

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.



Universidad Nacional de Córdoba



Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC)
(UNC-CONICET)
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Químicas

Tesis Doctoral en Ciencias Químicas

Estudios sobre la regulación de la exocitosis de distintas subpoblaciones de vesículas precursoras de membrana (PPVs) en neuronas en desarrollo

Diego Javier Grassi


IDENTIFICACION DE CUESTIONES QUINCUENARIAS

Signatura R-T
 Page No. 612.8
 No. Inventario 12428
 Autor autor
 Año
 Localidad
 Situación
 Fecha de Ingreso. 7/7/2014

103/08/20

--	--	--	--

Director de Tesis:


Dr. Santiago Quiroga

Comisión de Tesis:


Dr. Alfredo Lorenzo


Dra. Irene Martijena


Dr. José Luis Daniotti


Dr. Luis Mayorga

Agradecimientos

A Natalia, por estar incondicionalmente a mi lado a lo largo de esta etapa que culmina, por su amor y amistad, por creer en mí. Gracias por ser mi faro en la tormenta.

A mi familia, por todos estos años de constante apoyo, paciencia y cariño.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Mariana y Álvaro por brindarme su ayuda siempre que fue necesario y por sus consejos en los momentos más complicados.

Al Dr. Santiago Quiroga, por abrirme las puertas de su laboratorio y por su colaboración.

Prefacio

"Creí ver las hojas del árbol caer.

Pero no, eran mariposas"

Haiku (anónimo)

"Noche sin luna, pero no está sola.

Las luciérnagas la acompañan"

Haiku (Natalia Diaz)

Índice

Índice	1
Resumen	5
Introducción.....	7
• La neurona: características y polaridad	8
• Estudios de polarización y diferenciación neuronal: el cultivo primario de neuronas de hipocampo	9
• Estadio 1	9
• Estadio 2	9
• Estadio 3	10
• Estadio 4	10
• Estadio 5	10
• Rol del citoesqueleto y del tráfico de membrana en la polarización neuronal	12
• Exocitosis: definición y clasificación	13
• Exocitosis constitutiva	13
• Exocitosis regulada	13
▲ <i>Con fines secretorios</i>	13
▲ <i>Con fines no secretorios</i>	13
➤ Exocitosis para exposición de proteínas	13
➤ Exocitosis expansiva	14
• Vesículas precursoras de plasmalema (PPVs): descripción. Relación entre exocitosis regulada, agregación de membrana y adquisición de polaridad	14
• Tráfico y exocitosis de PPVs	15
• Formación y cargado de vesículas	15

▪ Transporte.....	16
▪ Acercamiento (“tethering”) y anclaje (“docking”)	17
▪ Cebado (“priming”) o perfusión	17
▪ Fusión.....	17
• SNAREs: maquinaria para la fusión de membranas	18
▪ Definición, características y clasificación	18
▪ Ensamblaje y disociación de los complejos SNAREs	20
▪ Localización intracelular y especificidad de las SNAREs.....	21
▪ SNAREs implicadas en el crecimiento neurítico	22
Objetivos.....	26
Resultados	28
Primera parte	
• Determinación de la expresión y localización subcelular de las proteínas SNAREs analizadas en neuronas piramidales de hipocampo en cultivo	30
• Efecto de la pérdida de función de VAMP4, VAMP7, Syntaxin6 y SNAP23 en el desarrollo de neuronas en cultivo.....	34
Segunda parte	
• Efecto de la activación del receptor de IGF-1 en la asociación de VAMP4, VAMP7, Syntaxin6 y SNAP23 con estructuras vesiculares en el cono de crecimiento	43
• Descripción de subpoblaciones de PPVs VAMP4 o VAMP7-positivas en el cono de crecimiento axonal de neuronas piramidales de hipocampo en cultivo.....	50
Discusión.....	54
• Patrón de expresión temporal y localización subcelular de diferentes SNAREs en neuronas de hipocampo en cultivo	55
• Las proteínas VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 participan en el crecimiento axonal inicial en neuronas piramidales de hipocampo en cultivo.....	59

• Las SNAREs VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 participan en la agregación de membrana en los conos de crecimiento neuronales disparada por la activación del receptor de IGF-1.....	62
• VAMP4 y VAMP7 definen 2 subpoblaciones de PPVs diferentes.....	66
Conclusiones.....	70
Materiales y Métodos.....	72
• Cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata.....	73
• Inmunofluorescencia.....	74
• Anticuerpos primarios.....	74
• Anticuerpos secundarios.....	75
• Transfección.....	76
▪ Transfección convencional.....	76
▪ Transfección en suspensión.....	77
• Biología Molecular: preparación de construcciones.....	77
▪ Construcción de los vectores para expresión de shRNAs.....	77
▪ Obtención y subclonado de construcciones utilizadas para experimentos de recuperación de fenotipo.....	78
• Preparación de GCPs.....	79
• Ensayos de estimulación de GCPs con IGF-1.....	80
• Inmunoprecipitación de estructuras membranosas derivadas de conos de crecimiento axonales.....	80
• Electroforesis y Western blot.....	81
Bibliografía.....	83
Abreviaturas.....	100

Resumen

Resumen

En neuronas se conocen dos clases diferentes de exocitosis regulada: la bien estudiada exocitosis secretoria (para liberación de neurotransmisores) y la exocitosis con fines no secretorios (para expansión de membrana plasmática). Ésta última es esencial para el crecimiento neurítico y es llevado a cabo por la exocitosis de estructuras membranosas específicas llamadas vesículas precursoras de plasmalema (PPVs). Hasta el momento, los mecanismos que median el direccionamiento de las PPVs a axones en desarrollo y la fusión con la membrana plasmática del mismo son escasamente entendidos. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que TC10 y Exo70 (dos componentes del complejo exocisto) son necesarios para el acercamiento (tethering) de las PPVs y la adición de nueva membrana, permitiendo el crecimiento axonal estimulado por el factor trófico IGF-1. Sin embargo, las proteínas SNAREs involucradas en el paso de fusión de las PPVs permanecen, hasta ahora, sin ser identificadas.

