte punto de partida en nuestras investigaciones ubicando en centro de la discusión la formación de este complejo a expensas de estímulos relacionados a la polaridad.

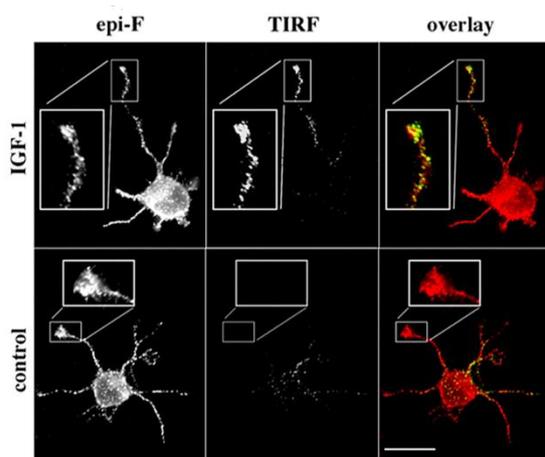


Figura 9- Micrografías de inmunofluorescencia de exo70 en neuronas del hipocampo. Las imágenes de epifluorescencia (epi-F) y TIRF revelan exo70 total y asociada a membrana plasmática, respectivamente. Las imágenes TIRF muestran un aumento sustancial en la etiqueta exo70 en el cono de crecimiento y un tercio distal del axón después de IGF-1 estímulo. Barra de escala, 20 m.

Definitivamente la información recabada sobre el CE en neuronas no es particularmente extensa, pero se han realizado avances valiosos que sirven como punto de partida en investigaciones futuras ya que la presencia y composición total en neuronas, así como su rol en la polaridad neuronal resultan elusivos. Primero, es importante comprender si la función del exocisto es únicamente mantener las vesículas ligadas a los sitios exocíticos, facilitando así la exocitosis de forma pasiva, o si cumple una función más activa, como regulador de manera directa o indirecta de la polaridad neuronal. Una estrategia para comenzar a estudiar el rol del exocisto en la polaridad neuronal es cada subunidad por separado teniendo en cuenta que la funcionalidad que cumplen en el ensamble del CE puede determinar su importancia en los procesos de polaridad neuronal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

“El científico no es aquella persona que da las respuestas correctas, sino aquél quien hace las preguntas correctas”.

Claude Lévi-Strauss

Hipótesis

Las subunidades que forman el complejo exocisto poseen roles esenciales en el establecimiento de la polaridad neuronal interviniendo en la formación axonal a través de la regulación de la adición de membrana.

Objetivos

► General

Evaluar el rol de las subunidades del complejo exocisto en el establecimiento la polaridad neuronal.

► Específicos

1- Confirmar la **expresión** de las subunidades del complejo exocisto **en neuronas** piramidales de hipocampo.

2- Definir la **localización subcelular** de las proteínas del complejo exocisto presentes en neuronas.

3- Determinar mediante silenciamiento dirigido el **rol funcional** en la diferenciación neuronal de Sec3 y Sec8 en dos modelos de polaridad neuronal.

RESULTADOS

Los resultados de la siguiente tesis serán presentados en 3 capítulos desarrollados a continuación. Luego de cada capítulo se enumerarán las conclusiones parciales.

Capítulo 1

“Expresión de las subunidades del
complejo exocisto en neuronas”

¿Qué proteínas del CE están presentes en neuronas?

¿En qué marco temporal se expresan las proteínas del CE?

Resultados Capítulo 1

En levaduras Sec3 se ha descrito como un marcador temprano de los sitios de formación del complejo siendo su localización independiente del tráfico vesicular [52]. Además, se ha descrito que esta proteína tiene interacción con la proteína Sso2, integrante de un complejo SNARE, y promueve la interacción de ésta con Sec9 en la formación del complejo. Esto hace que Sec3 sea un candidato en la regulación de la expansión de membrana mediada por PPVs [77]. Sec8 ha sido caracterizado en células MDCK por reclutar vesículas dirigidas a la membrana polarizada baso lateral pero no a la apical [78]. Finalmente, Sec5 posee un papel importante en unir Sec3 y Sec8; siendo este componente el nexo entre muchas otras interacciones proteicas dadas en el CE de levadura. También Sec5 sería una proteína *target* efectora de Ral, una GTPasa que tendría gran influencia en la formación del complejo [65]. Bajo este marco teórico que indica un rol distintivo que presentan estas proteínas en el complejo, el estudio de Sec3, Sec8 y Sec5 es el punto de partida para determinar el rol de estas subunidades en la polaridad neuronal. Además, debido a que Exo70 es parte del complejo exocisto y presenta un rol esencial en la polaridad neuronal como se han descrito en la introducción de la presente tesis, será utilizada como control interno respecto al comportamiento de las otras proteínas.

La polarización neuronal es un fenómeno restringido espacial y temporalmente; las proteínas involucradas en este fenómeno deben estar presentes en localizaciones discretas relacionadas a la polaridad (como el axón y el cono de crecimiento) y expresarse en el momento en el cual se suscitan los eventos de polaridad. Bajo la premisa aquellos componentes del CE involucrados en la polarización deben correlacionarse con el marco temporal de los eventos de polaridad, se evaluó la expresión cultivos primarios de neuronas piramidales de hipocampo (Ver Materiales y Métodos, [8]), cuya técnica se explica gráficamente en la **Figura 10**.

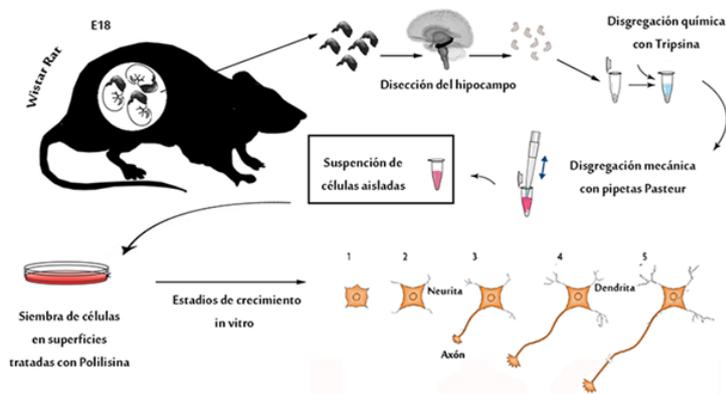


Figura 10 - Esquema explicativo del diseño experimental de la técnica Cultivo Primario de Neuronas Piramidales de Hipocampo. Partiendo de ratas *Wistar* preñadas de 18 días de gestación, se extrae los cerebros de los embriones. Se extirpa el hipocampo, el cuál es digerido mecánica y químicamente para obtener células aisladas. Las células son sembradas en el medio correspondiente en el cual establecen estadios de crecimiento estereotipados explicados en la Tabla 1 en la introducción de la presente tesis.

Para definir el marco temporal de expresión las células de cultivos primarios fueron cosechadas a diferentes tiempos correspondientes a los diferentes estadios de crecimiento, 12h (estadio2), 24h (estadios3), 36h y 72h (estadio 4) (**Figura 11**).

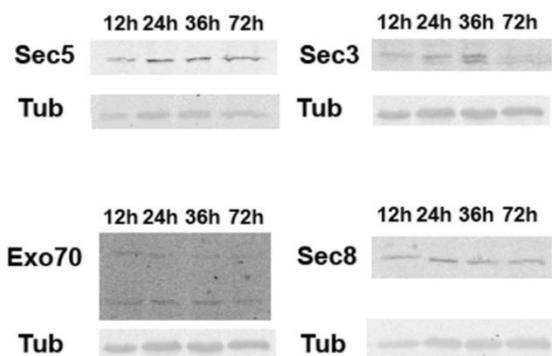


Figura 11 – Las proteínas del CE, Sec5, Sec3, Exo70 y Sec8 se expresan desde estadios tempranos de crecimiento neuronal. *Western Blot* de homogenatos obtenidos a partir de células totales de hipocampo a diferentes tiempos de cultivo. Las membranas fueron inmunomarcadas con anticuerpos primarios dirigidos contra las diferentes proteínas (panel superior) y anti-Tubulina (panel inferior) como control de carga y posteriormente con anticuerpos secundarios aptos para fluorescencia del infrarrojo cercano. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises e invertidas.

Desde estadios tempranos previos al establecimiento de la polaridad neuronal (12h) se observan niveles detectables de expresión de las cuatro proteínas estudiadas, así como también en estadios recientemente polarizados (24h y 36h). Tanto Sec5, Sec3 y Sec8 presentan niveles proteicos detectables que permiten situar estas proteínas temporalmente en el momento que la polarización ocurre en estas células.

De manera complementaria demostramos la expresión de Sec5, Sec3 y Sec8 en neuronas piramidales de hipocampo en estadios de crecimiento no polarizados (Estadio 1 y 2) como en estadios polarizados (Estadio 3) a través de inmunofluorescencias. Estos resultados permiten determinar además la localización subcelular de estas proteínas en la neurona.

En las inmunofluorescencias se utilizaron marcadores de citoesqueleto tales como tubulina β III, una clase de tubulina presente en neuronas primordialmente [79] o Tubulina tirosinada junto con la proteína de interés. Las células fueron fijadas a diferentes tiempos de crecimiento y basándonos en características morfológicas (ver **Tabla 1**) identificamos células en diferentes estadios.

En la **Figura 12** se muestra las inmunofluorescencias de Sec5 y Tubulina β III para los diferentes estadios de crecimiento. Sec5 se encuentra presente en Estadio 1 y 2 de crecimiento de manera coincidente a la expresión de esta proteína obtenida por *Western Blot* a las 12h. Se observó que también se expresa en Estadios 3. De manera complementaria a lo obtenido por técnicas bioquímicas demostramos que Sec5 se encuentra presente en neuronas desde estadios no polarizados.

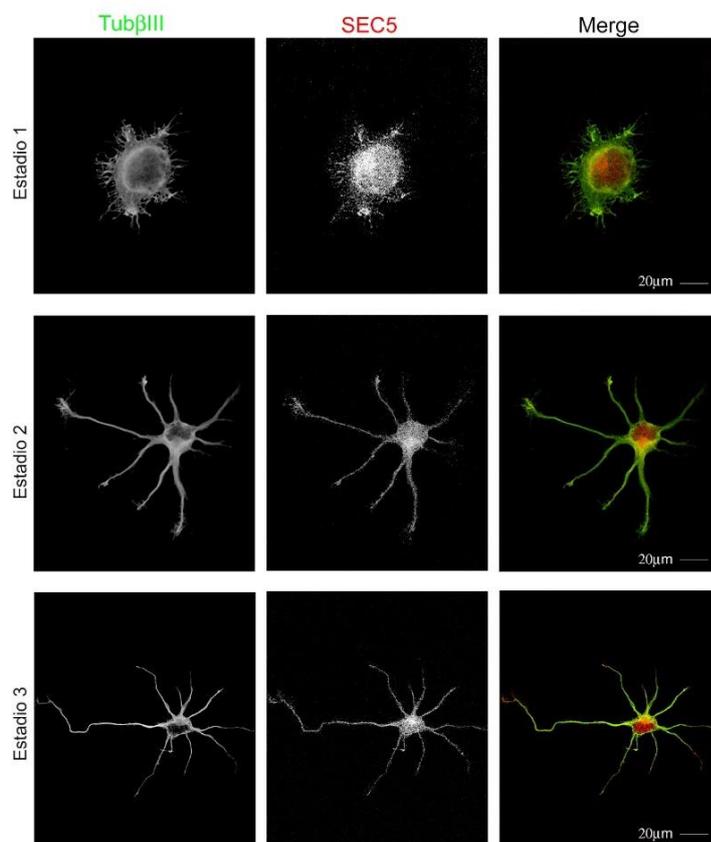


Figura 12- Sec5 se encuentra presente desde estadios tempranos de crecimiento en localizaciones poco discretas de la neurona. Neuronas de hipocampo de rata fijadas en diferentes estadios y marcadas con anticuerpos anti-Sec5 (rojo) y anti-tubulina β III (verde). Barra de referencia: 20 μ m.

En cuanto la localización subcelular de Sec5, podemos señalar que en células en estadio 1 se localiza en el soma celular de manera predominantemente perinuclear, marca que se mantendrá en los estadios subsiguientes. Esta marca perinuclear esta descrita para otras proteínas del CE en otros tipos celulares, en concordancia con el TGN [75]. Esto podría presentar importancia ya que, como presentamos anteriormente las PPVs parten del TGN hacia la membrana. Además, la distribución proteica de Sec5 en estadio 1 muestra cúmulos discretos donde luego podrían comenzar a desarrollarse las prolongaciones. Sec5 se encuentra presente tanto en el soma celular como en las neuritas presentando una distribución uniforme a lo largo de toda la prolongación en células en estadio 2. En estadio 3 esta proteína se encuentra presente en axón como así también en las neuritas remanentes. En conclusión, si bien Sec5 se encuentra presente en neuronas piramidales de hipocampo de estadios tempranos no se determinó que presentara alguna localización preferencial.

La expresión de Sec8 en los estadios de crecimiento neuronal (**Figura 13**) es coincidente a la mostrada en la figura 11. Sec8 se encuentra presente en Estadio 1 y 2 de crecimiento de manera coincidente a la expresión de esta proteína obtenida por *Western Blot* a las 12h. Se observó que también se expresa en Estadios 3.

A diferencia de Sec5, las células inmunomarcadas con Sec8 en estadio 1 demostraron un fenotipo punteado el cual se correlaciona con estructuras multivesiculares. Aunque si se observó una localización perinuclear tal como la descrita con Sec5 no se observó la acumulación de cúmulos discretos en la membrana en estadios 1.

Sec8 en células en estadios 2 presenta una localización tal como Sec 5 tanto en el soma celular como en las neuritas presentando una distribución uniforme a lo largo de toda la prolongación. Sin embargo, Sec8 se encuentra presente en el cono de crecimiento (CdC) (indicado con una flecha en la Figura 13). En una imagen ampliada de este cono notamos que se expresa primordialmente en el dominio central y transicional. Este resultado fue de interés debido a que el cono de crecimiento es un sitio de prominente adición de membrana de modo que si Sec8 está involucrada con este fenómeno resulta indispensable su presencia en el CdC. En estadios polarizados, estadio 3, vemos que Sec8 se ubica tanto en el axón como en las neuritas remanentes y la localización en el CdC se mantiene como en el estadio 2. Es

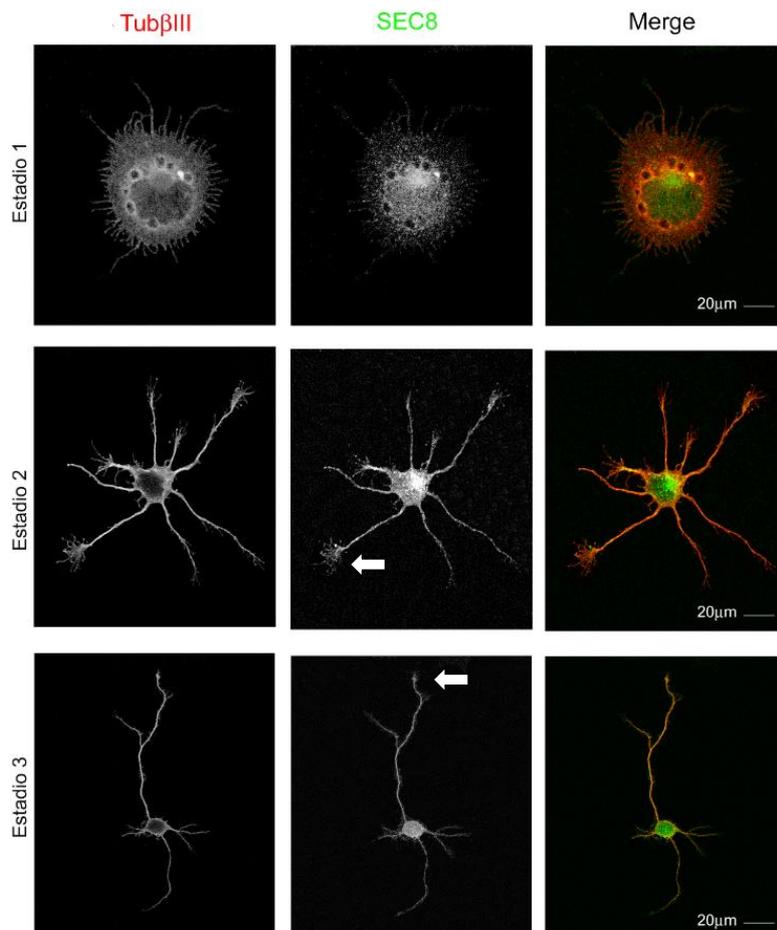


Figura 13- Sec8 se encuentra presente desde estadios tempranos de crecimiento en localizaciones discretas de la neurona. Neuronas de hipocampo de rata en diferentes estadios a marcadas con anticuerpos anti-Sec8 (verde) y anti-tubulina β III (rojo). Flechas, localización en el cono de crecimiento. Barra de referencia: 20 μ m. Imagen superior ampliación del CdC de estadio 2.

pertinente aclarar respecto al CdC, que éste siempre presenta un mayor tamaño en estadio 2 que en estadio 3. Esto se debe a que el paso de estadio 2 a 3 requiere una inserción rápida de membrana en el cono mucho mayor a la que se da en el estadio 3 una vez formado el axón. Si bien las diferencias con la localización de Sec5 son sutiles la localización de Sec8 en el CdC es un resultado interesante.

Finalmente, la localización subcelular de Sec3 es mostrada en las **Figuras 14 y 15**. La expresión de Sec3 en los estadios de crecimiento neuronal es coincidente a las mostrada en la figura 11 estando presente en estadios 1,2 y 3.

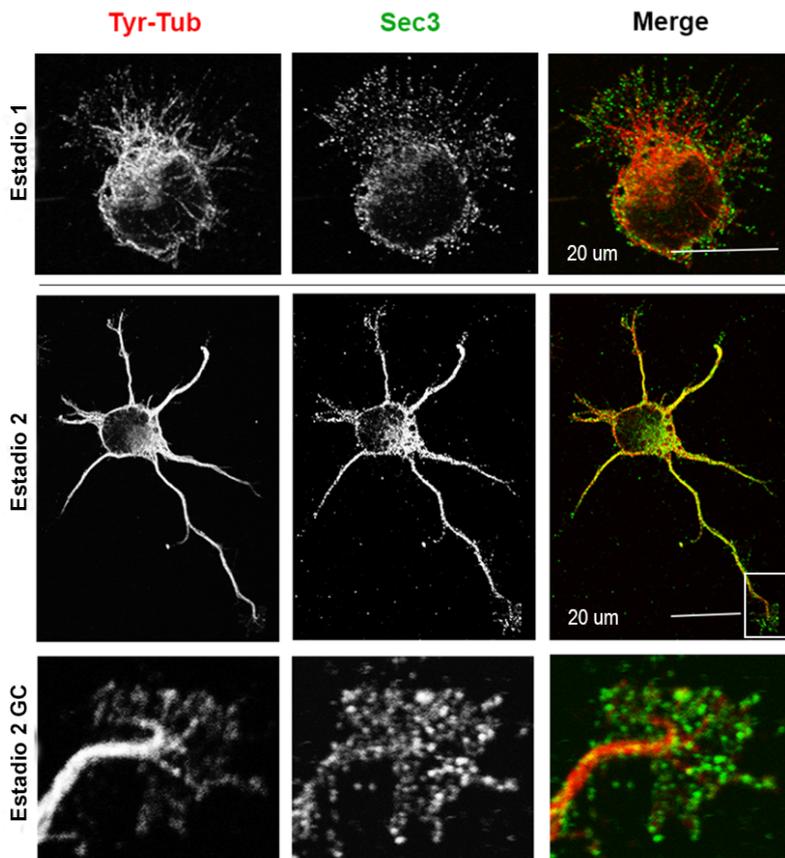


Figura 14- Sec3 se encuentra presente desde estadios tempranos de crecimiento enriquecida en el cono de crecimiento de neuritas y axón. Neuronas de hipocampo de rata fueron fijadas a diferentes tiempos y marcadas por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Sec3 (verde) y anti-tubulina tirosinada (rojo). Barra de referencia: 20 μm .