El presente trabajo de tesis intenta dilucidar cuales son las proteínas SNAREs involucradas en los eventos de crecimiento axonal inicial. Los resultados obtenidos indican que, en cultivo de neuronas piramidales de hipocampo, VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 se expresan tempranamente, adoptan una distribución polarizada en el axón en desarrollo, interaccionan con el receptor de IGF-1 ante estímulo con su ligando y serían necesarias para el establecimiento de polaridad neuronal. En cambio, otras SNAREs requeridas para la elongación axonal en estadios posteriores de diferenciación neuronal (VAMP7, Syntaxin1 y SNAP25) parecerían no ser esenciales en la regulación del crecimiento inicial del axón.

Introducción

Introducción

La neurona: características y polaridad

La manera en que percibimos e interaccionamos con nuestro entorno, las emociones, pensamientos, comportamientos y todo el repertorio de acciones cognitivas complejas dependen de una sofisticada red de receptores sensoriales conectados a un sistema neural altamente flexible: el cerebro. El continuo flujo de información desde estos receptores es organizado por el cerebro en percepciones (alguna de las cuales son almacenadas en la memoria para referencias futuras) y luego en respuestas conductuales apropiadas. Todas estas tareas son llevadas a cabo haciendo uso de las neuronas (las unidades básicas del sistema nervioso) y de las conexiones existentes entre ellas.

El cerebro humano contiene un número extraordinario de dichas células (en el orden de 10^{11} neuronas) y aunque ellas pueden clasificarse en muchos tipos diferentes, todas comparten la misma arquitectura básica. Poseen un cuerpo celular (o soma) desde el cual emergen prolongaciones o procesos (dendritas y axones) los cuales le otorgan a la neurona la regionalización de sus funciones, su polaridad y la capacidad para conectarse a otras neuronas, a células sensoriales o a células efectoras.

Es así que las neuronas presentan dominios diferentes: el somato-dendrítico (cuerpo y dendritas) y el axonal. Estos dominios son diferentes tanto a nivel morfológico, bioquímico como funcional. Típicamente las neuronas tienen varias dendritas que reciben e integran impulsos provenientes desde neuronas presinápticas, lo cual dispara la generación de potenciales de acción a nivel del soma celular. Los potenciales de acción son entonces propagados a lo largo del axón, el cual emite la información hacia las neuronas post-sinápticas (Hammond, 2001).

Los axones y las dendritas difieren en composición de proteínas y organelas. Los axones son largos y finos, con un grosor uniforme y de ellos generalmente emergen ramificaciones colaterales. Las dendritas, en cambio, son relativamente cortas; son gruesas en las cercanías del cuerpo celular y se vuelven más delgadas a medida que se alejan del soma, donde sufren ramificaciones en forma de Y. Los axones contienen vesículas sinápticas mediante las cuales liberan neurotransmisores en los terminales axonales en respuesta a señales eléctricas provenientes desde el cuerpo celular. Las dendritas poseen por su parte receptores para dichos neurotransmisores, así como

también sistemas de integración de señales. Estas 2 estructuras celulares tan disimiles son fundamentales para el funcionamiento neuronal, ya que esto capacita a las neuronas para recibir y transmitir señales eléctricas, conduciendo el impulso nervioso de un modo vectorial.

El proceso de diferenciación que lleva a un neuroblasto (una célula simétrica y sin división de dominios) a convertirse en una neurona adulta (altamente polarizada) es uno de los procesos más complejos conocidos y ha sido motivo de estudio durante las últimas décadas y hasta el presente.

Estudios de polarización y diferenciación neuronal: el cultivo primario de neuronas de hipocampo

Uno de los hallazgos clave que ha permitido estudiar el proceso de diferenciación es el hecho de que las neuronas poseen la capacidad de polarizar formando un axón y múltiples dendritas (y eventualmente establecer contactos sinápticos) en condiciones *ex vivo* (mencionadas también como *in vitro*). Valiéndose de esta propiedad se desarrolló un método para cultivar neuronas de hipocampo a partir de cerebros de embriones de ratas. Esta aproximación se convirtió en el modelo predominante para estudiar el crecimiento inicial y desarrollo axonal (Dotti y col, 1988).

Basándose en los cambios morfológicos de células en cultivo y la identificación inmunocitoquímica de proteínas marcadoras de dominios celulares específicos (MAP2 y Tau), entre otras se identificaron 5 estadios, a saber (Figuras 1A y 1B):

Estadio 1: Poco tiempo después del plaqueo, las neuronas inmaduras (aún redondeadas) comienzan a adherirse al sustrato y desarrollan un fino velo lamelipodial y unos pocos filopodios, estructuras ricas en filamentos de actina y proteínas asociadas (α -actinina, filamina, vinculina, etc).

Estadio 2: La intensa actividad protrusiva de los lamelipodios da lugar al desarrollo de varios procesos menores o neuritas, prolongaciones que se proyectan desde el soma celular. Éstas son morfológicamente iguales y se encuentran en constante extensión y contracción, de modo que no experimentan elongación neta durante este período. Si bien todas las neuritas poseen capacidad inicial para generar un axón, solo uno de estos

procesos se convertirá posteriormente en un axón funcional.

Estadio 3: La polarización neuronal es un paso temprano en la diferenciación de una neurona y generalmente es alcanzado cuando una de las neuritas se elonga rápidamente sin retracción, rompiendo así la simetría celular inicial. Se da entre las 18 a 24 horas posteriores al plaqueo. En el extremo distal de este proceso se hace evidente una estructura altamente dinámica denominada cono de crecimiento, la cual es responsable del crecimiento direccionado del axón en desarrollo y del guiado a través del espacio extracelular en respuesta a diferentes señales y estímulos (factores de crecimiento, moléculas señal presentes en el sustrato, interacciones célula-matriz, etc).

Después de 1 día en cultivo la mayoría de las células son asimétricas: ellas tienen un proceso mayor claramente distinguible y varios procesos menores. La longitud promedio del primero es de 80-100 μm , mientras que la de los segundos es de 10-20 μm . El tiempo de aparición de esta morfología varía significativamente según el tipo neuronal, e inclusive dentro de un mismo cultivo.

Se considera que una neurita se ha transformado en un axón cuando la longitud del mismo supera en, al menos, 20 μm la longitud promedio de los demás procesos menores. Otro criterio es la expresión de marcadores moleculares tales como la proteína Tau1 (Mandell y col., 1996) o GAP43 (Goslin y col., 1988).

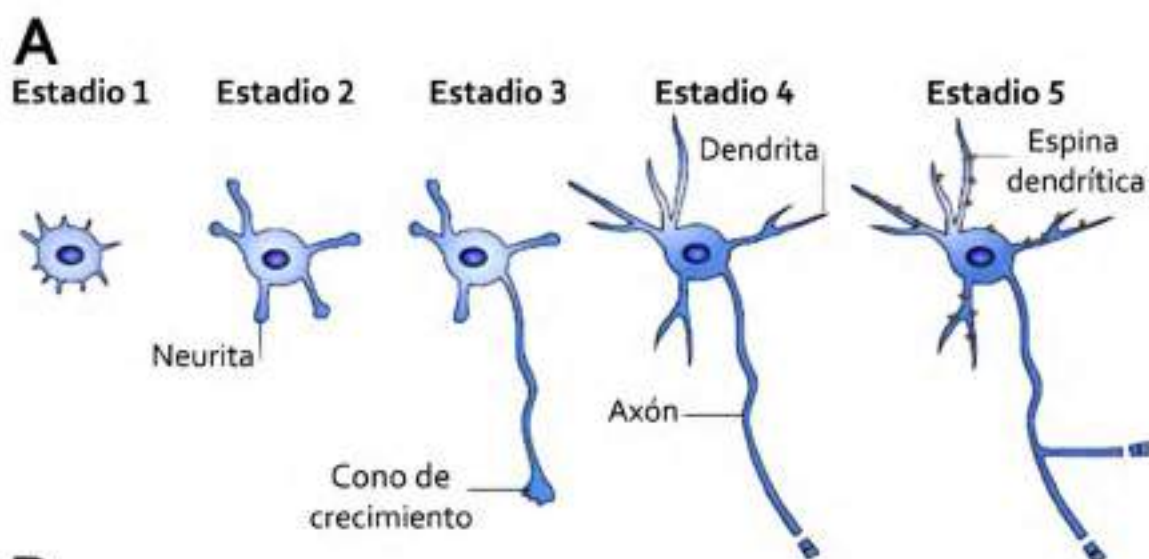
Estadio 4: Una vez determinado el futuro axón, las neuritas restantes continúan sufriendo breves episodios de crecimiento y retracción, manteniendo de esta forma su longitud neta. Unos pocos días después ellas comienzan a elongarse y a adquirir las características de las dendritas, su grosor aumenta y aparecen las ramificaciones en forma de Y. Una de los marcadores específicos que determinan la identidad de una dendrita es la expresión de la proteína MAP2 (Cáceres y col, 1984).

Por su parte el axón continúa elongándose relativamente rápido y aparecen las ramificaciones colaterales.

Estadio 5: El axón alcanza una longitud de más de 400 μm al día 7 de cultivo y presenta múltiples ramificaciones. Por otro lado las dendritas (con una longitud mayor a 50-75 μm) se engosan y acortan, aumentan su arborización y comienzan a formar espinas dendríticas prematuras.

Cuando el axón y las dendritas han madurado las neuronas forman contactos sinápticos

a través de las espinas dendríticas y los terminales axonales, estableciéndose así una red neuronal que permite la transmisión de impulsos eléctricos.



B

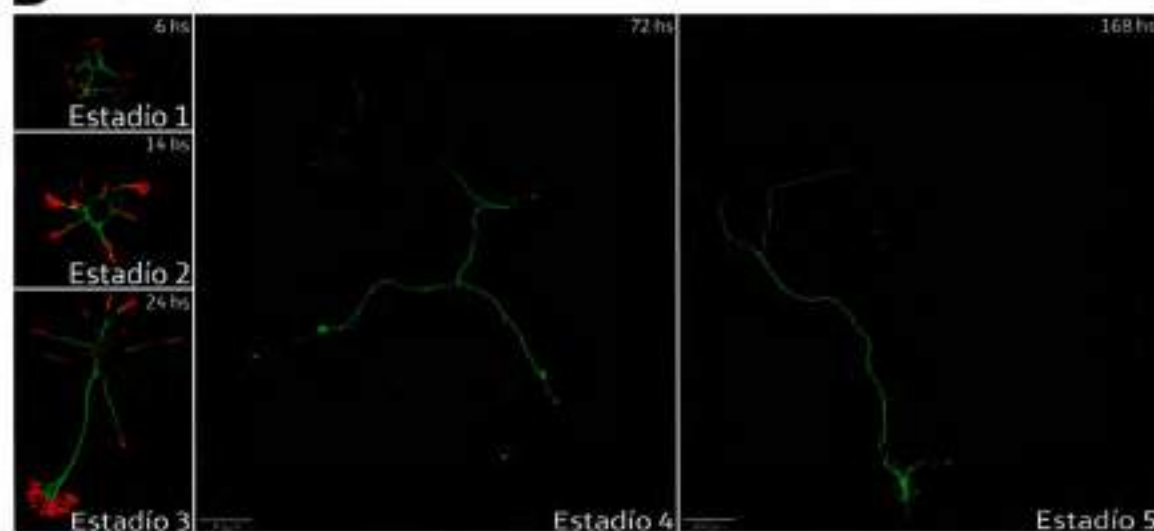


Figura 1A. Representación esquemática de los estadios de diferenciación neuronal observados en neuronas piramidales de hipocampo en cultivo (modificado de Arimura y Kaibuchi, 2007).