De manera análoga a lo observado en el patrón de distribución de Sec8, en estadio 1 la distribución proteica de Sec3 es primordialmente punteada característica que comparten Sec3 y Sec8, aunque no Sec5. En estadio 2, además de presentar una localización perinuclear en el cuerpo celular se puede observar una distribución en neuritas de manera coincidente con el patrón de distribución de Sec5 y Sec8.

Similar a Sec8, Sec3 se expresa en conos de crecimiento de células en estadio 2 aunque presentó un patrón levemente diferente que Sec8. El marcador celular utilizado en estos estudios de inmunofluorescencia es tubulina tirosinada, una variante de tubulina caracterizada por presentar un gran dinamismo que se encuentra presente en los MTs pioneros descritos anteriormente. La marca obtenida en el cono de crecimiento de estadio 2 de Sec3, la cual no solamente se muestra enriquecida, sino demuestra un patrón de distribución coincidente con los MTs pioneros (ver recuadro en la magnificación del CdC del estadio 2). Esta localización característica en el cono de crecimiento se mantuvo en estadio 3, siendo menos evidente por el menor tamaño del cono.

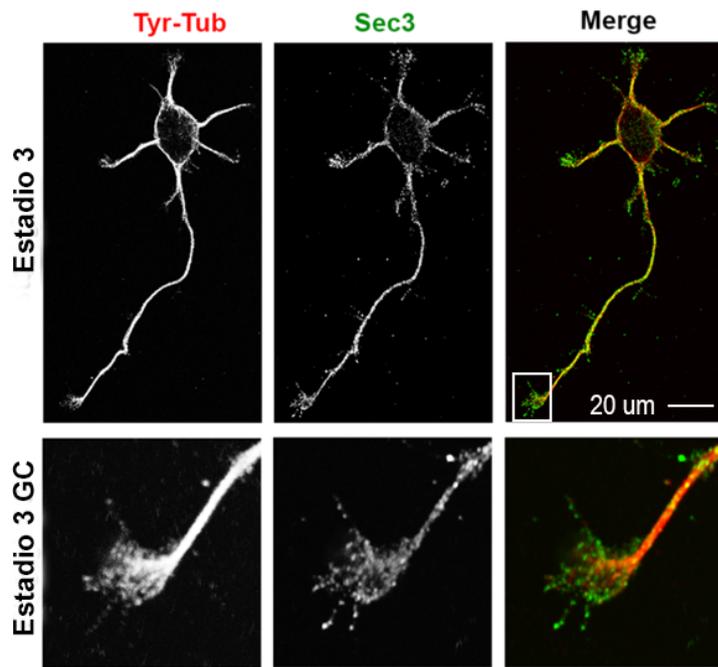


Figura 15- Sec3 se encuentra enriquecida en el cono de crecimiento axonal. Neuronas de hipocampo de rata fueron fijadas a diferentes tiempos y marcadas por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Sec3 (verde) y anti-tubulina tirosinada (rojo). Barra de referencia: 20 µm.

Conclusiones Capítulo 1

¿Qué proteínas del CE están presentes en neuronas?

¿En qué marco temporal se expresan las proteínas del CE?

- Definir el marco temporal de expresión resultaba uno de los interrogantes de este capítulo. Por ello mediante *Western Blot* de cultivos primarios de neuronas cosechadas a distintos tiempos logramos definir que además de Exo70 descrita anteriormente Sec5, Sec8 y Sec3 están presentes en neuronas piramidales de hipocampo desde estadios tempranos de crecimiento.
- Por técnicas de inmunofluorescencia de neuronas piramidales de hipocampo determinamos la presencia de Sec5, Sec8 y Sec3 desde estadios tempranos de manera coincidente con lo obtenido por *Western Blot*.
- Según las micrografías analizadas, Sec3 y Sec8 evidenciarían un enriquecimiento en el cono de crecimiento mientras que Sec5 posee una distribución ubicua en toda la célula mientras que.
- Del análisis de las micrografías, se evidenció que Sec3 presentaría una localización coincidente con algunos MTs pioneros en el CdC.

Capítulo 2

“Localización subcelular del
complejo exocisto en neuronas”

¿Dónde se encuentran las proteínas del CE dentro de la célula?

¿A qué estructura celular están asociadas las proteínas de estudio?

Resultados Capítulo 2

1. Presencia de Sec5, Sec3 y Sec8 en el axón y cono de crecimiento

Las proteínas con un rol determinante en la inserción de membrana durante la axogénesis deberían ubicarse en la zona de interés, es decir el tercio distal del axón y el cono de crecimiento axonal y expresarse de manera temprana, antes de la polarización neuronal.

En el capítulo I determinamos que Sec8 y Sec3 presentan una localización preferencial en axones Debido a que según las inmunofluorescencias demostradas en el capítulo anterior Sec5 no presentaba una localización sectorizada en el cono de crecimiento restringimos el análisis a Sec3 y Sec8. Además, se demostró que en estadios polarizados Sec3 y Sec8 se encontraban presentes en el axón. Para poder confirmar la presencia de estas proteínas en el cono de crecimiento y en el axón se requieren realizar experimentos suplementarios.

Para confirmar si Sec3 y Sec8 están presentes en el tercio distal del axón realizamos una colocalización de las proteínas de interés con marcadores del tercio distal de axones. Debido a la compatibilidad de los anticuerpos se utilizaron dos marcadores del tercio distal de axón, Tau1 y Sintaxina 6. Tau1 es una proteína asociada a microtúbulos cuya localización en el tercio distal de neuronas piramidales permite definir coincidencias en la localización de aquellas cuya ubicación subcelular no se sabe fehacientemente. Tau1 es utilizado como un marcador de axones, siendo considerada esta marcación como positiva para los procesos de polarización, es decir si se detectan axones Tau1 positivos la célula ha logrado polarizar [80]. Sintaxina6 es una proteína de la familia SNARE, cuya distribución se encuentra enriquecida en el tercio distal [41].

La colocalización de dos o más marcadores puede definirse como una superposición en la distribución física de las poblaciones moleculares dentro de un volumen tridimensional, donde puede ser una superposición completa o parcial. El método elemental es presentar los resultados como una superposición simple compuesta por los diferentes canales, cada imagen se pseudo colorea con colores apropiados. Por ejemplo, es comúnmente aceptado que la mezcla cromática de verde y rojo dará lugar a puntos amarillos donde las dos moléculas de interés están presentes en los mismos píxeles. La limitación de esta técnica teniendo en cuenta solamente la escala cromática de la superposición es el análisis de los resultados de

manera cualitativa, pero para los fines del presente experimento la respuesta cualitativa resultaba suficiente, donde simplemente se necesita determinar una localización en el la célula [81].

En neuronas de hipocampo en estadio 3 se emplearon anticuerpos dirigidos contra Sec3 y Tau1, se evaluó su colocalización y se determinó que el punto máximo de colocalización se da tercio distal del axón (**Figura 16**).

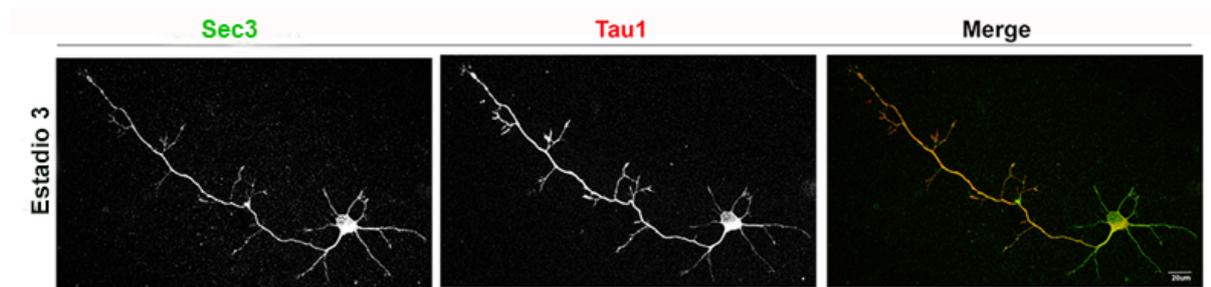


Figura 16- Sec3 se encuentra presente en el tercio distal de neuronas de hipocampo de rata. Neuronas piramidales de hipocampo de ratas *Wistar* E18 fueron cultivadas por 30h de cultivo, fijadas y marcadas con anticuerpos dirigidos contra Sec3 (pseudocoloreada en verde, primera columna); la proteína Tau1 (pseudocoloreada en rojo, segunda columna). La tercera fila muestra la superposición de los canales; el color amarillo demuestra las zonas de máxima colocalización (dentro del límite de detección) indicando que el tercio distal del axón es la zona de máxima colocalización. Barra de referencia 20 µm.

De manera comparativa realizamos el mismo procedimiento y demostramos que Sec8 presenta una mayor colocalización con Sintaxina 6 en el tercio distal del axón. (**Figura 17**).

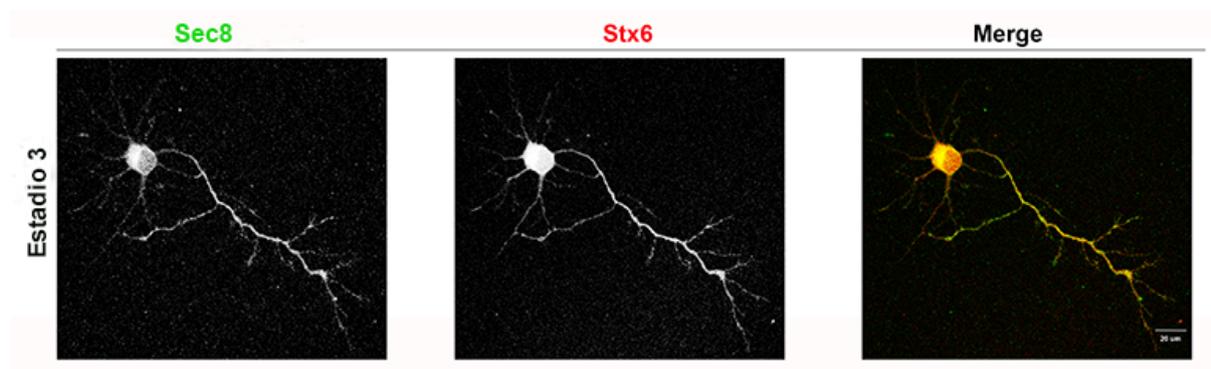


Figura 17- Sec8 se encuentra presente en el tercio distal de neuronas de hipocampo de rata. Neuronas piramidales de hipocampo de ratas *Wistar* E18 fueron cultivadas por 30h de cultivo, fijadas y marcadas con anticuerpos dirigidos contra Sec8 (pseudocoloreada en verde, primera columna); la proteína Stx6 (pseudocoloreada en rojo, segunda columna). La tercera fila muestra la superposición de los canales; el color amarillo demuestra las zonas de máxima colocalización (dentro del límite de detección) indicando que el tercio distal del axón es la zona de máxima colocalización. Barra de referencia 20 µm.

Definimos que Sec3 y Sec8 están presentes en el tercio distal del axón. Para confirmar que estas proteínas se localizan en el cono de crecimiento utilizamos una técnica que permite aislar desde cerebro fetal de rata una fracción celular que está altamente enriquecida en fragmentos vesiculares resellados provenientes de los conos de crecimiento de células nerviosas [82] (Ver Materiales y Métodos- Obtención de GCPs). El principal beneficio de este modelo es la posibilidad de proponer experimentos de estimulación agudos. Los GCPs una vez purificados son funcionales por un tiempo y sensibles a estimulaciones (con IGF1 por ejemplo) que permiten activar la maquinaria local tal como funcionaría *in vivo* [82]. Esto permite que todas aquellas vesículas que *in vivo* se encuentran en el cono axonal y al ser estimuladas se excitan a la membrana, sean reproducibles en este modelo.

Analizamos la presencia de estas proteínas en homogenato total de cerebro de rata y en GCPs; realizamos *Western Blots* para ser revelados contra las proteínas de interés junto con un control de carga para evaluar que se siembren niveles equiparables de proteína total. Como se demuestra en la **Figura 18 A** se encuentren niveles apreciables de Sec3, Sec8 y Exo70, aunque no de Sec5. El comportamiento de esta proteína, podría indicar que su rol en la polaridad neuronal no es importante ya que en caso contrario se encontraría en el CdC en niveles similares a las otras proteínas. En las inmunofluorescencias presentadas en el capítulo anterior se evidenció también esta menor localización de Sec5 en CdC en comparación a Sec3 y Sec8.

No solo evaluamos la presencia de estas proteínas en GCPs, sino que nos propusimos determinar a qué estructura o subfracción estaban asociados y si esta distribución era dependiente de la estimulación con IGF1.

Las proteínas del CE están descritas de ser citosólicas, aunque frente a determinados estímulos pueden ser reclutadas a membrana. Además, se ha descrito ampliamente que algunas proteínas que conforman el complejo de *tethering* están asociadas a citoesqueleto. La acción local del IGF1 podría evidenciarse en la re-distribución de Sec3 y Sec8 tal como lo hace con Exo70. En resultados previos se demostró que en subfracciones de GCPs Exo70 modificaba la localización de citoesqueleto a membrana [40]. Además, en experimentos previos la centrifugación de vesículas por su densidad en homogenatos de células PC12 y paralelamente en homogenatos de cerebro demostraron que Sec6, Sec8 y Exo70 migraban con marcadores de MTs, pero no de membrana o endosomas. Por otro lado en neuronas,

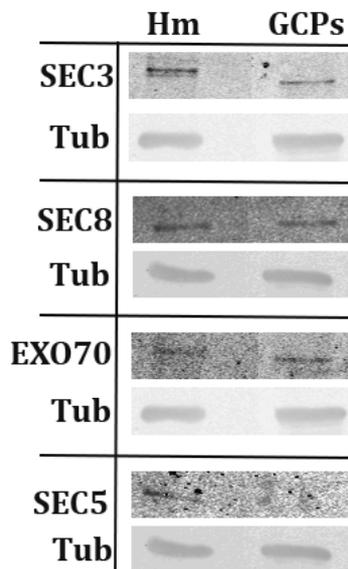
Exo70 fue descrito a estar localizado en sitios de prominente formación de MTs como lo son los MTOCs (centros de formación de MTs) [62]. Todos estos resultados demuestran que la localización de estas proteínas puede variar en respuesta a estímulos externos. Por ello es importante determinar si el IGF1 modifica la localización subcelular en el cono de crecimiento.

Para ello los GCPs fueron estimulados con este factor de crecimiento a 37 °C por diferentes tiempos. Se sabe por trabajos previos [22] que la vida media de la estimulación de IGF1 en conos de crecimiento es de 5 minutos teniendo su máximo de activación entre 1,5/2 min. Por esta razón evaluamos del efecto de la estimulación en la distribución proteica en el punto máximo de activación y en el final de la vida media. Posterior a esto se efectuó una lisis suave sobre los GCPs y se ultracentrifugó a través de un colchón de sucrosa 1M. Esto permite obtener un sobrenadante rico en componentes pertenecientes al citosol, una interfase con componentes de membrana y un precipitado con elementos característicos del citoesqueleto [83].

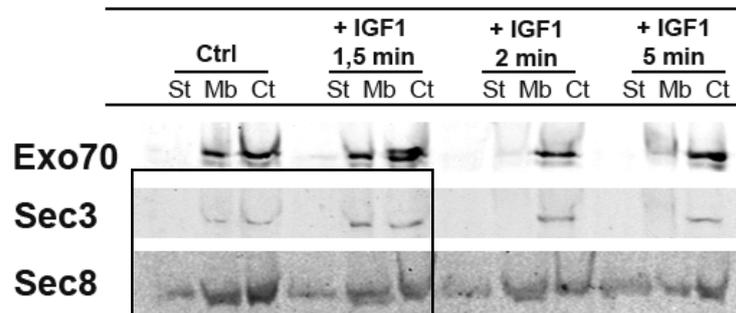
Exo70 tal como se describió anteriormente [40] se encuentra presente en la fase membrana y citoesqueleto de GCPs. De manera coincidente a estos resultados en condiciones control y estimulada 1,5 min Exo70 se encuentra asociada a membrana y a citoesqueleto (**Figura 18 B**). En condiciones de estimulación a 2min y 5 min se encuentra solamente asociada a citoesqueleto. Sec3 presenta un comportamiento similar a Exo70 demostrando que la localización subcelular en conos de Sec3 es dependiente de IGF1. Sec3 se encuentra asociado a membrana y a citoesqueleto en conos de crecimiento a tiempos cortos de estimulación. Por otro lado, Sec8 está presente en fracciones de membrana, citoesqueleto y citosol y su distribución no parece ser dependiente de IGF1. En la tabla adjunta a la Figura 18 se muestran los valores relativos de intensidad óptica de la relación membrana citoesqueleto. La tendencia numérica de la relación de Sec3 y Exo70 muestra que la variación en los niveles es dependiente de IGF1 y la cantidad de proteína en membrana aumenta a 1,5 y 2 min a mientras que para Sec8 esta relación se mantiene constante.

El comportamiento de Sec3 frente a la estimulación con IGF1 resultó ser coincidente con Exo70, generando la translocación a membrana a tiempos cortos de esta proteína. La localización de Sec8 no pareciera ser modificada por el estímulo de IGF1. Los distintos patrones de localización y la respuesta frente al estímulo con IGF1 puede resultar relevante para los efectos funcionales que posean Sec3 y Sec8.

A-



B-



Valores de la relación Mb/Ct de densidad óptica				
	Ctrl	+IGF1 1,5 min	+IGF1 2 min	+IGF1 5 min
Exo70	0,54	2,32	9,36	0,43
Sec3	0,69	1,26	9,02	0,80
Sec8	0,73	0,82	0,86	0,45

Figura 18-Sec3 se encuentra presente en conos de crecimiento axonal asociada a membrana y citoesqueleto y dependiente de IGF1 mientras que Sec8 presenta una localización ubicua en membrana, citoesqueleto y citosol. A- Los niveles proteicos de Sec3, Sec8, Exo70 y Sec5 fueron analizados por *Western Blot* en homogenato total de cerebro de rata (Hm) y GCPs. En todas las líneas se sembraron 40 µg de proteína total. En todos los casos se utilizó anti-Tubulina como control de carga. Los niveles de Sec5 resultaron nulos o escasos mientras que en el resto de las proteínas se detectaron tanto en Hm como GCPs. B-*Western Blot* de subfracciones de GCPs (St/Sobrenadante, Mb/Membrana, Ct/Citoesqueleto) revelados contra Exo70, Sec3 y Sec8. Los GCPs fueron estimulados con 20nM de IGF1 a diversos tiempos o condición control no estimulada. Mientras que Sec3 posee una distribución preferencial en membrana y citoesqueleto, Sec8 presentó una distribución completamente ubicua en las tres subfracciones (recuadro negro). En cada carril se sembraron iguales cantidades de proteínas y posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios aptos para fluorescencia del infrarrojo cercano. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises e invertidas.