Figura 1B. Micrografías de estadios de diferenciación en neuronas piramidales de hipocampo en cultivo. En las figuras correspondientes a los estadios 1 al 3 se observa la inmunotinción con β III tubulina (verde) y actina (rojo), mientras que en célula correspondiente al estadio 4 solo se muestra la tinción con β III tubulina (verde). En el caso de la neurona en estadio 5 la marca corresponde a la expresión de la proteína de fusión Sinapsinal-GFP.

Rol del citoesqueleto y del tráfico de membrana en la polarización neuronal

Por lo expuesto anteriormente resulta evidente que el crecimiento neurítico es un proceso fundamental en la diferenciación de las neuronas y el establecimiento de polaridad neuronal. Éste es posible gracias a la acción coordinada de 2 mecanismos (Tsaneva-Atanasova y col., 2009):

1 – La reorganización del citoesqueleto: el ensamblaje y estabilización de microtúbulos en el tallo de la neurita así como la acumulación de filamentos de actina en filopodios y lamelipodios y presencia de microtúbulos dinámicos dentro de la región central del cono de crecimiento en expansión son procesos esenciales para la formación axonal (Mitchison y Kirschner, 1988; Bradke y Dotti, 1997 y 1999; Paglini y col., 1998; Dent y Gertler, 2003; Ledesma y Dotti, 2003; Bouquet y Nothias, 2007).

2 – La agregación de nueva membrana mediante exocitosis: este fenómeno implica la participación de estructuras vesiculares derivadas del TGN (Trans Golgi Network) que son transportadas y fusionadas a la membrana plasmática del cono de crecimiento, lo que permite su expansión y, en consecuencia, el crecimiento axonal (Bray, 1970; Pfenninger y Friedman, 1993; Craig y col, 1995; Pfenninger y col, 2003; Laurino y col, 2005). Éstas son denominadas **Vesículas Precursoras de Plasmalema (PPVs)** y su papel en el tráfico de membrana será abordado con detalle en breve.

El rol del citoesqueleto en la adquisición de polaridad en neuronas en desarrollo ha sido motivo de intensivo estudio (Da Silva y Dotti, 2002; Georges y col., 2008). En contraste, el papel del tráfico de membrana y la exocitosis durante la morfogénesis neuronal ha recibido poca atención. Esto es paradójico ya que resulta evidente que la agregación de membrana es lo que en última instancia le permite a la neurona crecer. De hecho, el incremento en volumen y área celular tiene lugar en muchos tipos celulares durante la diferenciación, pero en ninguna otra célula este proceso es tan extensivo y elaborado como en las neuronas. Una de las razones de este desinterés fue la idea ampliamente aceptada de que la adición de vesículas conteniendo nuevos componentes estructurales a la membrana plasmática de neuritas y axones era un fenómeno constitutivo (De Camilli, 1992; Tang, 2002). Como se verá más adelante esta noción cambió radicalmente, a tal punto que se le ha otorgado al tráfico de membrana un rol central en el establecimiento de la polaridad neuronal.

Exocitosis: definición y clasificación

La exocitosis es un proceso mediante el cual compartimientos membranosos intracelulares (vesículas en tráfico) pueden entregar material de membrana o su contenido a la membrana plasmática o al espacio extracelular. Dicho proceso involucra la fusión de vesículas intracelulares con el plasmalema (Jahn y col., 2003; Jahn, 2004). Clásicamente la exocitosis ha sido dividida en 2 tipos (Palade, 1975; Gerber y Südhof, 2002):

1 - **Exocitosis constitutiva**: las vesículas se fusionan continuamente con el plasmalema y liberan su contenido al espacio extracelular. No están sujetas a ningún tipo de regulación o control en cuanto al evento de fusión se refiere (producción de componentes de la matriz extracelular, por ejemplo). Sin embargo, la tasa de exocitosis como así también los sitios de inserción en membrana plasmática están estrictamente controlados.

2 - **Exocitosis regulada**: las vesículas se mantienen arrestadas en pasos previos a la fusión y se fusionan con la membrana plasmática solo en respuesta a estímulos adecuados (generalmente influjos de Ca^{+2}). De esta manera los productos de secreción pueden ser acumulados establemente en sitios de almacenamiento.

Como se comentó recientemente esta forma de exocitosis fue hasta hace poco tiempo considerada necesaria solamente para la descarga de productos de secreción (**exocitosis con fines secretorios**), específicamente neurotransmisores y péptidos en el cerebro.

Sin embargo, un volumen de evidencia creciente demuestra que existen otros mecanismos de **exocitosis regulada con fines no secretorios** (Lockerbie y col, 1991; Osen-Sand y col., 1996; Leoni y col., 1999; Coco y col, 1999; Schoch y col., 2001; Pfenninger y col, 2003; Laurino y col, 2005). Estos han sido descubiertos en los últimos años y se clasifican principalmente en 2 grupos (Chierregatti y Meldolesi, 2005; Cocucci y col, 2006):

I - **Exocitosis para exposición de proteínas**: aquella centrada en la transferencia y exposición de proteínas específicas en la superficie celular. Ejemplos de ello son la inserción del receptor AMPA glutamatérgico en membranas post-sinápticas en sinapsis en desarrollo (Manilow y Malenka, 2002) o de canales de sodio en conos de crecimiento de neuronas en desarrollo (Wood y col, 1992).

II - Exocitosis expansiva: necesaria para el crecimiento y elongación de las fibras nerviosas. Dentro de esta última se pueden diferenciar además fenómenos de exocitosis rápida que inducen una considerable expansión de la superficie celular en cortos periodos de tiempo ($\sim 500 \mu\text{m}^2/\text{hora}$) y que serían predominantes durante el crecimiento axonal inicial y fenómenos de exocitosis más lenta, necesarios para la elongación neurítica posterior (Rachetti y col 2010; D'Alessandro y col, 2010).