2. Sec3 y su asociación a membrana

De los resultados obtenidos de las subfracciones de GCPs determinamos que Sec3 está asociado a membrana y su localización es dependiente de IGF1. Para confirmar la asociación de Sec3 a membrana y como varía con la estimulación con IGF1 planteamos experimentos de microscópica de reflexión total interna. La microscopía TIRF (por sus siglas en inglés *Total internal reflection fluorescence microscopy*) también conocida como microscopía de campo

onda evanescente, es una técnica que utiliza un modo especial de iluminación de la muestra para excitar fluoróforos que se encuentran a aproximadamente 100 nm de la interfaz de la cubierta/muestra.

Se realizó una inmunomarcación en células control y estimuladas contra marcadores de citoesqueleto para evidenciar la estructura celular completa. La proteína de interés fue marcada y como control positivo se utilizó Exo70, cuyo efecto frente a la estimulación con IGF1 es la translocación a membrana. Se tomaron imágenes en el plano TIRFM de las proteínas de interés y posterior a ello imágenes confocales de los marcadores de citoesqueleto. Una mayor presencia de fluoróforos en la condición estimulada en el plano TIRF evidenciaría que la presencia de esta proteína en la membrana es regulada por este factor trófico. Las imágenes recolectadas son mostradas en la **Figura 19 A y B**. Se muestra también un perfil de intensidad donde los diferentes rangos de intensidad en la imagen en el plano TIRFM son transformados mediante un filtro que asigna a diferentes niveles de intensidad diferentes colores. De esta manera la escala cromática asociada demuestra diferentes niveles de intensidad. En la **Figura 19 C se muestra** la cuantificación de píxeles en relación al área total del cono lo que permite determinar si la cantidad de píxeles se modifica en condiciones control respecto a las estimuladas sin tener en cuenta la variación del tamaño de conos analizados. La relación de intensidades en la condición estimulada y control de Exo70 presentó demuestra que la estimulación con IGF1 promueve la translocación de Exo70 a membrana. En tanto los niveles de intensidad de Sec3 se mantuvieron estables en condiciones estimuladas y control.

El análisis de los perfiles de intensidad de las diferentes proteínas (Sec3 y Exo70) no es comparables entre sí debido a que la posición y características propias del fluoróforo dentro del campo de iluminación tiene una influencia significativa en la intensidad aparente de su fluorescencia. Por lo tanto, comparar los niveles de intensidad entre fluoróforos diferentes resulta incorrecto. Lo que es susceptible a comparación son las condiciones internas de estimulación y control de cada caso. Si bien el resultado nos pareció sorprendente respecto al obtenido anteriormente en subfracciones de GCPs donde la cantidad de proteína Sec3 asociada a membrana variaba en el marco temporal estudiado, sostenemos que la penetrancia de la onda evanescente podría ser insuficiente para lograr detectar los cambios

evidenciados anteriormente. La localización relativa de Sec3 y Exo70 podría ser diferente respecto a la distancia de la membrana y por ello no ser apreciable con la técnica de TIRF.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos teniendo también en cuenta aquellos planteados en la figura 18 B, Sec3 permanece interaccionando con el citoesqueleto incluso cuando está formando parte del complejo exocisto y que si bien puede interaccionar con la membrana su posición relativa en el complejo puede estar más alejada que Exo70 y encontrarse fuera del plano de TIRF (ver también Figura 30) y por esta razón los movimientos asociados a Sec3 estarían fuera del plano TIRF.

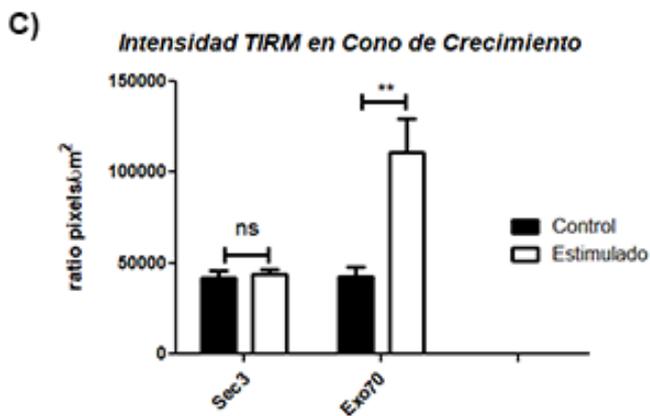
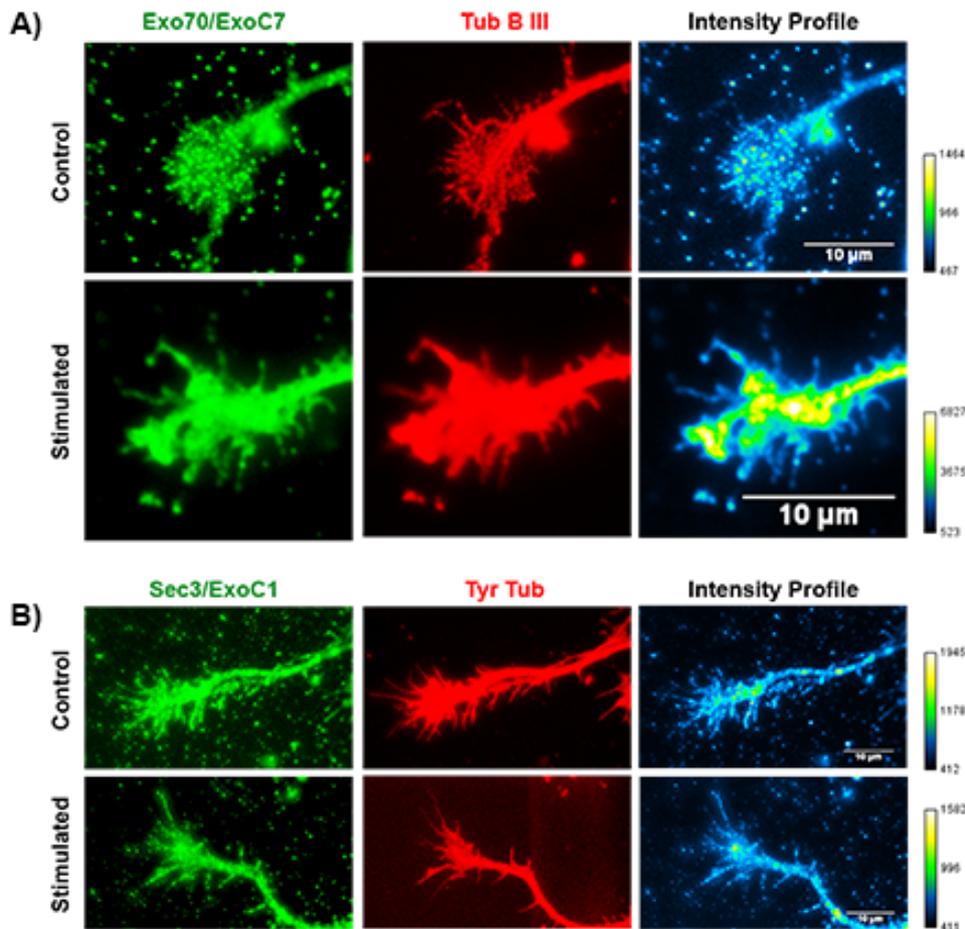


Figura 19- La estimulación con IGF1 modifica el patrón de localización de Exo70, pero este evento no es detectable para Sec3 por técnica de TIRF. Imágenes de TIRM obtenidas para Exo70 (A) y Sec3 (B) en condiciones control (fila superior) y condiciones de estimulación con IGF1 (fila superior). En la tercera columna se muestran los perfiles de intensidad del plano TIRF obtenido. En la figura C se muestra la medición de los pixeles de intensidad en el plano TIRF por unidad de área. N: 14 conos de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico Test de Student ***p<0.001;

3. Sec3 y su asociación a citoesqueleto microtubular y de actina

Tal como se expresó anteriormente el citoesqueleto cumple un rol funcional en la polaridad neuronal. Los cambios en el citoesqueleto pueden estar asociados a la relocalización del CE. Estudios previos han demostrado que la translocación a membrana de proteínas del complejo es dependiente de una interacción directa o indirecta con la actina. En el caso particular de Sec3 se demostró que se encuentra asociada a membrana aun después de la disociación de la red de actina indicando que su transporte y funcionamiento no depende del citoesqueleto de actina [52]. Debido a los resultados previos obtenidos en la presente tesis que demuestran que Sec3 está asociado a membrana y a citoesqueleto en conos, nos propusimos determinar a qué estructura del citoesqueleto estaba asociada en neuronas. Debido a los resultados propuestos anteriormente sobre la dependencia para la localización de las proteínas del CE con la organización del citoesqueleto de actina en levaduras y a nuestros resultados obtenidos tanto por inmunografías sugiriendo una localización de Sec3 en el cono de crecimiento en neuronas piramidales en cultivo coincidente con MTs pioneros como los obtenidos por pruebas bioquímicas en GCPs indicando la asociación de Sec3 a citoesqueleto, decidimos evaluar rigurosamente la colocalización de Sec3 con estos marcadores de citoesqueleto.

Para responder a los interrogantes planteados anteriormente, se tomaron imágenes del tercio distal de axones de neuronas piramidales de hipocampo fijadas marcadas con anticuerpos dirigidos contra la proteína Sec3 y el elemento del citoesqueleto de interés, ya sea faloidina o tubulina tirosinada. La faloidina (conocida normalmente por su nombre en inglés *phalloidin*) es una toxina que se une a los filamentos de F-actina. Esta toxina conjugada a un fluoróforo permite observar mediante microscopía la localización de la actina [84].

Debido a que la célula es una estructura tridimensional es importante definir los límites en los que se evalúa la colocalización, no solamente en la compartimentalización en dos dimensiones (eje X e Y) sino en la profundidad celular (eje Z) [81]. Los métodos de superposición en la colocalización que generan una estimación visual de la colocalización se encuentran limitados sobre todo por su nula resolución en el eje z. Por eso para un análisis más profundo es necesario efectuar un procesamiento de la imagen obtenida. Un primer paso en el procesamiento de imágenes es eliminar la luz fuera de foco generada por el microscopio confocal que permite la adquisición de fotos. La reasignación de la luz borrosa desenfocada a su origen se realiza mediante un proceso llamado deconvolución. Esta es una técnica

computacional que incluye métodos que ayudan a volver a atribuir la propagación de la señal en tres dimensiones y restaurar la resolución de las imágenes (Ver Materiales y Métodos – Análisis de Colocalización). El procesamiento de la imagen permite obtener micrografías en las cuales se puede efectuar un análisis de colocalización exhaustivo. Por las razones expuestas, las imágenes se tomaron teniendo en cuenta la resolución en el eje Z tomando fotos secuenciales, haciendo foco en cada rodaja óptica. La imagen de inmunofluorescencia final se compone de una imagen en la que todas las rodajas ópticas establecidas aporten a la resolución final. También se recogieron las vistas axiales donde cada punto del plano Z se referenció a un plano Y. Esto permite definir un perfil de intensidad de píxeles, con resolución en dos dimensiones donde puede resultar útil para evaluar una colocalización (**Figura 20**).

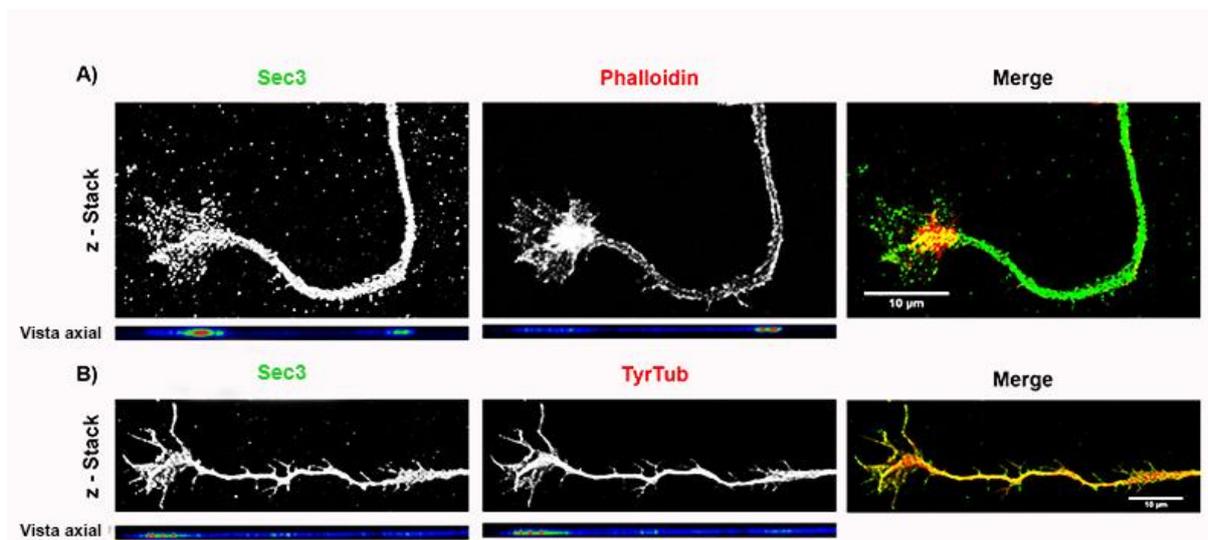


Figura 19 - Sec3 colocaliza con Tubulina. Inmunofluorescencia de conos de crecimiento después de 18 h de cultivo que muestra la colocalización de Sec3 (verde) con faloidina (rojo - Panel A-) y Tyr Tub (rojo - Panel B-). Se incluyen las vistas axiales del eje Y/Z. Rodaja óptica 2 µm Barra de referencia 20 µm.

Las fotos fueron deconvolucionadas y se procedió a determinar parámetros de colocalización numéricos en todo el eje z. Una forma sencilla de medir la dependencia de los píxeles es trazar los valores de gris de los píxeles de las dos imágenes correspondientes a cada canal una contra la otra. Los resultados se muestran en un diagrama de distribución de píxeles denominado diagrama de dispersión o fluograma. Si consideramos que la marcación de ambos fluorocromos es proporcional al otro y la detección de ambos se ha llevado a cabo en un rango lineal, el patrón del fluograma resultante debe ser una línea. Los fluogramas obtenidos son mostrados en la **Figura 20 A** para Sec3 con faloidina y tyr-tubulina. La

dispersión de esta distribución con respecto a la línea ajustada se puede estimar calculando el coeficiente de correlación, también llamado coeficiente de Pearson (CP). La pendiente de esta aproximación lineal proporciona la tasa de asociación de dos fluorocromos. En contraste, el CP proporciona una estimación de la veracidad de esta aproximación. Su valor puede variar de 1 a -1, con 1 para la correlación positiva completa y -1 para una correlación negativa, con cero para la no correlación. Los fluogramas obtenidos muestran un perfil de dispersión muy diferente, en el caso de Sec3 y Tyr Tubulina se muestra una línea recta mientras que en el caso de Sec3 y Faloidina la intensidad de los píxeles se muestra distribución más amplia tendiente a los ejes axiales. La cuantificación de los valores de colocalización de Pearson son mostrados en la **Figura 20 B** mostrando una diferencia en la colocalización significativa. Los valores de Pearson para la colocalización con tubulina fueron cercanos a 0,8 indicando un nivel alto de colocalización. Por otro lado, los valores de la colocalización con Faloidina fueron de 0,5. Este valor presenta una dificultad en la interpretación debido a que el proceso de obtención de este coeficiente se presenta una alta sensibilidad al ruido y las diferencias de intensidad de los fluoróforos empleados raramente se puede discriminar entre una colocalización parcial o una exclusión. Por ello, como los resultados obtenidos solamente con el coeficiente de Pearson pueden resultar ambiguos se decidió analizar otros factores de colocalización.

El coeficiente de superposición de Manders se basa en el coeficiente de correlación de Pearson eliminando los valores de intensidad promedio de la expresión matemática. Este nuevo coeficiente variará de 0 a 1, la primera correspondiente a imágenes no superpuestas y este último refleja el 100% de colocalización entre ambos. Eliminar las señales medias de la ecuación tiene el efecto de prevenir valores negativos. Este coeficiente también permitió arribar a una conclusión similar a la anterior con el coeficiente de Pearson (**Figura 20 C**).

Este coeficiente sin embargo no nos indica que fracción de proteínas colocaliza con la otra. Por ello el coeficiente de Manders fraccional permite obtener esta información. M1 se define como la relación de "intensidades sumadas de píxeles de la imagen verde para la cual la intensidad en el canal rojo es superior a cero" sobre "intensidad total en el canal verde" y M2 se define a la inversa para el rojo. Por lo tanto, M1 (o M2) es un buen indicador de la proporción de la señal verde coincidente con una señal en el canal rojo sobre su intensidad total, que incluso puede aplicarse si las intensidades en ambos canales son realmente

diferentes entre sí. En el presente trabajo se presenta en ambos casos solamente M1, ya que nuestro fluoróforo de interés es el verde (Sec3). Podemos determinar (**Figura 20 D**) que el coeficiente de Manders para la dupla Sec3/tyr-tubulina con el microtúbulo es más alto que para la actina [85].

Los resultados presentados respecto a la colocalización representan las mediciones principales de la colocalización utilizadas en la investigación biomédica. Estrictamente hablando, ninguno es superior al otro; ambos tienen fortalezas y debilidades que, según la situación, hacen que uno u otro sean métrica preferida. El beneficio del presente experimento es que los 3 resultados arriban a la conclusión de que Sec3 colocaliza en neuronas de hipocampo con Tyr-Tubulina mientras los niveles de colocalización con actina son mucho menores indicando que la colocalización en este caso es escasa.

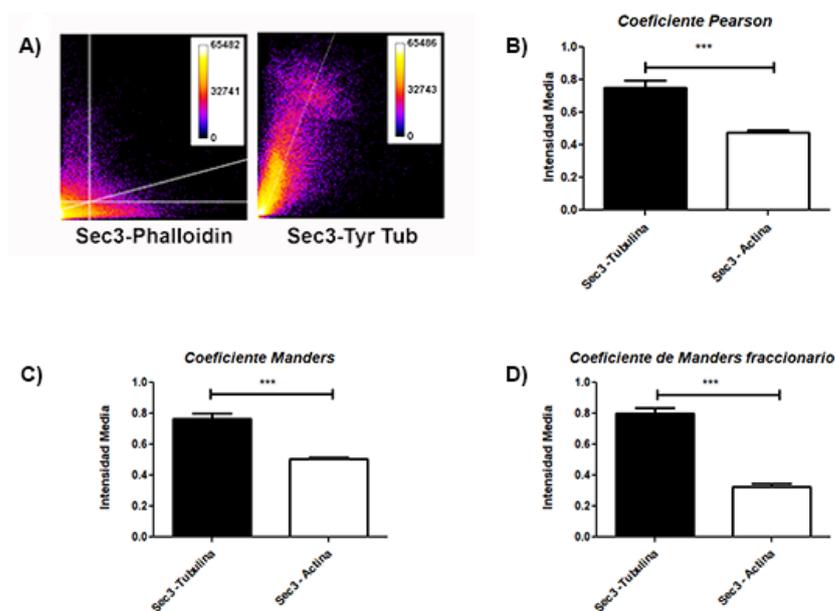


Figura 20 - Sec3 colocaliza con Tubulina. Mediciones de diversos coeficientes de colocalización N: 14 conos de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico Test de Student *** $p < 0.001$;

4. Cercanía de Sec3 y Sec8 en el cono de crecimiento

Para confirmar la asociación de Sec3 y Sec8 a las mismas estructuras proteicas se pueden realizar ensayos de inmunoprecipitación, inmunoadsorción o ensayos de pull down [86]. La inmunoadsorción es un método *in vitro* ampliamente utilizado para detectar o confirmar la pertenencia de diferentes proteínas a la misma estructura vesicular. Este ensayo se basa en el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína de interés y posteriormente un ligando de afinidad contra alguna característica del anticuerpo. El segundo ligando posee alguna característica física que permite separarlo del resto de la solución y de esta manera capturar las proteínas. Al aislar el anticuerpo de interés se aíslan las proteínas que se encuentran asociadas a esta debido a una cercanía física. Si las condiciones en que se trató el sustrato de partida son suaves y permiten mantener estructuras previas esta técnica se denomina inmunoadsorción.

Los GCPs que fueron estimulados con IGF1 o condiciones control, sometidos a una lisis suave para exponer las estructuras vesiculares internas sin afectar su integridad y se incubaron con el anticuerpo de interés. Luego se les agregó Protein A Sepharose Beads[®], un compuesto que posee alta afinidad por las IGs del anticuerpo unido a esferas de sefarosa que permite su precipitación mediante centrifugación. Finalmente se obtiene un precipitado (IP) conteniendo la proteína de interés junto con todas aquellas proteínas con las que se encuentra asociado y un sobrenadante (SN) donde quedan el resto de las proteínas. La inmunoadsorción se realizó Sec3 y Sec8 y se determinó si están asociados a las mismas estructuras membranosas que Exo70, nuestro referente del CE. El ensayo se realizó en condiciones de estimulación con IGF1 y control en ausencia de IGF1 (**Figura 22**). En ambas inmunoadsorciones se sembrando GCPs sin tratar para asegurar la presencia de la proteína en el elemento de partida. Además, el SN e IP fue revelado contra la misma proteína que se había precipitado anteriormente para evaluar la efectividad del proceso de aislamiento. En caso de que el proceso de inmunoadsorción fue efectivo, la proteína utilizada como primer ligando debe estar presente en el IP. Otro control procedimental se basó en realizar la inmunoadsorción sin el anticuerpo primario. En este caso toda la proteína debería encontrarse en el SN. De esta manera estos controles planteados aseguran que la proteína de interés se encuentra en el material de partida y su asociación al anticuerpo sea específica.

En condiciones de estimulación como de control Exo70 es co-aislado con Sec3 y con Sec8 indicando ambas proteínas presentan una cercanía estructural a Exo70, aunque esto no demuestra una interacción física directa. El hecho de estar presentes en el mismo complejo de exocitosis puede permitir que ambas proteínas se puedan aislar de manera conjunta, por lo que Sec3 y Sec8 pueden formar parte del mismo complejo proteico ya que presentan una cercanía estructural.

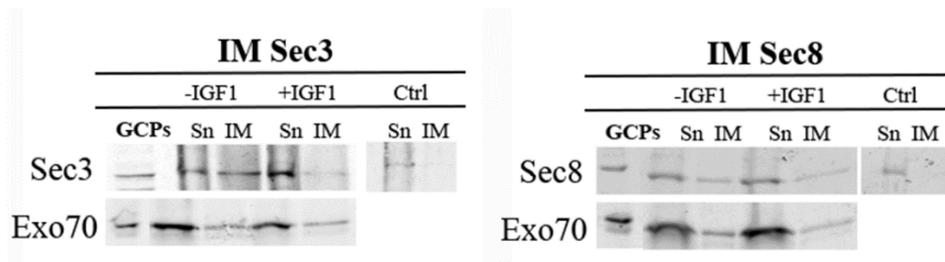


Figura 22-Sec3 y Sec8 están presentes en las mismas estructuras membranosas que Exo70. *Western Blot* de Inmunoaislamiento de GCPs obtenidos de cerebros de 18 días de gestación en condiciones control y estimuladas por 2min con IGF1. En primera instancia se efectúa un control interno donde se muestra la presencia de la proteína de interés en el elemento de partida (columna GCPs). Luego se realiza un control de precipitación revelando contra la proteína de interés utilizada para el ensayo (fila superior). La fila inferior muestra los resultados de Exo70. La columna Ctrl. corresponde al experimento realizando sin la presencia de anticuerpo primario. Posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios aptos para fluorescencia del infrarrojo cercano. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises e invertidas.

5. Sec3 y el transporte axonal

Un punto importante a tener en cuenta es evaluar que motor molecular puede transportar estas proteínas del CE. Resultados previos del laboratorio han demostrado que el motor molecular Kinesina 1C no co-inmunoprecipitaría en GCPs con Sec8, Sec5 y/o Exo70. La elección en particular de este motor molecular se debe a la importancia del mismo en la polaridad neuronal. No obstante resultados obtenidos en esta tesis demuestran que Kinesina 1C es co-inmunoaislada junto con Sec3 tanto en condiciones estimuladas como no estimuladas (**Figura 23**). Esta evidencia junto con los resultados obtenidos en el presente capítulo que indican que si bien ambas proteínas están presentes en cono de crecimiento y presentan cercanía estructural la dinámica en el transporte y rol en la polaridad podría ser diferente.

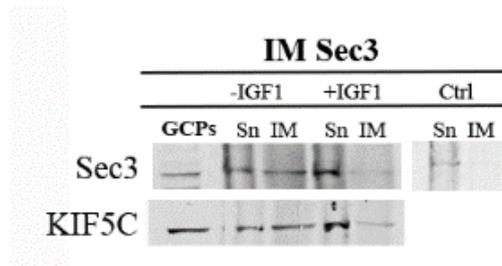


Figura 23-Sec3 podría ser cargo del motor molecular KINESINA 1C. *Western Blot* de Inmunoaislamiento de GCPs obtenidos de cerebros de 18 días de gestación en condiciones control y estimuladas por 2min con IGF1. En primera instancia se efectúa un control interno donde se muestra la presencia de la proteína de interés en el elemento de partida (columna GCPs) Luego se realiza un control de precipitación revelando contra la proteína de interés utilizado para el ensayo (fila superior). La fila inferior muestra los resultados de Kinesina 1C. La columna Ctrl. corresponde al experimento realizando sin la presencia de anticuerpo primario. Posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios aptos para fluorescencia del infrarrojo cercano. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises e invertidas.

Conclusiones Capítulo 2

¿Dónde se encuentran estas proteínas dentro de la célula?

¿A qué estructura celular están asociadas las proteínas de estudio?

- Mediante el análisis de *Western Blot* de GCPs confirmamos que Sec3 y Sec8 se encuentran presentes mientras que Sec5 presenta niveles en GCPs menores que Sec3 y Sec8.
- Los análisis de colocalización confirmaron que en neuronas piramidales Sec3 y Sec8 se encuentran localizadas en el tercio distal del axón.
- En cuanto a la localización subcelular en conos Sec3 se encuentra asociada a citoesqueleto y membrana y su distribución es dependiente de IGF1. Sec8 se encuentra asociada citosol, citoesqueleto y membrana y no es modificada frente a la estimulación con IGF1.
- Dentro de las estructuras a las que está asociada Sec3 en conos, demostramos que primordialmente se encontraba en citoesqueleto y membrana. Los análisis efectuados por estudios de colocalización en conos de neuronas piramidales de hipocampo demostraron que la asociación de Sec3 a citoesqueleto está dada por Tubulina y no por actina. En cuanto a su presencia en membrana se confirmó técnicas complementarias como TIRFM, aunque no se logró evidenciar mediante esta técnica si la translocación a membrana es dependiente de IGF1. Esto demuestra que la ubicación de Sec3 en el complejo puede ser más lejana a la membrana que respecto a Exo70.
- Sec3 y Sec8 están asociadas a las mismas estructuras membranosas ya que ambas presentan cercanía estructural en ensayos de Inmunoaislamiento, aunque podrían ser transportadas por motores moleculares diferentes.

Capítulo 3

“Rol funcional de Sec3 y Sec8 en

modelos de polaridad *in vitro* e *in vivo*”

¿Cuál es el efecto del silenciamiento de Sec3 y Sec8 en la formación de axones en modelos *in vitro*?

¿Cuál es el efecto en la migración de neuronas silenciadas en modelos *in vivo*?

Resultados Capítulo 3

1. Silenciamiento in vitro de Sec3 y Sec8

El paradigma clásico para confirmar la función reguladora de un gen en la polaridad neuronal es mostrar que la regulación mediante la disminución de la expresión proteica mediante la tecnología shRNA o la tecnología de desactivación de genes es necesaria para la formación del axón utilizando la tinción con marcadores específicos del axón y la medición de la longitud de las neuritas debido a que el axón por lo general crece de 5 a 10 veces más rápido que las neuritas que se convierten en dendritas [1].

Finalmente decidimos evaluar si Sec3 y Sec8 son necesarias para la polaridad neuronal. Para ello se utilizamos plásmidos específicamente diseñados y validados para expresar shRNA específicos contra las subfracciones del CE, clonados en vectores pLKO.1-CMV-tGFP (Mission®, Sigma Aldrich) que permiten visualizar cuales células han sido transfectadas observando la expresión de la proteína fluorescente verde o GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*). La ventaja del método es que permite bloquear la expresión de una única proteína por interferencia con su RNA mensajero. En todos los casos se utiliza un control interno, es decir una secuencia de que no presenta efecto supresión contra ninguna de las proteínas de interés.

Para ello, primero se comprobó que efectivamente la acción del plásmido fuera capaz de disminuir la expresión de estas proteínas por *Western Blot* y que el control no presentara efectos adversos silenciando inespecíficamente alguna de estas proteínas de interés. La validación bioquímica de los shRNAs se efectuó utilizando líneas celulares derivadas de rata, específicamente la línea celular de glioma de cerebro de rata C6. Esta estrategia 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 mediante métodos bioquímicos. Para demostrar la disminución en la expresión de la proteína los niveles de densidad óptica de la proteína de interés se relacionaron a los niveles de tubulina utilizada como control de carga. Los plásmidos y las concentraciones elegidas se indican con un asterisco en la **Figura 24**.

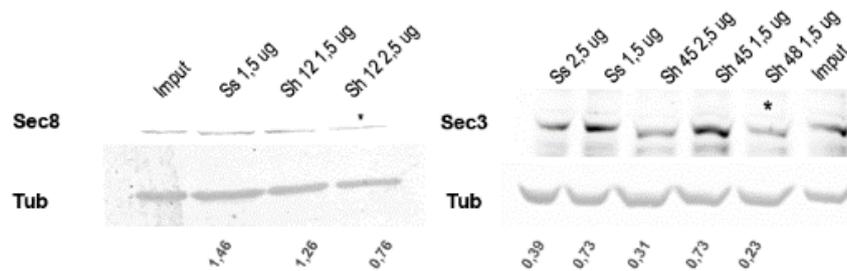


Figura 24- Disminución en la expresión de Sec8 y Sec3 en células C6 mediante shRNA. Células de glioblastoma de rata fueron transfectadas con lipofectamina al momento de la siembra con plásmidos específicamente diseñados para expresar shRNA contra Sec3 o Sec8 y con un shRNA control (scrambled). Luego de 36 horas en cultivo, las células fueron cosechadas y los homogenatos obtenidos fueron sometidos a electroforesis en geles de acrilamida y *Western Blot*. Las membranas fueron inmunomarcadas con anticuerpos primarios anti-Sec8 (panel superior izq.) y anti-Sec3 (panel superior der.). En ambos casos se utilizó anti-Tubulina (panel inferior) como control de carga y posteriormente con anticuerpos secundarios aptos para fluorescencia del infrarrojo cercano. Las imágenes obtenidas fueron convertidas a escala de grises e invertidas. Los asteriscos indican la elección del plásmido y la concentración elegida utilizada posteriormente para los experimentos *in vitro*. Se muestran los valores de densidad óptica de la relación proteína/tubulina.

Se transfectaron neuronas de cultivos de piramidales de hipocampo según se explicó anteriormente en la fig. 10 mediante lipofección. La transfección mediante lipofectamina (ver Materiales y Métodos) se realizó al momento de siembra y 24-30h después se evaluaron los estadios de crecimiento de las células transfectadas. La evaluación del estadio en las células transfectadas se realizó no solamente a nivel morfológico utilizando una marcación con Tubulina β III, sino que también se definió que aquellas células que poseen un axón que presenta marca de Tau1 se encuentra en estadio 3 de diferenciación. Aquellas células transfectadas con shRNA dirigido contra Sec3 no presentan un axón discernible, aunque las neuronas transfectadas con shRNA dirigidas contra Sec8 poseen un comportamiento similar al control (**Figura 25**).

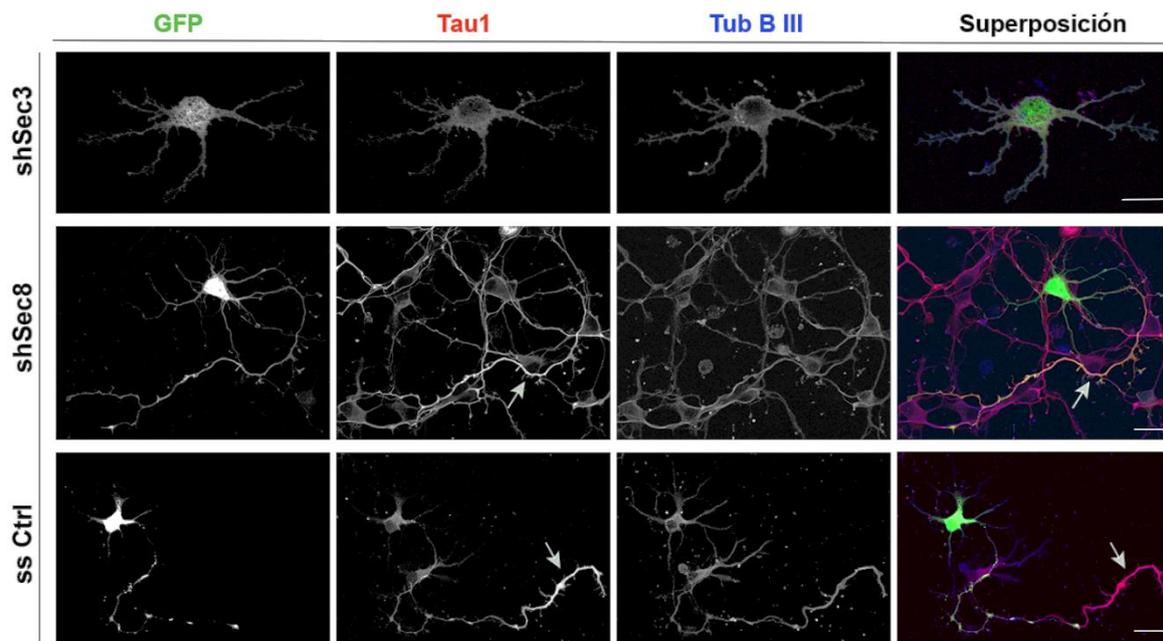


Figura 25- Sec3 es necesaria para el establecimiento del axón en neuronas piramidales de hipocampo mientras que el silenciamiento de Sec8 no impide la axogénesis. Ensayos de pérdida de función en neuronas de hipocampo en cultivo. Neuronas piramidales de hipocampo de ratas *Wistar* E18 fueron transfectadas a tiempo cero de cultivo con un shRNA secuencia-específico dirigido contra Sec3 (panel superior), con el shRNA secuencia-específico dirigido contra Sec8 (panel central) o con una secuencia sin sentido (ssCtrl) como control (panel inferior). La imagen muestra en verde el GFP de las construcciones transfectadas, a la proteína Tau1 pseudo coloreada en rojo (segunda fila), a la proteína Tub β III pseudo coloreada en azul (tercera fila). La cuarta fila muestra la superposición de los canales. Las flechas blancas indican los axones Tau1 positivos. Nótese que las neuronas transfectadas con shSec3 (GFP) no exhiben un axón mientras que aquellas transfectadas con ShSec8 y SsCtrl si poseen axones distinguibles. Barra de referencia 20 μ m.

En condiciones normales, a las 30h de cultivo el 60% de las células se encuentra en estadios de crecimiento polarizados, siendo el estadio 1 y 2 poco predominantes. Una vez realizada la cuantificación se observó (**Figura 26**) que las células transfectadas con shRNA dirigido contra Sec3 no podían diferenciar en estadios polarizados quedando arrestadas en estadios de crecimiento tempranos. Por otro lado, el silenciamiento de Sec8 no posee efecto significativo en la polaridad neuronal evidenciando estadios 3 similares a los cuantificados en el control. No obstante, este efecto diferencial entre Sec3 y Sec8 nos generaba intriga, por lo que decidimos indagar más sobre el efecto en el silenciamiento de Sec8. Realizando una búsqueda en bibliografía, encontramos que el silenciamiento de Exo84 tenía efecto en el largo de las prolongaciones. El silenciamiento de esta proteína generaba que las neuritas tuvieran una longitud media mayor [33]. Por ello nos preguntamos si los axones Tau1 positivos en aquellas

células positivas para la transfección con Sec8 tenían un largo similar a los axones de aquellas transfectadas con la secuencia control. El largo de los axones de ambos grupos estudio se cuantificó y se evaluó su largo. En el gráfico de la figura 26 podemos observar que la diferencia en la longitud no es significativa. Por lo tanto, las células transfectadas con Sec8 no tienen afectada a la polaridad ni tampoco al largo de sus axones cuando.

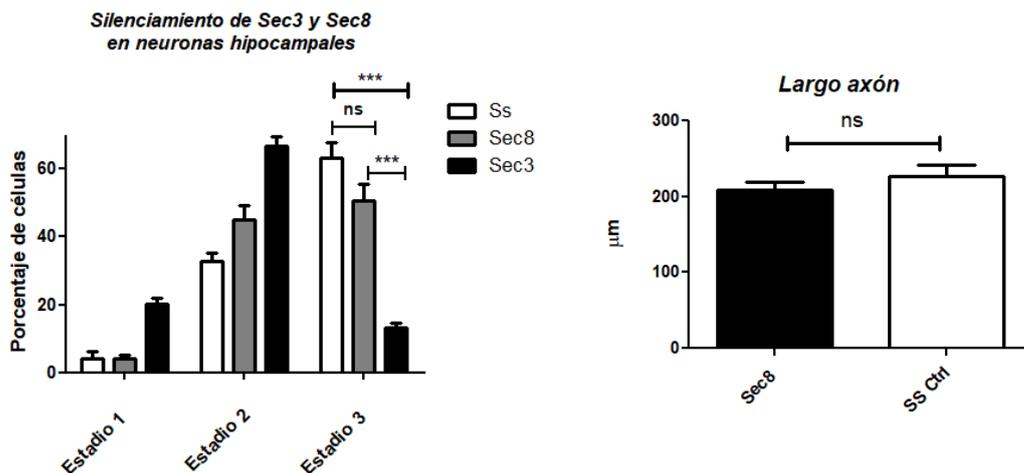


Figura 26- Sec3 es necesaria para el establecimiento de axones en neuronas piramidales de hipocampo mientras que el silenciamiento de Sec8 no impide la axogénesis ni afecta el largo de los axones formados. Izquierda. Cuantificación de ensayos de pérdida de función. Se muestran los porcentajes (\pm SD) estadios específicos de diferenciación de neuronas transfectadas con ssRNA (control, barras blancas) y las transfectadas con shSec8 (barras grises) o shSec3 (barras negras) después de 40 horas en cultivo *in vitro*. Un porcentaje significativo de las células transfectadas con shSec3 quedaron arrestadas en estadio 2 de diferenciación. En contraste, la mayoría de las neuronas transfectadas con shSec8 exhibieron un axón (estadio 3 de diferenciación). N: 100 células de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. Se cuantificó el largo de los axones de células transfectadas con shSec8 o SsCtrl con el programa FIJI. La diferencia en los largos de los axones no fue significativa. N: 30 células en cada condición de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico Test de Student. *** $p < 0.001$; ns: no significativo.