Es así que en las neuronas, la exocitosis regulada parece gobernar al menos 2 tipos de procesos. Por un lado, los neurotransmisores y ciertos péptidos son liberados por exocitosis secretoria. Por otro lado, la exocitosis no secretoria tiene lugar en los mismos tipos celulares pero con propósitos diferentes: a) controlar la expresión de receptores de superficie celular y b) expandir el área de superficie celular donde y cuando sea necesario.

Este último fenómeno es dirigido por un grupo de vesículas diferentes de aquellas encargada de la liberación de neurotransmisores, las denominadas vesículas precursoras de plasmalema (Pfenninger y Friedman, 1993; Pfenninger, 2009; Meldolesi, 2011).

Vesículas precursoras de plasmalema (PPVs): descripción. Relación entre exocitosis regulada, agregación de membrana y adquisición de polaridad

Bajo la denominación PPVs se agrupa a todo tipo de estructuras vesiculares derivadas principalmente del TGN que permitan la expansión de la membrana plasmática en neuronas en desarrollo. Éstas se caracterizan por ser vesículas pleiomórficas de ~ 150 nm de diámetro que se agrupan en las cercanías de la membrana plasmática del cono de crecimiento, a 50-200 nm de distancia. Las PPVs han sido observadas en axones y dendritas en crecimiento, así como también en axones en regeneración (Pfenninger, 2009). Una característica fundamental de dichas vesículas es que son capaces de sufrir exocitosis regulada frente a diferentes estímulos (Lockerbie y col, 1991; Pfenninger y col, 2003; Laurino y col, 2005).

Al respecto, trabajos de nuestro laboratorio permitieron por primera vez asociar la exocitosis de PPVs a una señal específica: en cultivos de neuronas piramidales de hipocampo la expansión de plasmalema por exocitosis de PPVs es regulada localmente gracias a la acción de IGF-1 (factor de crecimiento similar a insulina 1, Insulin-like Growth Factor 1) quien a través de su receptor IGF-1R es capaz de activar la vía de

señalización IRS/PI3K/Akt (Pfenninger y col, 2003; Laurino y col, 2005).

Otro hallazgo trascendental fue el hecho de que IGF-1 es el factor de crecimiento que gatilla la especificación axonal en neuronas de hipocampo en cultivo. El establecimiento de polaridad es alcanzado mediante la activación de la vía IGF-1R/PI3K/Cdc42 (Sosa y col, 2006). Estos descubrimientos fueron los pilares que sustentaron un concepto novedoso, el cual sigue vigente en la actualidad: la agregación de membrana en el cono de crecimiento es regulada por factores tróficos.

Dado que el desarrollo axonal tiene lugar gracias a la agregación de cantidades colosales de membrana la célula cuenta con mecanismos que aseguran un suministro continuo de proteínas y membrana hacia los lugares de inserción en el cono de crecimiento.

Tráfico y exocitosis de PPVs

Una propiedad intrínseca de las vesículas exocíticas es la secuencia de pasos comprendidos desde su formación en una organela intracelular específica hasta su fusión con la membrana plasmática, como así también la maquinaria molecular involucrada en cada uno de ellos (Gerber y Südhof, 2002). Los eventos implicados en tráfico y exocitosis de PPVs se enumeran a continuación, haciendo énfasis en la evidencia disponible para este grupo vesicular:

1 – **Formación y cargado de vesículas:** la clasificación (“sorting”) y reclutamiento de proteínas cargo destinadas a dejar un compartimento en vesículas de transporte es mediado por interacciones con factores citosólicos que forman una cubierta en la cara citoplasmática de dicha vesícula. Ésto deriva en la generación de una vesícula por deformación directa de la membrana del TGN o por reclutamiento de proteínas especializadas de fisión. Aunque la identidad de las proteínas de cubierta y accesorias para el transporte desde el complejo de Golgi a membrana plasmática no es aún conocida, un gran número de componentes involucrados en la regulación de la fisión de estas vesículas de transporte desde el TGN han sido identificados (Bard y Malhorta, 2006). Por ejemplo, la proteína LIMK1 en el complejo de Golgi regula la actividad del factor depolimerizante de actina (ADF) y de cofilina, 2 proteínas implicadas en la inestabilidad del citoesqueleto de actina. Se ha sugerido que LIMK1 y cofilina son parte de la maquinaria que regula los eventos de escisión de vesículas emergiendo del TGN

(Rosso y col, 2004). Por otro lado Rab10, un miembro de la familia de las Rab GTPasas presente en el complejo de Golgi, interactúa con el motor basado en actina Myosin5B para promover la escisión de PPVs en el TGN (Liu y col, 2013). Otro caso es el de Cdk5 y su activador específico, la kinasa p35, las cuales en el complejo de Golgi regularían la formación de vesículas (Paglini y col, 2001; Morfini y col., 2004). Cdk5-p35 también regula el tráfico de membranas post-Golgi controlando el transporte de PPVs mediado por kinesinas (Morfini y col., 2004; Ratner y col., 1998). De este modo, la actividad de Cdk5-p35 durante el transporte vesicular a lo largo del tallo axonal prevendría la liberación prematura de estas estructuras antes de alcanzar el cono de crecimiento.

2 – **Transporte:** una vez cargadas y formadas, las vesículas derivadas del TGN son transportadas de manera anterógrada por proteínas motoras de la familia de las kinesinas. Éstas interactúan con microtúbulos y proveen la fuerza motriz necesaria para el movimiento desde el soma celular y hacia el extremo axonal.