La diferencia en el efecto de silenciamiento de Sec3 y Sec8 resultó sorprendente, si bien son dos proteínas diferentes llama la atención debido a que se encuentran en el mismo complejo. Por ello decidimos descartar que el efecto de silenciamiento de Sec3 se debía a efectos *off target* y evaluamos en cultivos primarios si efectivamente la proteína se encontraba silenciada. Para evidenciar la existencia de efectos *off target* transfectamos las células con shRNA dirigido contra Sec3 y evaluamos la expresión de la proteína en células transfectadas. Las células fueron fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos específicos. Como podemos ver en la siguiente figura (**Figura 27**) se demuestra que en aquellas células que han incorporado

el plásmido específico muestran una disminución en la concentración de la proteína expresada mientras que en los controles la concentración específica de Sec3 no se ve afectada. Esto nos permite afirmar que el efecto que observamos con Sec3 es tal y que su silenciamiento en neuronas piramidales de hipocampo inhibe la polarización neuronal.

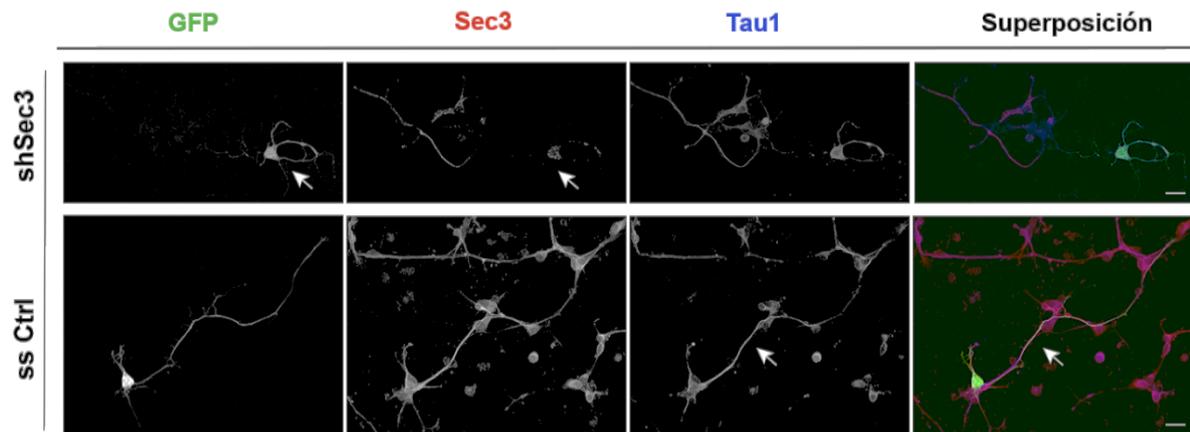


Figura 27- Los niveles de Sec3 en neuronas piramidales de hipocampo que no exhiben axón se encuentra disminuido. Ensayos de pérdida de función de Sec3 en neuronas de hipocampo en cultivo. Neuronas piramidales de hipocampo de ratas E18 fueron transfectadas a tiempo cero de cultivo con un shRNA secuencia-específico dirigido contra Sec3 (panel superior) o con una secuencia sin sentido (ssRNA) como control (panel inferior). La imagen muestra en verde el GFP de las construcciones transfectadas, a la proteína Sec3 pseudo coloreada en rojo y a la proteína Tau1 pseudo coloreada en azul). La cuarta fila muestra la superposición de los canales. Las flechas blancas indican las neuronas expresando shSec3 (GFP) tienen niveles bajos de la proteína endógena y no desarrollaron axones. A diferencia de las neuronas control (ssRNA) donde se desarrollaron prolongaciones Tau1 positivas.

2. Silenciamiento in vivo de Sec3 y Sec8

El desafío que se presenta en la última década es validar todos esos resultados obtenidos *in vitro* en modelos *in vivo* para establecer que influencia tienen los contactos célula con célula y el ambiente extracelular; que no son posibles de manejar en el modelo hipocampal. Para obtener una validación biológica más completa planteamos evaluar el efecto del silenciamiento en la migración de Sec3 y Sec8 en un modelo de polaridad *in vivo* el cual es esquematizado a continuación (**Figura 28**).

El procedimiento de la electroporación se puede realizar de dos maneras; si la electroporación es realizada fuera de la pared uterina y los embriones crecen fuera de la cavidad abdominal mientras la placenta permanezca unida se llama electroporación *exo utero*, en cambio sí es realizada sin dañar la cavidad uterina y son restituidos al abdomen se denomina *in utero*. La

elección de una técnica o la otra dependerá en gran parte de los requerimientos que exige el experimento respecto a la edad del embrión. Generalmente para embriones de edad gestacional avanzada la electroporación *in utero* es altamente recomendada [87]. En este método, el ADN es inyectado en el ventrículo del cerebro del embrión de 15 días de gestación y se le imparten pulsos de onda cuadrada con un electrodo. Los embriones tratados sobreviven en el útero y pueden nacer y ser criados por su madre. Los genes son transfectados en las células adyacentes al lugar de la micro inyección. Debido a que la mayoría de las células transfectadas son progenitores neurales, las neuronas descendientes expresan los genes transfectados [87].

Los beneficios de esta técnica, además de ser rápida y altamente efectiva, se pueden enumerar en dos grandes grupos. El primer beneficio es que esta temporalmente restringida; es decir, que está limitada a un tipo particular de neuronas debido a que la generación de poblaciones neuronales es dependiente del estadio embrionario. En estadio embrionario 15 (E15), la población migratoria se dirige a las capas II/III generando largas proyecciones al cuerpo calloso. Debido a que estas proyecciones deben generar axones largos cuya inervación está a una distancia considerable de su soma celular, son un modelo de axogénesis interesante [11]. Además, en segundo lugar, se pueden co-electroporar varios plásmidos expresando diversos genes. Esto permite experimentos muy útiles de recuperación de fenotipo, dominantes negativas, silenciamientos conjuntos, etc. Entre las desventajas, podemos nombrar que requiere experticia del efector de la operación para asegurar la sobrevivencia de los embriones que además de la manipulación reciben pulsos eléctricos fuertes que pueden afectar su ritmo cardíaco. No obstante, una vez que se ha puesto a punto la técnica, la supervivencia es alta y el material a analizar abundante [88, 89].

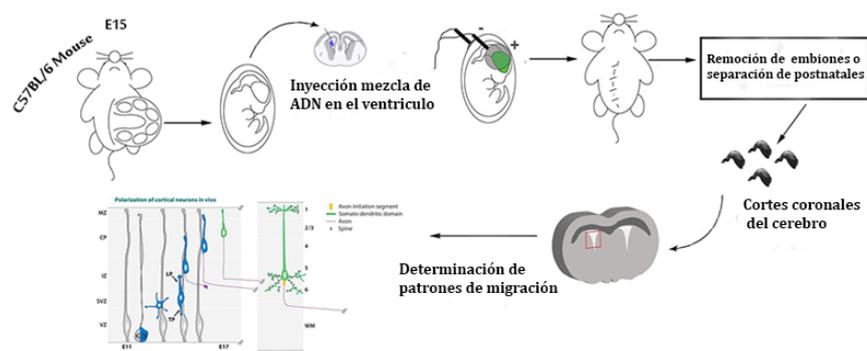


Figura 28 - Esquema explicativo de la técnica Electroporación In Útero. Partiendo de ratonas C57/BL6 preñadas de 15 días de gestación, se anestesian y se someten a una laparotomía, se extrae los embriones y se les inyecta en el ventrículo una mezcla de DNA y colorante. Se realiza una descarga eléctrica y se restituyen los embriones. Posteriormente a los N días luego de la intervención se sacrifica a las madres y los embriones. Se extrae el cerebro y se procesa obteniendo cortes coronales.

En el presente trabajo, para determinar el patrón migratorio de neuronas a las cuales se les silenció las proteínas Sec3 y Sec8 se operaron ratonas de 14,5 días de gestación. Los embriones fueron co-electropolarados con dos plásmidos diferentes, el plásmido pLKO.1-CMV-tGFP (Mission[®], Sigma Aldrich) diseñado para silenciar las proteínas de interés y un plásmido reportero que codifica para la proteína fluorescente DsRed. El promotor de los plásmidos utilizados en esta técnica debe ser fuerte, para poder asegurar su visualización a través del cerebro y asegurar un alto número de copias en los descendientes de los progenitores. Dentro de los promotores, el promotor CAG que codifica para beta-actina en pollo es altamente utilizado ya que es fácilmente observable en los embriones luego de la fluorescencia. Los promotores virales, como el CMV que poseen los plásmidos que contienen la secuencia de shRNA dirigido, no resultan suficientemente fuertes. Esta diferencia en los niveles de expresión de las proteínas a las que promueven, en este caso las proteínas fluorescentes, se debe a que CAG es promotor de un gen constitutivo mientras que el CMV es viral lo que lo vuelve más susceptible a ser regulado por el sistema de defensa del huésped [90, 91]. La solución para este problema es realizar una co-electroporación de ambos plásmidos (pCAG-DsRed y pLKO.1-CMV-tGFP), donde se ha determinado que los niveles de co-transfección son del 80% [92].

Luego de realizar la intervención quirúrgica los embriones son restituidos y en todos los casos el día seleccionado para obtener los cerebros de los embriones fue a E18. En este estadio, la corteza puede dividirse en 3 zonas características diferentes. La primera zona está comprendida por la zona ventricular (ZS) y zona sub ventricular (ZSV), la segunda es llamada zona intermedia (ZI) que posee la característica no poseer cuerpos celulares sino solamente axones y finalmente el plato cortical (CP). Las neuronas piramidales de la corteza cerebral extienden sus dendritas apicales hacia la superficie cortical, mientras que sus axones se ubican en la dirección opuesta hacia la materia blanca localizada en ventrículo. Esta orientación característica refleja la trayectoria migratoria de una célula piramidal durante el desarrollo cortical: el proceso principal (la dendrita apical futura) se extiende hacia el CP y el proceso posterior (el axón futuro) hacia la zona intermedia (IZ) mientras que las células migran radialmente para alcanzar su destino en el plato cortical. Sobre el PC se extiende una

zona, la zona marginal, que no resulta de interés para el presente trabajo ya que las células presentes en esa zona, las células de Cajal-Retzius poseen una función de stop. Estas células producen una proteína de la matriz extracelular denominada relina [93] . Esta proteína es una señal de stop para las neuronas que se encuentran migrando, por lo que no participan del proceso migratorio cortical en el estadio embrionario 15.

Para poder evidenciar la distribución celular de la corteza y delimitar las zonas los cortes cerebrales se realizó una marcación con DAPI, que al unirse a regiones del ADN permite identificar los somas de las neuronas lo que en este caso nos permite delimitar la ZI fácilmente y por consecuencia el resto de las zonas. La distribución celular migratoria de estas proteínas es observada en la **Figura 29**. Se utilizó una secuencia control y secuencias dirigidas a silenciar Sec3 y Sec8. En los experimentos control se puede observar que la mayor localización se encuentra en CP mientras que algunas se mantienen en la ZI. Sorprendentemente, podemos observar un retardo en el patrón migratorio de Sec3 resultando en la retención de las neuronas en la ZI. En contraposición las neuronas que poseen silenciado Sec8 no poseen una retención tal y pueden llegar fácilmente al CP. La cuantificación de las células presentes en cada zona se realizó revelando que la diferencia de células presentes el plato cortical de Sec3 respecto al control era significativa, demostrando estadísticamente que la retención de las células en zonas intermedias es significativa.

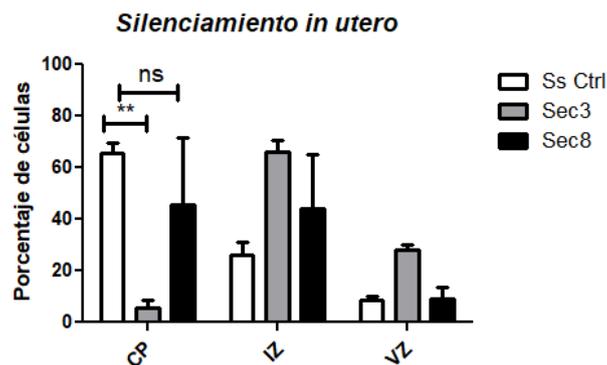
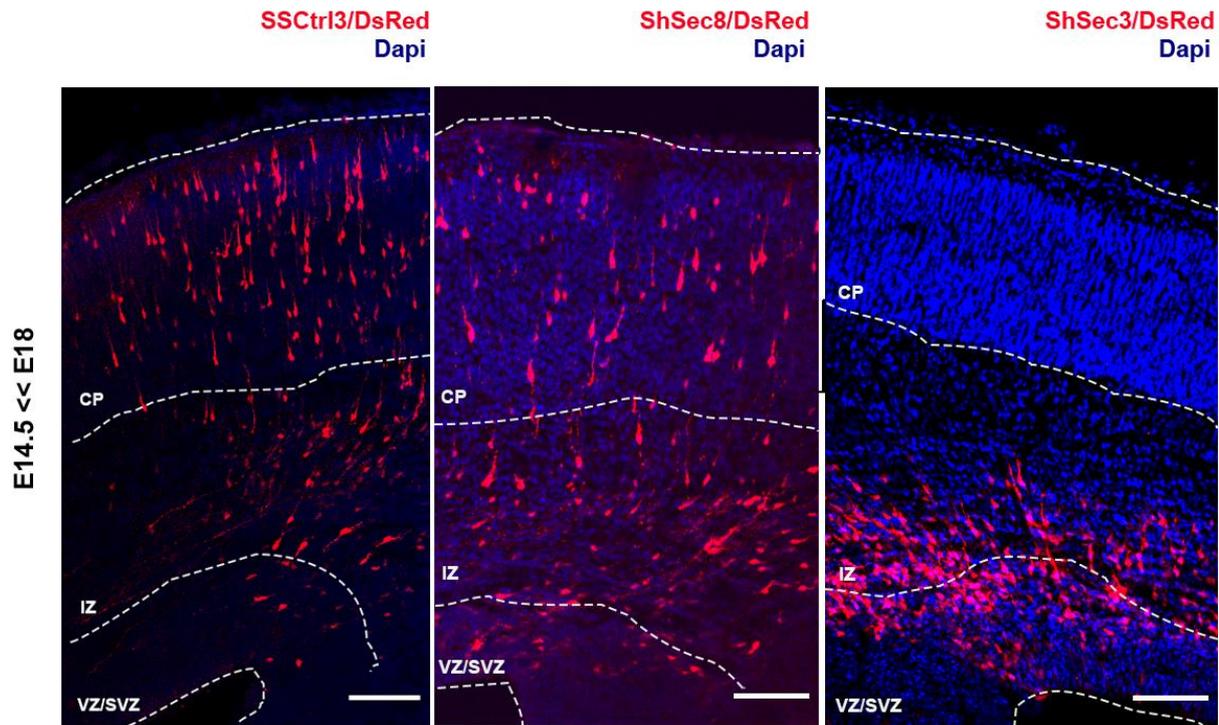


Figura 29 – El silenciamiento de Sec3 afecta la correcta migración de las neuronas en contraposición a Sec8 cuyo efecto no es diferente al del control. Izquierda: Cerebros embrionarios fueron electroporados con un shRNA específico para Sec3 o Sec8 o con su shRNA Scrambled como control al día E15 y analizados al día E18. Nótese que solo unas pocas células DsRed positivas logran migrar fuera de las zonas ventricular (VZ) y sub-ventricular (SVZ) cuando se bloquea la expresión de Sec3. En cambio, aquellas células a las que se les ha bloqueado Sec8 no poseen un problema en la migración neuronal. Barra de referencia: 100 μ m. Derecha: Cuantificación de la distribución de las células DsRed positivas en cada zona, tal como se indica en las imágenes. Se muestra el promedio \pm DE de al menos 30 cortes coronales provenientes de 3 experimentos realizados de manera independiente que mostraron los mismos resultados, con análisis ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. ** $p < 0.01$; ns = no significativo.

Debido al interés que nos manifestó el efecto de retención en aquellas células marcadas con Sec3, realizamos una magnificación en la imagen para poder evaluar la orientación de estas

células. Podemos ver en la **Figura 30** que aquellas células que logran salir de la ZV/SVZ se presentan orientadas radialmente (prolongaciones dirigidas hacia el PC), mientras que aquellas retenidas muestran una desorientación. Este resultado es obtenido de estudios preliminares, para poder establecer la orientación es pertinente realizar marcaciones de organelas como por ejemplo aparato de Golgi o de segmento inicial de axón marcando ankirina y analizar de manera estadística si aparte de la migración la orientación se ve afectada [24].

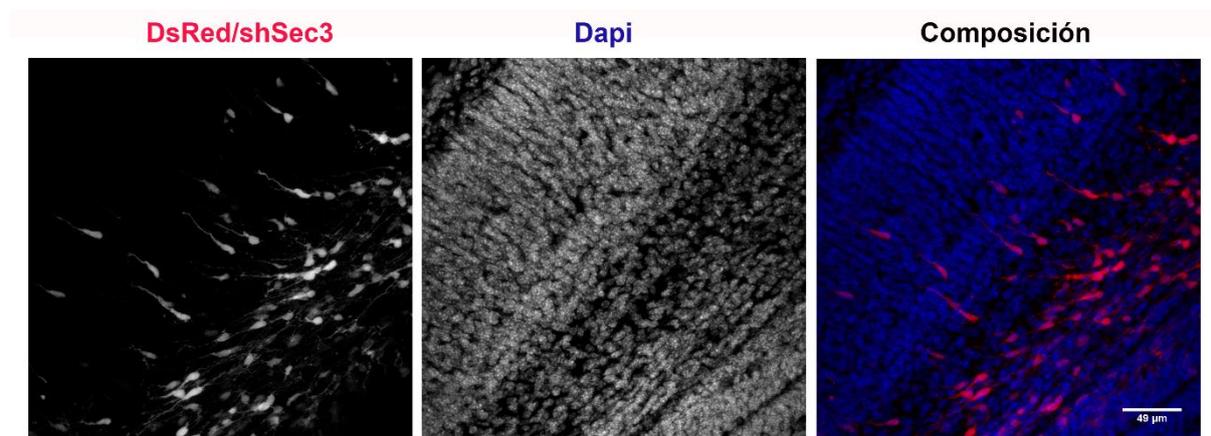


Figura 30 – La orientación de las células retenidas en ZSV/ZV que has sido silenciadas para Sec3 es aberrante. Cerebros embrionarios fueron electroporados con un shRNA específico para Sec3 al día E15 y analizados al día E18. Nótese que las unas pocas células DsRed positivas logran migrar fuera de las zonas ventricular (VZ) y sub-ventricular (SVZ) presentan una orientación radial mientras que aquellas retenidas en la zona presentan una orientación aberrante no radial. Se muestra 1 experimento de 3 experimentos realizados de manera independiente que mostraron los mismos resultados. Barra de referencia: 49 µm

Es pertinente demostrar que en ambos modelos se obtuvo un resultado que permite arribar a conclusiones comparables. En ambos modelos el silenciamiento de Sec8 no afectó el desarrollo normal de la neurona, mientras que la disminución a niveles basales de Sec3 produjo problemas en el desarrollo neuronal bloqueando la formación axonal o inhibiendo la correcta migración de las neuronas. Por ello podemos concluir que Sec3 es necesaria para la polaridad neuronal mientras que Sec8 no lo es.