Diferentes tipos de PPVs han sido descritas en base al tipo de motor molecular que las transporta y a sus proteínas cargo. Por ejemplo, las PPVs conteniendo a la variante de la subunidad β del receptor de IGF-1 conocida como β gc (Quiroga y col, 1995; Mascotti y col, 1997) son transportadas hacia el cono de crecimiento axonal por el motor KIF2 (Morfini et al., 1997; Pfenninger et al., 2003). Otras proteínas de membrana como GAP43, APP y Sinapsina1 son exportadas desde el TGN hacia el cono de crecimiento en PPVs que se mueven por acción de KIF5 (Ferreira y col, 1992; Ferreira y col, 1993; Kamal y col, 2000; Morfini y col, 1997), mientras que las PPVs que transportan L1-CAM o Fodrina han sido vinculadas a los motores KIF4 (Peretti y col, 2000) y KIF3 (Takeda y col, 2000), respectivamente. De esta manera, componentes esenciales para el crecimiento de las neuritas son trasladados hacia el cono de crecimiento donde las PPVs posteriormente serán insertadas en la superficie celular.

Luego de este transporte a larga distancia mediado por microtúbulos algunas vesículas sufren movimientos locales sobre el citoesqueleto de actina del cono de crecimiento, impulsado por proteínas motoras de la familia de las miosinas (Hammer y Wu, 2002; Akhmanova y Hammer, 2010; Hammer y Wagner, 2013).

Se sabe que proteínas de la familia de las GTPasas Rab estarían involucradas en la modulación del transporte de PPVs. Por ejemplo, el transporte anterógrado rápido de PPVs conteniendo Sinaptofisina y la posterior fusión a membrana plasmática es

dependiente de Rab33a (Nakazawa y col, 2012).

3 – **Acercamiento (“tethering”) y anclaje (“docking”)**: una vez que las vesículas derivadas del TGN alcanzan sus sitios blanco se ponen en contacto con factores de acercamiento (tethering) que restringen sus movimientos y las concentran en un lugar específico. El acercamiento inicial de las vesículas con su membrana blanco involucra interacciones laxas sobre distancias cercanas a los 25-30 nm. El anclaje se refiere a interacciones más estrechas, en el orden de 5-10 nm. El encargado de dirigir y mediar el acercamiento y direccionamiento de las vesículas hacia sus sitios de inserción es un complejo multiproteico conocido como complejo exocisto. Éste está compuesto por los productos de los genes *sec 3, 5, 6, 8, 10, 15*, los cuales junto con las proteínas Exo70 y Exo84 forman el complejo multimérico mencionado (Hsu y col, 1996; Hazuka y col, 1999; Vega y Hsu, 2001; Whyte y Munro, 2002; Murty y col, 2003). Se ha visto que el reclutamiento a membrana y ensamblaje del complejo exocisto es regulado por la acción de TC10, una Rho GTPasa, la cual activa a su efector Exo70 para llevar a cabo esa función (Dupraz y col, 2009; Fujita y col, 2013). Esto permite, la posterior fusión de diferentes PPVs conteniendo la molécula de adhesión L1-CAM, la GTPasa Rab11 y, probablemente, IGF-1R.

Se ha demostrado también que las proteínas Rab son factores clave en el acercamiento de membranas. Por ejemplo, Rab10 estaría implicada en la clasificación, anclaje y fusión vesicular al interactuar con Lgl1 (Lethal giant larvae 1), un componente del complejo de polaridad apical Lgl (Wang y col, 2011).

Otras proteínas implicadas en el anclaje y probablemente el cebado y la fusión de vesículas son las Synaptotagmins, las cuales son sensores de Ca^{+2} que median fenómenos de exocitosis regulada (Kabayama y col, 1999; Fukuda y Mikoshiba, 2000).

4 – **Cebado (“priming”) o prefusión**: cuando las vesículas son inicialmente ancladas ellas no son competentes para sufrir fusión en respuesta a estímulos específicos. El cebado (priming) o paso de prefusión involucra la acción de las proteínas SM (Sec1/Munc18-like) las cuales promoverían la formación de complejos de fusión (SNAREs) parcialmente ensamblados (Steiner y col, 2002; Broeke y col, 2010; Jahn y Fasshauer, 2012).

5 – **Fusión**: en este paso se genera continuidad entre las bicapas lipídicas de la vesícula

y la membrana plasmática. Las proteínas SNAREs son las encargadas de mediar y controlar este evento. Otras proteínas como NSF y sus cofactores SNAPs son requeridos para que las proteínas SNARE se disocien y queden libres para participar nuevamente en eventos de fusión. Debido al papel central de las proteínas SNAREs en este estudio, a continuación se las describirá en detalle.

SNAREs: maquinaria para la fusión de membranas

Definición, características y clasificación: las proteínas SNARE (acrónimo de *Soluble NSF Attachment Receptor* o Receptor de unión para el factor soluble NSF; SNARE también significa lazo, trampa o cepo) son proteínas localizadas en la superficie citoplasmática de membranas opuestas y median el acoplamiento selectivo y la fusión de vesículas (Figura 2A). Esto es posible merced a la interacción entre grupos complementarios de proteínas SNAREs (Söllner y col, 1993a; Rothman y Warren, 1994).

Las SNAREs forman una superfamilia de proteínas pequeñas presentes en plantas, levaduras y mamíferos (Bock y col, 2001). Su estructura es simple y una de sus características distintivas es la presencia del motivo SNARE, una secuencia de 60-70 aminoácidos que están dispuestos en repeticiones en heptada (Figura 2B). En sus extremos carboxilo terminal la mayoría de las SNAREs presentan generalmente un dominio transmembrana simple que está conectado al motivo SNARE por un conector corto. Muchas SNAREs tienen dominios plegados independientes que están localizados en posición amino terminal y que varían entre los subgrupos de SNAREs. (Fasshauer, 2003; Hong, 2005; Jahn y Scheller, 2006).

Las principales familias de proteínas SNAREs son:

I - Las VAMPs (Vesicle Associated Membrane Proteins) son clasificadas como R-SNAREs. Hasta la fecha se han identificado 7 VAMPs diferentes en mamíferos, VAMP1-5, 7 y 8.

II - Las Syntaxins se dividen en 2 familias proteicas dependiendo del motivo SNARE que presenten. El primer grupo son las Qa-Syntaxins, compuesto por Syntaxin1-5, 7, 11-18. El segundo grupo, las Qc Syntaxins, está compuesto por Syntaxin6, 8 y 10.