Estos resultados demuestran una gran solidez debido a que se demostraron conclusiones análogas por dos metodologías. La validación del resultado en modelo de electroporación *in*

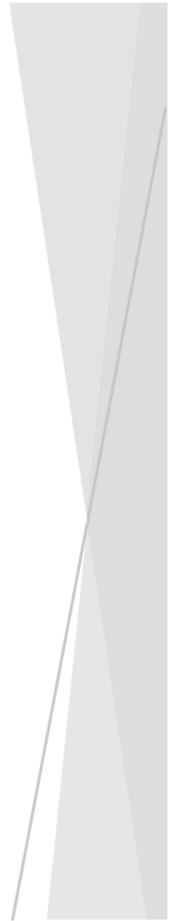
utero es de gran importancia ya que el método de cultivo primario de neuronas fue muchas veces puesto en duda como método de análisis de procesos relacionados a la polaridad ya que la célula sufre procesos de repolarización en su sentido más estricto.

Conclusiones Capítulo 3

¿Cuál es el efecto del silenciamiento de Sec3 y Sec8 en la formación de axones en modelos in vitro?

¿Cuál es el efecto en la migración de neuronas silenciadas en modelos in vivo?

- En cultivo, el silenciamiento de Sec3 afecta la diferenciación neuronal no permitiendo que las neuronas polaricen correctamente. En oposición el silenciamiento de Sec8 no afecta a la polaridad neuronal pudiendo general axones Tau1 positivos de largo no diferente significativamente a el control.
- En el modelo de electroporación *in utero* las neuronas electroporadas con shRNA dirigidos contra Sec3 no pueden migrar adecuadamente. Además, se evidenciaría una desorientación marcada en aquellas neuronas arrestadas. Por otro lado, el silenciamiento de Sec8 no parece afectar la migración o la orientación.



DISCUSIÓN

“La ciencia nunca resuelve un problema sin crear otros 10 más.” George Bernard Shaw

La polarización de los axones y las dendritas está supeditada a la capacidad de las neuronas para integrar y transmitir información en el cerebro. La polarización neuronal se ha abordado utilizando una amplia gama de técnicas y sistemas modelo. El advenimiento del etiquetado genético y las técnicas microscópicas de *time imaging* permite la observación de los aspectos más tempranos de la polarización neuronal en un entorno celular contextual [9].

En *vivo*, los eventos de "ruptura de simetría" que conducen a la aparición de la dendrita y el axón requieren la capacidad de las neuronas postmitóticas para detectar gradientes de señales extracelulares que conducen a la activación asimétrica de las vías de señalización subyacentes a la formación del axón [15]. Si el mecanismo que permite censar estas señales extracelulares no se encuentra activo resulta en una pérdida de la posibilidad de polarizar.

Para que un axón se forme son necesarios dos eventos altamente interrelacionados: el reordenamiento del citoesqueleto y la expansión polarizada de membrana. En nuestro laboratorio, se ha estudiado la expansión de membrana en diversos modelos de estudio postulando conclusiones sólidas para la descripción de un mecanismo para la regulación de la expansión de membrana en el axón en crecimiento. En este modelo, la neurona en crecimiento sintetiza las vesículas (PPVs) que contienen el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (rIGF1) y se transportan al cono de crecimiento axonal mediante un mecanismo dependiente de KI1B [38]. La estimulación del rIGF1 activa la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K, que comprende un catalizador p110 y una subunidad reguladora de p85) y la síntesis de fosfatidilinositol-3,4, 5-trisfosfato (PtdIns (3,4,5) P3), que a su vez aumenta la actividad de AKT siendo este un mecanismo involucrado en la inserción de membrana durante el crecimiento axonal. Este modelo describió por primera vez que la inserción de membrana es esencial para la polaridad presentando la señal externa bajo la cual este fenómeno es regulado. Este hito abrió todo un campo de estudio de la exocitosis regulada de PPVs en la cual todos los elementos intervinientes en este proceso cascada debajo de este factor trófico se convierten en elementos involucrados en la polaridad neuronal.

Trabajos previos del laboratorio determinaron que la regulación de la expansión de membrana está regulada durante la fusión de vesículas. Moviéndose en microtúbulos acetilados (estables) [94], el motor microtubular Kinesina 1C transporta las proteínas SNARE Stx6 y VAMP4 las cuales son esenciales para la polaridad neuronal [31]. El proceso de expansión de membrana no solo se encuentra regulado durante la fusión vesicular sino

también a nivel del *tethering* vesicular. La estimulación con IGF1 promueve a la GTPasa TC10, que puede reclutar la proteína Exo70 del complejo de *tethering* exocisto, a la membrana plasmática e iniciar la fusión [40]. A partir de este hallazgo, determinar que otras proteínas relacionadas al CE poseen influencia en la polaridad neuronal se convirtió en uno de los puntos de interés del laboratorio y de esta tesis.

Una importante pregunta que nos resulta difícil de responder es como los complejos de anclaje pueden ser esenciales para la polaridad neuronal. Si bien el CE promueve la fusión de vesículas a la organela correcta ya que desde el punto de vista cinético su participación puede tener una influencia muy importante siendo un seleccionador rápido del destino de las vesículas. ¿Pero puede ser el rol del complejo exocisto más importante que una simple red de anclaje de vesículas? Algunos estudios sostienen que el rol de este complejo es también termodinámico promoviendo activamente la fusión interaccionando con diversas proteínas involucradas como las Rabs y las SNARES. Una idea interesante se ha planteado involucrando a proteínas de este complejo en el alivio de la auto inhibición de las SNARES ayudando a pasar de su conformación Trans (inactivo) a su conformación Cis (activo) [95].

Para poder aclarar el panorama sobre el rol del CE, el análisis de las subunidades que conforman el mismo resulta crucial para el avance. En concordancia a la estrategia de estudio planteada, esta tesis ayuda a dilucidar el rol de las subunidades determinando porque dos proteínas del mismo complejo con una distribución temporal y espacial análoga poseen roles funcionales diferentes en la polaridad neuronal. ¿Cómo es posible que dos proteínas que forman parte del mismo complejo pueden tener roles diferenciales en la polaridad neuronal? Para arribar a una conclusión, debemos hacer un repaso por los diversos resultados obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral.

Determinamos que Sec5, Sec3 y Sec8 están presentes en neuronas piramidales de hipocampo desde estadios tempranos de crecimiento. Respecto a su localización en la célula neuronal determinamos que Sec3 y Sec8 presentan una localización preferencial en el tercio distal del axón y están presentes en conos de crecimiento, mientras que Sec5 no posee una localización preferencial en el CdC. Una primera diferencia entre Sec3 y Sec8 se evidenció en que la distribución de Sec3 en CdC es dependiente de IGF1 mientras que la distribución de Sec8 no es modificada por la estimulación de este factor. Además, definimos que Sec3 se encuentra presente en la membrana GCPs y está asociada a MTs en el citoesqueleto mientras que Sec8

presenta una localización ubicua en el cono de crecimiento tanto en membrana como en citoesqueleto y citosol. Al evaluar la funcionalidad de estas proteínas respecto a la polarización, logramos determinar que en neuronas piramidales de hipocampo el silenciamiento dirigido contra Sec3 inhibe la polaridad neuronal mientras que Sec8 no presentaba un efecto de arresto en la polaridad neuronal. Los resultados de este modelo fueron validados en un modelo *in utero*, donde el silenciamiento de Sec3 retrasa la migración y afecta a la orientación de neuronas corticales hacia las capas más externas mientras que el silenciamiento de Sec8 no posee tal efecto.

¿Qué hace que una de ellas sea necesaria para la polaridad neuronal y la otra no? ¿Su estructura intrínseca, sus interacciones con otras proteínas o su ubicación en el complejo?

Respecto a la estructura de estas proteínas si comparamos su secuencia notamos que comparten poca homología, presentando zonas muy variables entre unas y otras. Ya que la secuencia de aminoácidos no es un determinante de cercanía estructural, las estructuras cristalinas presentan motivos estructurales similares. Por ello sostenemos que a nivel estructural estas proteínas no presentan diferencias marcadas que puedan evidenciar su rol diferencial en la polaridad.

Puede que la diferencia radique en la interacción que presentan Sec3 y Sec8 con otras proteínas del complejo o bien con proteínas reguladoras tales como Rabs. Aunque las subunidades del exocisto comparten homología estructural, sus superficies presentan características hidrófobas y patrones electrostáticos únicos. Esta diversidad de propiedades de superficie de las proteínas indica funciones de enlace únicas de las subunidades individuales, ya sea dentro del complejo o individualmente con otras proteínas que no forman parte del complejo. Esto nos hace pensar que el poder interactuar con determinadas proteínas o membranas podría ser la razón del comportamiento diferente.

Ensayos realizados en levadura indican que todas las subunidades del complejo exocisto poseen la potencialidad de reclutar a otras sub unidades a diferentes membranas en levaduras. Además, en el mismo organismo la deslocalización de todas las unidades afecta el crecimiento. Sin embargo solamente Sec3 posee la capacidad de reclutar vesículas (además de otras subunidades) mientras que ninguna de las otras subunidades posee esta capacidad [96]. Esto define que si bien las interacciones proteicas en el complejo son importantes la

potencialidad de reclutar con vesículas solamente es presentada por alguna de sus subunidades. Para poder estudiar las interacciones establecidas entre algunas subunidades del complejo y otras superficies como la membrana un grupo de investigación planteó experimentos de dinámica de simulaciones. En estos experimentos se simuló la unión a membrana de Sec3 y Exo70 y posteriormente se analizó que aminoácidos interactuaban con la superficie. Los residuos que interactuaban con la membrana corresponden a los que están altamente conservados en la especie [97]. Esto indica que la asociación a membrana de las subunidades es altamente conservada a través de las diversas especies y representa un mecanismo ancestral de *targeting*. Por el contrario, las interacciones dadas entre las subunidades del CE es más tendiente a ser organismo dependiente. Por lo tanto, las interacciones de las subunidades con la membrana parecen estar altamente conservadas.

La interacción de las subunidades con la membrana plasmática está relacionada con la ubicación de estas proteínas en el CE. Los estudios realizados en las últimas 3 décadas permitieron establecer la ubicación espacial de las subunidades en todo el complejo determinando que subunidades presentan interacciones con la membrana plasmática y la membrana vesicular [98]. Muchos estudios indican que Sec10 y Sec15 interactúan con la membrana de la vesícula secretoria mientras que Exo70 y Sec3 interactúan con la membrana plasmática. Casualmente dos proteínas estudiadas, Exo70 por nuestro laboratorio y Sec3 en la presente tesis, resultan necesarias para la polaridad neuronal.

Sostenemos que, dentro del complejo, existen posiciones que son esenciales para reclutar vesículas como las que interactúan de manera directa con la membrana plasmática o vesicular y que el resto de las proteínas del complejo, como por ejemplo Sec8, no presentan un rol crucial en la formación del complejo; aunque sí podrían tenerlo en la interacción con GTPasas y en la unión de subcomplejos.

La reconstrucción de la arquitectura del complejo *in vivo* mostró que las subunidades del mismo tienen forma de vara con sus extremos N y C ubicados en los extremos opuestos de la vara, tal como se planteó anteriormente en modelos fijados. El exocisto se organiza en brazos de diferentes longitudes, que se reúnen en el núcleo central y se proyectan en diferentes direcciones. Las partes distales de los brazos en la periferia del complejo pueden cambiar su conformación sin afectar al resto del complejo. Sec8 ocuparía una de estas partes distales del complejo y por ello no sería esencial en los procesos de polaridad neuronal ya que su rol en

la fusión de vesículas no sería primordial [98] mientras que la interacción de Sec3 con la membrana es necesaria para el ensamblado del CE y por lo tanto esencial para la polaridad neuronal.

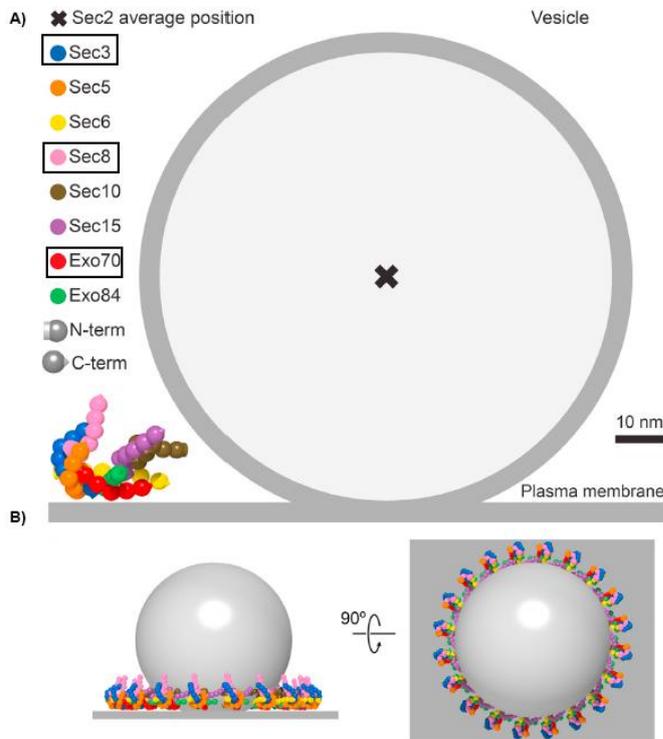


Figura 31 – Arquitectura del CE *in vivo*. A) Representación esquemática de la estructura del exocisto unida a la membrana plasmática y una vesícula con un radio de 50 nm. En color celeste (Sec3) y en color rojo (Exo70) se puede ver cómo estas dos proteínas interactúan con la membrana. Sec8 (color rosa) presenta una posición distal de la membrana plasmática y la membrana vesicular. B) Hasta 20 copias del exocisto podrían participar simultáneamente en el anclaje de vesículas, formando un anillo que rodea la interfaz entre la vesícula y la membrana plasmática. Se muestran la vista lateral y la rotación en 90°. Modificado de Picco et.al.

Finalmente concluimos que los roles funcionales diferentes de Sec3 y Sec8 se deben a que poseen una localización disímil en el complejo exocisto. De esta manera una diferencia tan pequeña conlleva a una diferencia funcional en los mecanismos de establecimiento de la polaridad neuronal.

Estos resultados demuestran que la polaridad neuronal debe encontrarse entre los procesos más complejos estudiados. La alta polaridad que poseen las neuronas que facilita el ensamblaje de circuitos complejos podría ser un buen candidato para ser asociado al gran avance del sistema nervioso de vertebrados. Entre las características evolutivas que se mantuvieron, la direccionalidad del citoesqueleto en dendritas y axones son anteriores a la divergencia evolutiva de vertebrados. Esta dinámica del citoesqueleto permite determinar la direccionalidad en el transporte de los diversos cargos a los sitios de inserción específicos. Esto determina que el transporte e inserción de vesículas en espacios demarcados se han

mantenido a nivel evolutivo y han sido fundamentales para la evolución de la neurona en sistema nerviosos complejo

Los comportamientos elaborados de los vertebrados son posibles gracias a la evolución del sistema nervioso tanto en tamaño como en complejidad incomparables con otros organismos como los vertebrados. Pero, ¿son las neuronas del sistema nervioso de los vertebrados también únicas o especiales de alguna manera? ¿Tienen características solo para vertebrados que facilitan el ensamblaje de sistemas nerviosos grandes y complejos? [99]. Pareciera ser que el estudio de la polaridad es más que un simple estudio de mecanismos que conducen a la formación de un axón sino que podría ser la clave para poder responder a estas preguntas.

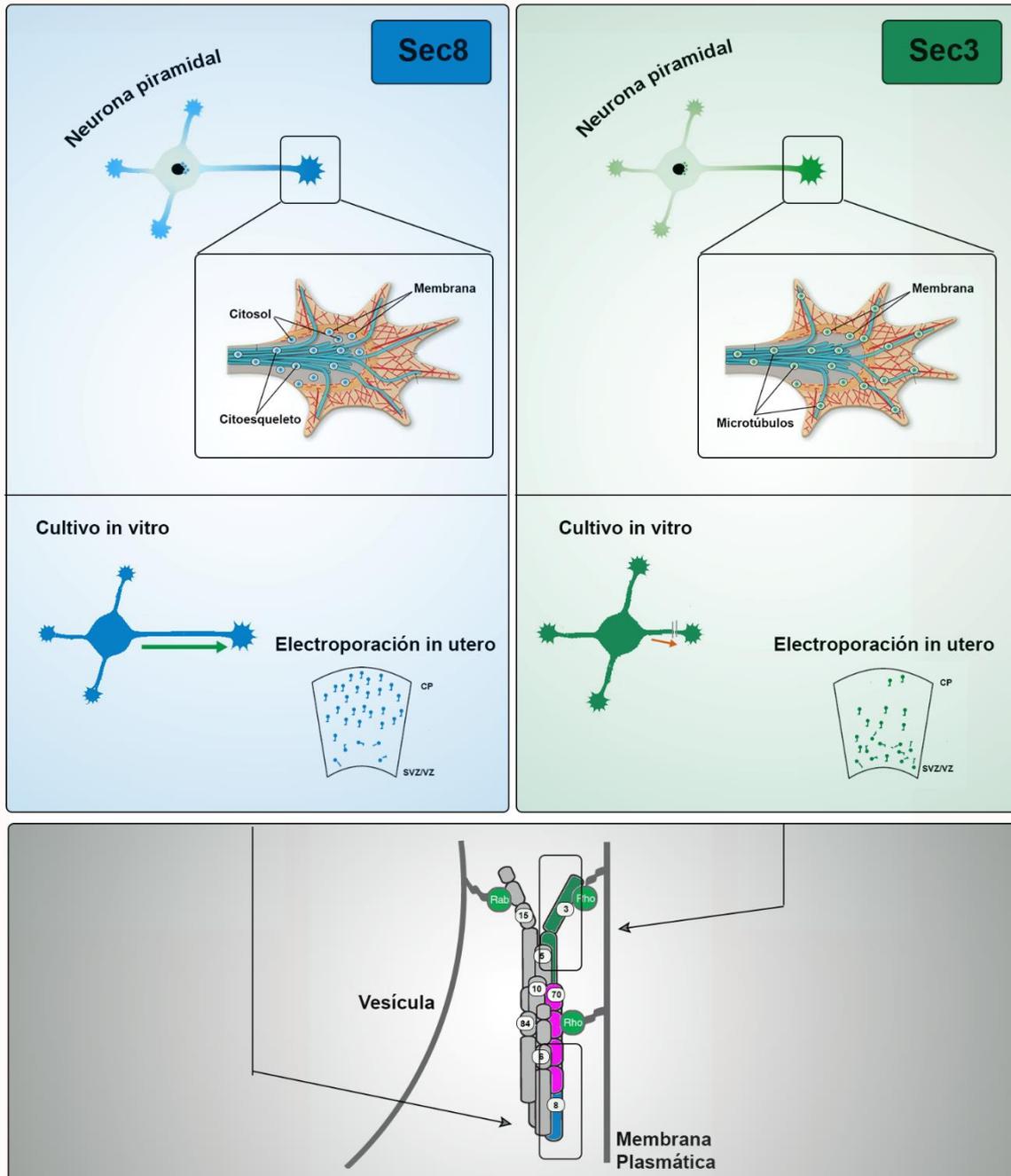


Figura 31 –Cartoon explicativo de los resultados de tesis.
 Modificado de [1, 5, 51, 100]

MATERIALES Y MÉTODOS- DISEÑO EXPERIMENTAL

Animales

Los protocolos de alojamiento, manipulación y eutanasia de los animales se rigen por las regulaciones detalladas en *Guide for the care and use of laboratory animals* (Eighth Edition) del *National Research Council* (Washington, USA) y los lineamientos descriptos en la Guía para cuidado y uso de animales de experimentación emitida por el INTA (Morón, Buenos Aires, Argentina). Los mismos han sido aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Protocolo aprobado en Res. 747/2018, expediente UNC:0002349/2018; Acreditación Lic. Julia Florentyna Bustos Categoría B aprobada en Res. 1003/2018, expediente UNC:001 5868/2018). Para los experimentos de cultivos de hipocampo se utilizaron ratas Wistar endocriadas y para los de electroporación se utilizaron ratones endocriados C57BL6/J.

Cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata

Para los cultivos de neuronas piramidales de hipocampo, se utilizaron embriones de rata de 18 días gestación. 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's (HEPES 10 mM, NaCl 4 g, KCl 200 mg, Glucosa 500 mg, KH₂PO₄ 30 mg, NA₂HPO₄ 23,7 mg, H₂Ocsp 500 ml, pH= 7.4) a 4°C. Los hipocampos se extrajeron mediante microcirugía bajo lupa estereoscópica Stemi DV4, Zeiss y se incubaron en solución de tripsina Life Technologies al 0,25% 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's a 4°C y colocados en tubo plástico estéril de 15 ml conteniendo medio de cultivo DMEM/HS 5% (DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium-Gibco) a 37°C. Los hipocampos fueron disociados utilizando pipetas Pasteur de vidrio de diámetros decrecientes hasta lograr una suspensión homogénea. Si las células se utilizaban para realizar transfecciones la disgregación se realizó en medio Opti-MEM (Opti-MEM–Minimal Essential Medium-Gibco). Las células disociadas fueron sembradas sobre cubreobjetos previamente cubiertos con Poli-L-lisina (1mg/ml en buffer borato pH=8; el exceso de poli lisina es eliminado con 6 lavados de agua miliQ) con una densidad aproximada de unas 70000 células/cm² en el caso de efectuar transfecciones y 40000 células/cm² para inmunofluorescencias sin transfección. Los cultivos fueron mantenidos en medio de cultivo DMEM/HS 10% por 2h en incubadora a 37°C con 5% de CO₂. Una vez adheridas el medio es cambiado a Neurobasal (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 500uL N2 y 1mL de B27 (Thermo Fisher Scientific), glutamina 29 mg, piruvato 11 mg. 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 también los receptores de IGF-1. En aquellos experimentos de deprivación y posterior estimulación en agudo con IGF1, las células se dejaron crecer por el tiempo determinado en Neurobasal sin suplementos. La estimulación se realizó adicionando al medio el IGF1 en una concentración final de 20nM. Los cultivos se estimularon en estufa a 37°C y fijados posteriormente. Las células obtenidas fueron utilizadas para los siguientes ensayos.

1. Inmunofluorescencia

Las células fueron fijadas con solución de paraformaldehído-sucrosa al 4% p/v en solución salina de PBS (buffer fosfato 10mM, NaCl) agregando cantidades crecientes de solución durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los discos son lavados 3 veces por 10 minutos cada vez con PBS, permeabilizadas con Tritón X-100 (Sigma Aldrich) al 0.2% en PBS durante 6 minutos y lavadas nuevamente con PBS. Los discos fueron incubados en cámara húmeda con solución bloqueante (suero de caballo 2% (v/v) y Albúmina Sérica Bovina 3% (p/v) en PBS) por 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en buffer de bloqueo conteniendo los diferentes anticuerpos, lavadas tres veces con 10 mM PBS e incubadas con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Finalmente, se lavaron nuevamente con 10 mM PBS tres veces, 2 veces con agua MilliQ y se montaron utilizando medio de montaje FluorSave (Millipore).

Proceso de adquisición de imágenes para localización en diferentes estadios					
Microscopio	Dominio de adquisición	Objetivo	Resolución	Zona de interés	Tiempo de Cultivo
Olympus FV100	X,Y	60x; 40X	1024x1024	Rata. Neuronas piramidales de hipocampo. Células completas	12 a 40h

2. Transfección

Se prepara la solución de transfección mezclando 48ul de medio de transfección OPTIMEM a 37 °C con 1,2 uL de Lipofectamina 2000 (incubados durante 10 min). Por otro lado, se prepara una solución de 30uL de OPTIMEM a 37 °C con una cantidad de DNA determinada según el experimento (entre 0,3 a 0,6ug). Se añade esta última solución a la primera y se incuba la solución resultante durante 25min a temperatura ambiente. Por otro lado, se determina en cámara de Neubauer la cantidad de células presentes en la suspensión celular. Se agrega el equivalente a 70000 células (15-20 uL) al complejo OPTIMEM/Lipofectamina/DNA y posteriormente se deposita esta mezcla sobre los vidrios tratados con poli-L-lisina, formando

una gota sobre los mismos. Se permite que la reacción de transfección tuviera lugar durante 90 minutos, luego que las células se adhirieron a sustrato se retira la gota de complejo transfectante y se reemplaza con medio definido N2 Neurobasal. Una vez finalizada la transfección (tiempo cero de cultivo primario) se permite la expresión de las diferentes construcciones. Las diferentes células en los diferentes estadios son cuantificadas. Se pueden obtener imágenes según se explicó anteriormente.

Proceso de cuantificación de imágenes de estadios de crecimiento axonal					
Microscopio	Dominio de adquisición	Objetivo	Resolución	Zona de interés	Tiempo de Cultivo
Zeiss Axioplan	No se adquirieron, solo cuantificación	40X	-----	Rata. Neuronas piramidales de hipocampo. Células transfectadas.	12 a 40h

3. Análisis de Colocalización

Las células en estadios de crecimiento 2 tardíos se fijaron como se describió anteriormente para la inmunofluorescencia y se marcaron con los anticuerpos correspondientes. Las imágenes se tomaron de la siguiente manera.

Proceso de adquisición de imágenes					
Microscopio	Dominio de adquisición	Objetivo	Resolución	Zona de interés	Tiempo de Cultivo
Olympus FV100	X,Y,Z (2µm)	60x	1024x1024	Rata. Neuronas piramidales de hipocampo. Tercio distal del axón y cono de crecimiento axonal	18-20h

Se analizaron 15 imágenes provenientes de 3 experimentos diferentes con metodología doble ciego. Las imágenes fueron denconvolucionadas con el *software* Huygens Essencial. Las imágenes obtenidas fueron tratadas con el software Fiji y el análisis de colocalización se efectuó con el *plug in* JACoP. Los coeficientes de Pearson, Manders y Manders Fraccionario fueron analizados con la aproximación de Costes en todos los casos. El enfoque de Costes se realiza de la subsiguiente manera. En primer lugar, la correlación en diferentes regiones del histograma bidimensional se tiene en cuenta para estimar un umbral. Para calcular este umbral automático, los valores límite para cada canal se inicializan a la intensidad máxima de cada canal y se disminuyen progresivamente. El coeficiente de Pearson es concomitantemente calculado para cada incremento. Los umbrales finales se establecen a

valores que minimizan la contribución del ruido (es decir, PC bajo el umbral es nulo o negativo).

4. Análisis con TIRFM

La microscopía TIRF presenta un modo de iluminación que se basa en un campo evanescente que se produce cuando los rayos de luz son totalmente reflejados internamente en la interfaz de la cubierta de vidrio/sustrato. El campo evanescente no se propaga profundamente en la muestra; por lo tanto, las imágenes no están contaminadas con fluorescencia de los planos fuera de foco. Como resultado, la microscopía TIRF proporciona un medio para obtener imágenes de fluoróforos cerca de la interfaz de vidrio/sustrato de cobertura con una alta relación señal/ruido, lo que la convierte en la técnica estándar actual para estudiar eventos que ocurren en la membrana de plasma adherente de las células [101, 102].

Las células en estadios de crecimiento 2 tardíos se fijaron como se describió anteriormente para la inmunofluorescencia y se marcaron con los anticuerpos correspondientes. Estas imágenes se analizaron con un microscopio que permite tomar el plano de la membrana celular solamente. Las imágenes se tomaron de la siguiente manera.

Proceso de adquisición de imágenes					
Microscopio	Dominio de adquisición	Objetivo	Resolución	Zona de interés	Tiempo de Cultivo
Olympus DSU/TIRF	Plano TIRF	100x	1024x1024	Rata. Neuronas piramidales de hipocampo. Cono de crecimiento axonal	18-20h

Luego de tomadas las imágenes se trabajaron en el programa FIJI. Junto con la imagen de TIRF se tomó una imagen de epifluorescencia en la que se delimitó el área del cono analizar. En este programa se contaron la cantidad de píxeles en el canal de TIRF. Se obtuvo la relación de píxeles por μm^2 . Se analizaron 14 conos en cada condición provenientes de 3 experimentos independientes.

Electroporación *in utero*

La técnica de electroporación *in utero* consiste en realizar una operación abdominal llamada laparotomía a hembras de la cepa C57BL6/J preñadas con ratones de 15 días de vida intrauterina. Previo a la operación se preparan los plásmidos que se van a utilizar en una mezcla que contiene CAG-DsRed a $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y shRNA específicos para cada experimento (Sigma-

Aldrich, St. Luis, MO) ambos junto a 0.5ul del colorante tripan blue para poder ver la solución durante el procedimiento.

La mezcla de plásmidos más el colorante son cargados en una aguja realizada específicamente para este propósito a partir de capilares (World Precision Instruments inc.) en un puller (Sutter P-97), siguiendo las siguientes especificaciones: calor 240, fuerza de 30 y velocidad 40, se obtienen las agujas, para el procedimiento.

Se anestesia a las hembras gestantes E15 con ketamina/xilacina, se desinfecta la zona abdominal con etanol 70% y alcohol yodado y se rasura la zona uterina. Se realiza un pequeño corte a nivel epitelial y muscular, de un tamaño suficiente para extraer los cuernos uterinos y los embriones con facilidad. Una vez en el exterior es importante que los embriones se humedezcan en todo momento con solución salina (NaCl 0,9%) suplementado con penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO). El ADN se inyecta en el ventrículo lateral usando una pipeta controlada por boca (*mouth controlled pipette*), bajo luz de fibra óptica (este tipo de iluminación evita que se sobrecaliente el área y que además se seque menos). Los animales correctamente inyectados son visualizados por el colorante que permite ver el ventrículo cargado con la mezcla de ADN en forma de medialuna. El siguiente paso es ubicar electrodos sobre la cabeza del embrión y se precede a electroporar los embriones, esto permite que el ADN sea incorporado en las células gracias a la carga negativa del ADN, que migra hacia el electrodo positivo del campo eléctrico aplicado. El pulso eléctrico producido es de onda cuadrada de 38v; duración del pulso 50ms, pulsos 5; espacio entre pulsos, 950ms en un electroporador realizado en la UNC. Al terminar la cirugía se reintroducen los cuernos uterinos en el abdomen y se agrega solución salina en la cavidad, se cose todas las capas. Se le inyecta una solución analgésica de Tramadol y se deja recuperar a la ratona en cama caliente. Con el siguiente procedimiento se obtuvieron los cerebros electroporados para los siguientes experimentos.

1. Análisis de la migración en cerebros electroporados

Luego de la operación los embriones crecen dentro de la cavidad uterina hasta los 18 días de gestación. La hembra es anestesiada y sacrificada por desmedulación ósea. Posteriormente los embriones son removidos del saco amniótico. La cabeza es diseccionada y se extraen los cerebros. Estos cerebros se embeben en PF 4% p/v por 24h. Luego son pasados a una solución de Sucrosa al 30% p/v por al menos 48h. Los cerebros son congelados en *Cryoplast* (Biopack) en nitrógeno líquido y llevados inmediatamente a -80°C. Finalmente son cortados en un criostato en rebanadas de 20um y montados en vidrios xilenizados. Las rodajas se dejan secar por 4h a 37°C o O.N a temperatura ambiente. Posterior a ello se efectúan 3 lavados de PBS por 10 minutos cada uno. Se

bloquea con una solución de Triton X100 al 0,02% que contiene Dapi por 1h a temperatura ambiente. Se vuelven a lavar de la misma manera los vidrios y se montan con liquido de montaje. Posterior a ello se procede a tomar las imágenes.

Proceso de adquisición de imágenes					
Microscopio	Dominio de adquisición	Objetivo	Resolución	Zona de interés	Tiempo post operación
Olympus FV1200	X,Y,Z (2µm)	10x	1024x1024	Ratón. Cortes coronales de cerebro	3 días E18

Cuantificaciones y análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el *software* GraphPad Prism. En todos los casos se realizaron al menos 3 experimentos independientes. En los experimentos *in vitro* se efectuaron por triplicado cuantificando 100 células de cada experimento y en *in vivo* se cuantificaron células de al menos 30 rodajas de cerebro. Para los experimentos de colocalización y TIRF se utilizaron 15 conos provenientes de diferentes cerebros. Los análisis estadísticos utilizados fueron test de Student y Anova de dos vías con post-test de Bonferroni, según se indica en cada ensayo. En todos los casos: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ ns: no significativo.

Metodologías de cuantificación y procesamiento estadístico			
Experimento	Software de procesamiento	Software estadístico	Test Aplicado
Silenciamiento <i>in vitro</i>	-	Graph Pad Prism	Anova de dos vías con test post hoc Bonferroni
Silenciamiento <i>in utero</i>	Fiji (contabilización de partículas en cada zona cortical)	Graph Pad Prism	Anova de dos vías con test post hoc Bonferroni
Largo de Axón células Sec8	Fiji (medición largo de axón)	Graph Pad Prism	Test de Student
Colocalización	Fiji (JACoP)	Graph Pad Prism	Test de Student
TIRFM	Fiji (Contabilización de partículas por área)	Graph Pad Prism	Test de Student

Preparación 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, MgCl₂ 3mM, EGTA 5mM 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 centrifuga a baja velocidad (15 min a 3500 rpm) y el sobrenadante LSS (del inglés *Low Speed Supernatant*) fue sometido a una ultracentrifugación 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 242.00g durante 40 min con el rotor vertical VTi50.1 (Beckman). Se toma la fracción ubicada en la interfase 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 interfases 0,83-1 M ("B") y 1 M-2,66 M ("C") que no revierten particular interés en el experimento.

Si se centrifuga la fracción "A" a 16.000 rpm por 1h, en rotor VTi 70.1 (Beckman), sobre un colchón de Sucrosa 2,66 M se obtiene una interfase altamente enriquecida en conos de crecimiento aislados.

Los GCPs o la Fracción A fueron utilizados en los siguientes experimentos.

1. Inmunoaislamiento

Se toma una alícuota de GCPs por reacción a realizar de manera que la concentración fuera de ~300 mg de proteína total. Los GCPs fueron incubados en hielo por 45min. Seguidamente se adiciona factor de crecimiento IGF-I en una concentración final de 20 nM durante 15 min y a 4°C en agitación constante. Posteriormente se agregó 100 uL de una solución de estimulación (3 uL saponina 2%; 30 ul buffer intracelular 10X [Hepes 20 mM, NaCl 5 mM, KCl 50 mM, MgCl₃ mM]; 3 ul ATP y 64 ul H₂O) y se deja reaccionar durante 2 minutos a 37°C. La finalidad de la estimulación fue favorecer la exocitosis de PPVs. Para tales experimentos fue realizado un control que no fue estimulado con IGF1. Los GCPs estimulados y no estimulados fueron incubados con 200 ul buffer de lisis (*Ice Cold Lysis Buffer*: EDTA 0,5 mM; Tris-HCl pH:7,5 6mM; Triton X100 1% v/v; NaCl 150 mM; PMSF 1mM; Aprotinina y H₂O) a 4°C por 45 min. Dicho buffer esté formulado para promover una lisis suave, a modo de permitir la liberación de las PPVs contenidas en los GCPs, las cuales se mantienen intactas. Este complejo de estructuras membranosas fue incubado con el anticuerpo primario de elección durante toda la noche a 4 °C en agitación constante.

Para poder aislar la proteína de interés se utilizaron esferas de sefarosa unidas a proteína A. En cada condición se tomaron 20uL de *beads* (complejo de sefarosa y proteína) que fueron

sometidas a 5 ciclos de lavado con Ice Cold Lysis Buffer (EDTA 0,5 mM; Tris-HCl pH:7,5 6mM; Tritén X100 1% v/v; NaCl 150 mM y H₂O) y centrifugación a 4000rpm por 3 min a 4°C. Una vez concluidos los lavados, las esferas fueron agregadas a la mezcla de estructuras membranosa (previamente incubadas con anticuerpo primario) durante 3 horas a 4°C en agitación constante.

Se agregó además un control en el cual la solución conteniendo a las PPVs y estructuras lisadas no fueron incubadas con anticuerpo primario, de modo de evidenciar unión inespecífica de las esferas con las estructuras membranosas. Luego de la incubación del complejo la mezcla fue centrifugada durante 10 minutos a 4.000 RPM y 4 °C. Se recolecta el sobrenadante (SN) y se procede a concentrarlo por el método de metanol/cloroformo. Paralelamente, el precipitado de esferas, el IP, fue lavado como se explicó anteriormente a fines de eliminar cualquier traza de material inespecífico. Paso seguido el sobrenadante y el precipitado fueron suspendidos en *Sample Buffer* 5X. Sobrenadante y precipitado fueron entonces calentados a 90-95 °C por 5 minutos e inéditamente almacenados a -20 °C para su posterior análisis mediante *Western Blot*.

2. Subfracciones de GCPs

Se toma una alícuota de Fracción A por reacción a realizar de manera que la concentración fuera de ~500 mg de proteína total. Los GCPs fueron incubados en hielo por 15min. Seguidamente se adiciona factor de crecimiento IGF-I en una concentración final de 20 nM durante 5 min y a 4°C en agitación constante. Posteriormente se agregó 1/2vol. de una solución de estimulación (3 uL saponina 2%; 30 ul buffer intracelular 10X [Hepes 20 mM, NaCl 5 mM, KCl 50 mM, MgCl₃ mM]; 3 ul ATP y 64 ul H₂O para 100ul) y se deja reaccionar a diferentes tiempos a 37°C. Para tales experimentos fue realizado un control que no fue estimulado con IGF1. Los GCPs estimulados y no estimulados fueron incubados con 1 vol. de buffer de lisis (Ice Cold Lysis Buffer) con inhibidores de proteasas y 1mM de ATP a temperatura ambiente por 15 minutos. Dicho buffer esté formulado para promover una lisis suave, a modo que se mantengan las interacciones entre proteínas.