III - Las SNAREs de la familia SNAP25 (Synaptosomal Associated Protein of 25Kd) presentan la misma estructura: 2 motivos SNAREs, Qb y Qc, unidos por un conector

que está palmitoilado para poder anclarse a membrana (ya que estas proteínas carecen de dominio transmembrana). Los miembros de esta familia incluyen a SNAP25, su homólogo SNAP23, SNAP29 y SNAP47.

Originalmente se asumía que había una separación estricta entre SNAREs presentes en el compartimiento donante y el compartimiento aceptor lo cual llevó a clasificarlas en v-SNAREs (presentes en la membrana de la vesícula) y t-SNAREs, (localizadas en la membrana del compartimiento blanco o Target) (Söllner y col, 1993a; Rothman, 1994). Sin embargo, esta clasificación es algo ambigua debido a que las t-SNAREs pueden estar localizadas en una vesícula y viceversa (Cao y Barlowe, 2000).

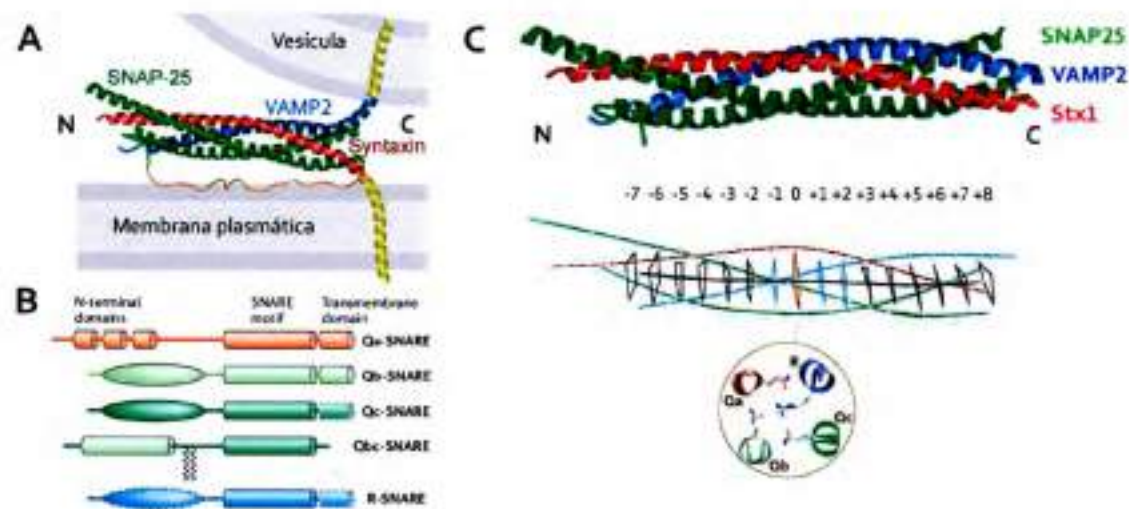


Figura 2A. Modelo hipotético del complejo de fusión SNARE en sinapsis y localización de las diferentes proteínas en membrana. Syntaxin (rojo) y SNAP25 (verde) están ubicadas en la membrana plasmática mientras que VAMP2 (azul) está anclada a la superficie vesicular (modificado de Sutton y col, 1998).

Figura 2B. Dominios estructurales de las subfamilias SNAREs. Las Qa-SNAREs tienen haces de 3 hélices antiparalelas N-terminales. Las Qbc-SNAREs, la subfamilia SNAP25, se caracterizan por contener un motivo Qb-SNARE y un motivo Qc-SNARE unidos por un conector que frecuentemente está palmitoilado. Los dominios cuyos bordes están resaltados con guiones indica que se han perdido en algunas subfamilias (modificado de Jahn y Scheller, 2006).

Figura 2C. Diagrama que indica la posición de las capas en el núcleo del complejo SNARE sináptico. Los ejes de las diferentes hélices están resaltados en el mismo color que la estructura cristalina y el eje del complejo está delineado en negro. La capa "0" está coloreada en rojo y las demás están coloreadas en negro. En el círculo inferior se representa la interacción entre cadenas laterales de los diferentes motivos SNAREs en la capa "0" (modificado de Jahn y Scheller, 2006).

Basados en el hecho de que la mayoría de las v-SNAREs contienen un residuo de arginina (R) en el centro del motivo SNARE y que la mayoría de las t-SNAREs contienen un residuo de glutamina (Q), se reclasificó a estas proteínas en R- y Q-SNAREs (Sutton y col, 1998; Fasshauer y col, 1998). Posteriores análisis revelaron que las Q-SNAREs podían además subdividirse en Qa-, Qb- and Qc- SNAREs.

Un complejo SNARE usualmente consiste de 1 R-SNARE y 3 Q-SNAREs, QaQbQc; este requisito es conocido como regla 1R - 3Q. (Fasshauer y col, 1998; Katz y Brennwald, 2000).

La formación del complejo de fusión es mediada por los motivos SNAREs. Cuando las proteínas están en forma monomérica sus motivos SNAREs están desestructurados; sin embargo cuando se combinan en conjuntos adecuados sus motivos se asocian espontáneamente para formar complejos de núcleo helicoidal de extraordinaria estabilidad. Los complejos están integrados por 4 alfa helices entrelazadas de modo paralelo. El centro de este haz helicoidal contiene 16 capas apiladas de cadenas laterales que interactúan entre sí (Figura 2C). Estas capas son altamente hidrofóbicas, excepto por la capa central (capa cero) que está formada por el aporte de 3 residuos de glutamina (Q) y 1 arginina (R). De acuerdo a esto, los motivos SNAREs que contribuyen a la formación del haz se clasifican en Qa-, Qb-, Qc- y R-SNAREs. Los complejos SNAREs funcionales que dirigen reacciones de fusión requieren la presencia de cada uno de los motivos SNAREs mencionados.