La mezcla obtenida es sembrada en un colchón de sucrosa 1M y centrifugada a 100.000g en un rotor *swinging bucket*. Luego de la centrifugación se obtiene un sobrenadante, una interfase y un precipitado. El sobrenadante y la interfase se concentran hasta la mitad de su volumen inicial en Speed Vac y el precipitado se disuelve en buffer de lisis. Paso seguido el sobrenadante, la interfase y el precipitado son suspendidos en *Sample Buffer* 5X. Se calientan a 90-95 °C por 5 minutos e inéditamente almacenados a -20 °C para su posterior análisis mediante *Western Blot*.

Electroforesis y Western Blot

Las células destinadas a separación electroforética de proteínas fueron cosechadas en Buffer RIPA modificado (Na₂HPO₄ 10 mM; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; NP-40 1% v/v; Deoxicolato de Na 1% v/v; SDS 0,1% v/v; NaF 10 mM) suplementado con cóctel de inhibidores de proteasas 1X. Los lisados fueron centrifugados a 13200 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C y se tomó el sobrenadante que contiene las proteínas solubilizadas. En dicho sobrenadante, se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford y se ajustó a volumen final la concentración adecuada con Buffer de siembra Laemmli.

Para la electroforesis, 50 µg de proteínas fueron sembrados en geles de poliacrilamida al 12% con SDS. La corrida se llevó a cabo a voltaje constante de 150 V. Luego, las proteínas separadas en el gel fueron electrotransferidas a membranas de Nitrocelulosa a 300 mA durante 65 minutos. Luego de 3 lavados de 10 minutos con buffer fosfato (PBS) 10 mM, las membranas fueron bloqueadas con PBS 10 mM y leche descremada al 5% p/v durante 1 hora a temperatura ambiente e incubadas durante toda la noche (ON, del inglés *overnight*) a 4°C con los anticuerpos especificados. Las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con PBS 10 mM con Tween-20 al 0,1% v/v e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios para detección IR. Finalmente, las membranas fueron lavadas nuevamente y la inmunodetección se realizó utilizando el sistema *ODYSSEY Infrared Imaging System* (LI-COR). El peso molecular de cada banda fue calculado por extrapolación a un marcador de pesos moleculares conocidos sembrado en cada del (BioRad). Las imágenes obtenidas fueron transformadas a escala de grises y luego invertidas. Todos los experimentos con Western Blot fueron realizados por triplicado.

Reactivos Biología Molecular usados

Plásmidos utilizados		
Nombre	Vector	Promotor
shSec3	pLKO.1-CMV-tGFP TRCN0000254148	CMV
shSec8	pLKO.1-CMV-tGFP TRCN0000298307	CMV
SsCtrl	pLKO.1-CMV-tGFP	CMV
DsRed	pCAGG-DsRed	CAG

Anticuerpos primarios utilizados			
Nombre	Host	Concentración	Catalogo
Sec3	policlonal de conejo	IF:1/700 WB: 1/3000	Abcam (Cat. Ab118798)
Exo70 (zz-7)	monoclonal de ratón	WB: 1/250, IF 1/100	Santa Cruz (Cat. Sc-100733)

Sec8	monoclonal de ratón	IF: 1/600, WB: 1/4000	BD Bioscience (Cat. 610658)
KINESINA 1C	policlonal de conejo	WB: 1/2000	Abcam (Cat. ab5630)
Sec5	policlonal de cabra	IF: 1/20, WB: 1/100	Santa cruz (Cat. Sc-30285)
Tau-1	monoclonal de ratón (clon PC1C6)	IF: 1/400	Millipore (Cat. MAB3420)
Tubulina Tirosinada	monoclonal de ratón	IF: 1/2000	Sigma clon TUB-1A2 (Cat. T-9028)
Tubulina βIII	policlonal de conejo	IF: 1/2000; WB: 1/4000	Sigma (Cat: T2200)
Syntaxina 6	policlonal de conejo	WB:1/600, IF:1/75; IP:1/150	Synaptic Systems (Cat. 110062)

Anticuerpos primarios utilizados			
Especificidad	Host	Fluoróforo	Catálogo
Rabbit	Chicken	488	Alexa Fluor (Cat. A-21441)
Rabbit	Goat	546	Alexa Fluor (Cat. A-11035)
Rabbit	Goat	633	Alexa Fluor (Cat. A-21070)
Mouse	Goat	488	
Mouse	Goat	568	Alexa Fluor (Cat. A-11031)
Mouse	Goat	633	Alexa Fluor (Cat. A21052)
Goat	Donkey	546	Alexa Fluor (Cat. A11056)
Biotin	Goat		Alexa Fluor
Biotin	Mouse	488	Alexa Fluor (Cat. 31801)
Rabbit Igg	Donkey	488	Abcam (Cat. Ab98488)
Mouse Igg	Donkey	550	Abcam (Cat.ab96876)
Rabbit	Chicken	488	Abcam (Cat.ab96876)
Rabbit	Goat	546	
Rabbit	-	IR Dye Licor 800	
Goat	-	IR Dye Licor 800	
Mouse	-	IR Dye Licor 800	

REFERENCIAS

1. Barnes, A.P. and F. Polleux, *Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons*. *Annu Rev Neurosci*, 2009. **32**: p. 347-81.
2. Brown, A., *Axonal transport of membranous and nonmembranous cargoes: a unified perspective*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(6): p. 817-21.
3. Levitan, I.B., K.L.K., *The Neuron: Cell and Molecular Biology*. 2015: Oxford Press.
4. Craig, A.M. and G. Banker, *Neuronal polarity*. *Annu Rev Neurosci*, 1994. **17**: p. 267-310.
5. Cammarata, G.M., E.A. Bearce, and L.A. Lowery, *Cytoskeletal social networking in the growth cone: How +TIPs mediate microtubule-actin cross-linking to drive axon outgrowth and guidance*. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2016. **73**(9): p. 461-76.
6. Winkle, C.C. and S.L. Gupton, *Membrane Trafficking in Neuronal Development: Ins and Outs of Neural Connectivity*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016. **322**: p. 247-80.
7. Takano, T., et al., *Neuronal polarization*. *Development*, 2015. **142**(12): p. 2088-93.
8. Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker, *The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture*. *J Neurosci*, 1988. **8**(4): p. 1454-68.
9. Yogev, S. and K. Shen, *Establishing Neuronal Polarity with Environmental and Intrinsic Mechanisms*. *Neuron*, 2017. **96**(3): p. 638-650.
10. Radnikow, G. and D. Feldmeyer, *Layer- and Cell Type-Specific Modulation of Excitatory Neuronal Activity in the Neocortex*. *Front Neuroanat*, 2018. **12**: p. 1.
11. Greig, L.C., et al., *Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity*. *Nat Rev Neurosci*, 2013. **14**(11): p. 755-69.
12. Kon, E., A. Cossard, and Y. Jossin, *Neuronal Polarity in the Embryonic Mammalian Cerebral Cortex*. *Front Cell Neurosci*, 2017. **11**: p. 163.
13. Paridaen, J.T. and W.B. Huttner, *Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system*. *EMBO Rep*, 2014. **15**(4): p. 351-64.
14. Funahashi, Y., et al., *Neuronal polarization in vivo: Growing in a complex environment*. *Curr Opin Neurobiol*, 2014. **27**: p. 215-23.
15. Polleux, F. and W. Snider, *Initiating and growing an axon*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(4): p. a001925.
16. Arimura, N. and K. Kaibuchi, *Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(3): p. 194-205.
17. Russell, S.A. and G.J. Bashaw, *Axon guidance pathways and the control of gene expression*. *Dev Dyn*, 2018. **247**(4): p. 571-580.
18. Barbacid, M., *Neurotrophic factors and their receptors*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(2): p. 148-55.
19. Quiroga, S., R.S. Garofalo, and K.H. Pfenninger, *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*, 1995. **92**(10): p. 4309-12.
20. Sosa, L., et al., *IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity*. *Nat Neurosci*, 2006. **9**(8): p. 993-5.
21. Quiroga, S., M. Bisbal, and A. Caceres, *Regulation of plasma membrane expansion during axon formation*. *Dev Neurobiol*, 2018. **78**(3): p. 170-180.
22. Laurino, L., et al., *PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 16): p. 3653-62.
23. Pfenninger, K.H., *Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task*. *Nat Rev Neurosci*, 2009. **10**(4): p. 251-61.
24. Nieto Guil, A.F., et al., *IGF-1 receptor regulates dynamic changes in neuronal polarity during cerebral cortical migration*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 7703.
25. Hapak, S.M., C.V. Rothlin, and S. Ghosh, *PAR3-PAR6-atypical PKC polarity complex proteins in neuronal polarization*. *Cell Mol Life Sci*, 2018. **75**(15): p. 2735-2761.
26. Caceres, A., B. Ye, and C.G. Dotti, *Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment*. *Curr Opin Cell Biol*, 2012. **24**(4): p. 547-53.

27. Witte, H. and F. Bradke, *The role of the cytoskeleton during neuronal polarization*. Curr Opin Neurobiol, 2008. **18**(5): p. 479-87.
28. Baas, P.W., et al., *Stability properties of neuronal microtubules*. Cytoskeleton (Hoboken), 2016. **73**(9): p. 442-60.
29. Witte, H., D. Neukirchen, and F. Bradke, *Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization*. J Cell Biol, 2008. **180**(3): p. 619-32.
30. Jacobson, C., B. Schnapp, and G.A. Banker, *A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon*. Neuron, 2006. **49**(6): p. 797-804.
31. Oksdath, M., et al., *The Motor KIF5C Links the Requirements of Stable Microtubules and IGF-1 Receptor Membrane Insertion for Neuronal Polarization*. Mol Neurobiol, 2017. **54**(8): p. 6085-6096.
32. Pfenninger, K.H. and L.B. Friedman, *Sites of plasmalemmal expansion in growth cones*. Brain Res Dev Brain Res, 1993. **71**(2): p. 181-92.
33. Lalli, G., *Regulation of neuronal polarity*. Exp Cell Res, 2014. **328**(2): p. 267-75.
34. Pfenninger, K.H., et al., *Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 7): p. 1209-17.
35. Bonifacino, J.S. and B.S. Glick, *The mechanisms of vesicle budding and fusion*. Cell, 2004. **116**(2): p. 153-66.
36. Chieregatti, E. and J. Meldolesi, *Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(2): p. 181-7.
37. Rizzoli, S.O., *Synaptic vesicle recycling: steps and principles*. EMBO J, 2014. **33**(8): p. 788-822.
38. Xu, F., et al., *KIF1Bbeta mutations detected in hereditary neuropathy impair IGF1R transport and axon growth*. J Cell Biol, 2018. **217**(10): p. 3480-3496.
39. Stenmark, H. and V.M. Olkkonen, *The Rab GTPase family*. Genome Biol, 2001. **2**(5): p. REVIEWS3007.
40. Dupraz, S., et al., *The TC10-Exo70 complex is essential for membrane expansion and axonal specification in developing neurons*. J Neurosci, 2009. **29**(42): p. 13292-301.
41. Grassi, D., et al., *Selected SNARE proteins are essential for the polarized membrane insertion of igf-1 receptor and the regulation of initial axonal outgrowth in neurons*. Cell Discov, 2015. **1**: p. 15023.
42. Novick, P., C. Field, and R. Schekman, *Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway*. Cell, 1980. **21**(1): p. 205-15.
43. Zwilling, D., et al., *Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies*. EMBO J, 2007. **26**(1): p. 9-18.
44. Whyte, J.R. and S. Munro, *Vesicle tethering complexes in membrane traffic*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 13): p. 2627-37.
45. Chia, P.Z. and P.A. Gleeson, *Membrane tethering*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 74.
46. Heider, M.R. and M. Munson, *Exorcising the exocyst complex*. Traffic, 2012. **13**(7): p. 898-907.
47. Cai, H., K. Reinisch, and S. Ferro-Novick, *Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle*. Dev Cell, 2007. **12**(5): p. 671-82.
48. Hsu, S.C., et al., *Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex*. Trends Cell Biol, 1999. **9**(4): p. 150-3.
49. Hsu, S.C., et al., *The exocyst complex in polarized exocytosis*. Int Rev Cytol, 2004. **233**: p. 243-65.
50. Chou, H.T., et al., *CATCHR, HOPS and CORVET tethering complexes share a similar architecture*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(8): p. 761-3.
51. Munson, M. and P. Novick, *The exocyst defrocked, a framework of rods revealed*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(7): p. 577-81.
52. Finger, F.P., T.E. Hughes, and P. Novick, *Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast*. Cell, 1998. **92**(4): p. 559-71.

53. Hertzog, M. and P. Chavrier, *Cell polarity during motile processes: keeping on track with the exocyst complex*. Biochem J, 2011. **433**(3): p. 403-9.
54. Liu, J. and W. Guo, *The exocyst complex in exocytosis and cell migration*. Protoplasma, 2012. **249**(3): p. 587-97.
55. Hala, M., et al., *An exocyst complex functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco*. Plant Cell, 2008. **20**(5): p. 1330-45.
56. Fendrych, M., et al., *The Arabidopsis exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation*. Plant Cell, 2010. **22**(9): p. 3053-65.
57. Guo, W., et al., *The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis*. EMBO J, 1999. **18**(4): p. 1071-80.
58. Matern, H.T., et al., *The Sec6/8 complex in mammalian cells: characterization of mammalian Sec3, subunit interactions, and expression of subunits in polarized cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9648-53.
59. Guo, W., A. Grant, and P. Novick, *Exo84p is an exocyst protein essential for secretion*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23558-64.
60. Dong, G., et al., *The structures of exocyst subunit Exo70p and the Exo84p C-terminal domains reveal a common motif*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(12): p. 1094-100.
61. Sivaram, M.V., et al., *The structure of the exocyst subunit Sec6p defines a conserved architecture with diverse roles*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(6): p. 555-6.
62. Vega, I.E. and S.C. Hsu, *The exocyst complex associates with microtubules to mediate vesicle targeting and neurite outgrowth*. J Neurosci, 2001. **21**(11): p. 3839-48.
63. Guo, W., F. Tamanoi, and P. Novick, *Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 353-60.
64. Zhang, X., et al., *Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 46745-50.
65. Moskalenko, S., et al., *The exocyst is a Ral effector complex*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. 66-72.
66. Sugihara, K., et al., *The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. 73-8.
67. Prigent, M., et al., *ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector*. J Cell Biol, 2003. **163**(5): p. 1111-21.
68. Zhang, X.M., et al., *Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 43027-34.
69. Inoue, M., et al., *The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin*. Nature, 2003. **422**(6932): p. 629-33.
70. Robinson, N.G., et al., *Rho3 of Saccharomyces cerevisiae, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3580-7.
71. Jin, R., et al., *Exo84 and Sec5 are competitive regulatory Sec6/8 effectors to the RalA GTPase*. EMBO J, 2005. **24**(12): p. 2064-74.
72. Moskalenko, S., et al., *Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunit interactions*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51743-8.
73. Guo, W., et al., *Identification and characterization of homologues of the Exocyst component Sec10p*. FEBS Lett, 1997. **404**(2-3): p. 135-9.
74. Hazuka, C.D., et al., *The sec6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains*. J Neurosci, 1999. **19**(4): p. 1324-34.
75. Martin-Urdiroz, M., et al., *The Exocyst Complex in Health and Disease*. Front Cell Dev Biol, 2016. **4**: p. 24.
76. Lalli, G., *RalA and the exocyst complex influence neuronal polarity through PAR-3 and aPKC*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 10): p. 1499-506.
77. Mei, K., P. Yue, and W. Guo, *Analysis of the Role of Sec3 in SNARE Assembly and Membrane Fusion*. Methods Mol Biol, 2019. **1860**: p. 175-189.

78. Grindstaff, K.K., et al., *Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells*. *Cell*, 1998. **93**(5): p. 731-40.
79. Moody, S.A., M.S. Quigg, and A. Frankfurter, *Development of the peripheral trigeminal system in the chick revealed by an isotype-specific anti-beta-tubulin monoclonal antibody*. *J Comp Neurol*, 1989. **279**(4): p. 567-80.
80. Dotti, C.G., G.A. Banker, and L.I. Binder, *The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture*. *Neuroscience*, 1987. **23**(1): p. 121-30.
81. Bolte, S. and F.P. Cordelieres, *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*. *J Microsc*, 2006. **224**(Pt 3): p. 213-32.
82. Pfenninger, K.H., et al., *Nerve growth cones isolated from fetal rat brain: subcellular fractionation and characterization*. *Cell*, 1983. **35**(2 Pt 1): p. 573-84.
83. Ellis, L., et al., *Nerve growth cones isolated from fetal rat brain. IV. Preparation of a membrane subfraction and identification of a membrane glycoprotein expressed on sprouting neurons*. *J Cell Biol*, 1985. **101**(5 Pt 1): p. 1977-89.
84. Barden, J.A., et al., *Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin*. *Eur J Biochem*, 1987. **162**(3): p. 583-8.
85. Dunn, K.W., M.M. Kamocka, and J.H. McDonald, *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011. **300**(4): p. C723-42.
86. Louche, A., S.P. Salcedo, and S. Bigot, *Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1615**: p. 247-255.
87. Ngo-Muller, V. and K. Muneoka, *Exo utero surgery*. *Methods Mol Biol*, 2000. **135**: p. 481-92.
88. Saito, T., *In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(3): p. 1552-8.
89. Saito, T. and N. Nakatsuji, *Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation*. *Dev Biol*, 2001. **240**(1): p. 237-46.
90. Liu, Y., et al., *Transcriptional activity assessment of three different promoters for mouse in utero electroporation system*. *Plasmid*, 2014. **74**: p. 52-8.
91. Tabata, H. and K. Nakajima, *Labeling embryonic mouse central nervous system cells by in utero electroporation*. *Dev Growth Differ*, 2008. **50**(6): p. 507-11.
92. Bai, J., et al., *RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(12): p. 1277-83.
93. Frotscher, M., et al., *Reelin Signaling Inactivates Cofilin to Stabilize the Cytoskeleton of Migrating Cortical Neurons*. *Front Cell Neurosci*, 2017. **11**: p. 148.
94. Nakata, T. and N. Hirokawa, *Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head*. *J Cell Biol*, 2003. **162**(6): p. 1045-55.
95. Ramakrishnan, N.A., M.J. Drescher, and D.G. Drescher, *The SNARE complex in neuronal and sensory cells*. *Mol Cell Neurosci*, 2012. **50**(1): p. 58-69.
96. Luo, G., J. Zhang, and W. Guo, *The role of Sec3p in secretory vesicle targeting and exocyst complex assembly*. *Mol Biol Cell*, 2014. **25**(23): p. 3813-22.
97. Pleskot, R., et al., *Membrane targeting of the yeast exocyst complex*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1848**(7): p. 1481-9.
98. Picco, A., et al., *The In Vivo Architecture of the Exocyst Provides Structural Basis for Exocytosis*. *Cell*, 2017. **168**(3): p. 400-412 e18.
99. Rolls, M.M. and T.J. Jegla, *Neuronal polarity: an evolutionary perspective*. *J Exp Biol*, 2015. **218**(Pt 4): p. 572-80.
100. Schelski, M. and F. Bradke, *Neuronal polarization: From spatiotemporal signaling to cytoskeletal dynamics*. *Mol Cell Neurosci*, 2017. **84**: p. 11-28.
101. Poulter, N.S., et al., *The physical basis of total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy and its cellular applications*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1251**: p. 1-23.

102. Fish, K.N., *Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy*. Curr Protoc Cytom, 2009. **Chapter 12**: p. Unit12 18.