Ensamblaje y disociación de los complejos SNAREs: durante la fusión, las membranas opuestas que están en contacto progresan a través de una serie de estados intermediarios. El modelo mejor sustentado indica que el ensamblaje de las SNAREs ejerce una fuerza mecánica en las membranas, lo cual directamente causa la fusión. Esto implica que los tallos conectores entre los dominios transmembrana y el haz helicoidal de motivos SNAREs sean rígidos. Por lo tanto, al tensar estos conectores se transmite energía sobre las membranas, causando su curvatura. Como resultado las membranas opuestas no solo son presionadas una contra otra sino que además son deformadas, lo cual facilita la formación de un poro de fusión (Figura 3) (Jahn y Grubmuller, 2002; Chernomordik y Kozlov, 2003).

Después de la fusión los complejos SNAREs cambian de una configuración trans (en membranas opuestas) a una configuración cis, en la cual todas las SNAREs residen juntas en la membrana resultante de la fusión (Figura 3). En este estado tales complejos son biológicamente inactivos hasta que sean disociados. El desensamblaje es dirigido por NSF, una proteína con actividad ATPasa. Por sí mismo NSF no interactúa con los complejos SNAREs. Este requiere de cofactores conocidos como SNAPs (Soluble NSF Attachment Proteins), las cuales se unen a la superficie del complejo SNARE. NSF y SNAP (el cual incluye 3 isoformas, α -, β - y γ -SNAP) están altamente conservadas y

parecen funcionar en todos los complejos SNAREs (Söllner y col, 1993b; Rothman, 1994).

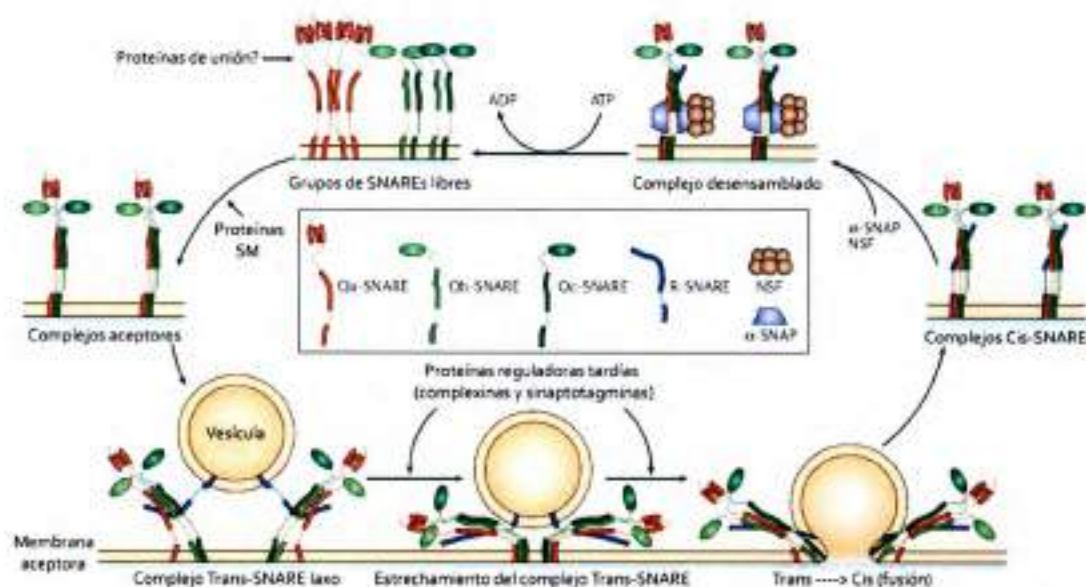


Figura 3. Ensamblaje y cambios conformationales del complejo SNARE en los eventos de fusión y su posterior disociación mediante la acción de NSF y SNAP (modificado de Jahn y Scheller, 2006).

Una vez disociadas las SNAREs, las proteínas de la familia SM (Sec1/Munc18-like) se encargarían de la formación de complejos aceptores entre las Q-SNAREs presentes en una misma membrana, de modo que se generarían complejos Qabc disponibles parcialmente ensamblados para intervenir en nuevos ciclos de fusión al interactuar con la R-SNARE adecuada (Jahn y Scheller, 2006).

Localización intracelular y especificidad de las SNAREs: Algunas SNAREs parecen funcionar solamente en un paso de fusión e interactúan con solo un conjunto específico de SNAREs mientras que otras son menos especializadas.

Para que las SNAREs funcionen en pasos de fusión intracelulares específicos deben existir mecanismos de clasificación que aseguren que cada membrana intracelular esté equipada con el conjunto apropiado de SNAREs. De hecho, muchas SNAREs residen predominantemente, o incluso selectivamente, en compartimientos celulares específicos. Ejemplos de ello incluyen a Syntaxin1, 2 y 4, SNAP23 y SNAP25 en la membrana plasmática, así como también a Synaptobrevin/VAMP2 en vesículas sinápticas o Syntaxin5 y VAMP4 en el complejo de Golgi (Hong, 2005).

Otras SNAREs en cambio tienen una distribución más amplia, tales como aquellas involucradas en el tráfico endosómico; un ejemplo es VAMP8 (Antonin y col, 2000).

Cada célula expresa un gran número de proteínas SNAREs que están localizadas en compartimientos de membrana específicos, lo cual sugiere que la fidelidad del tráfico vesicular podría ser en parte determinada por apareamiento de SNAREs específicas. De hecho, la hipótesis SNARE plantea que el reconocimiento específico de hélices es lo que otorga fidelidad al proceso de fusión, pero esto no siempre parece ser cierto. Es por ello que la contribución de las SNAREs a la especificidad del tráfico de membrana y el modo en que se logra esta especificidad ha sido un área de intenso debate.

Estudios en sistemas *in vitro* han mostrado que las SNAREs se ensamblan en complejos de manera no específica o promiscua (Fasshauer y col, 1999; Yang y col, 1999). Esto tiene lógica ya que la mayoría de los complejos SNAREs tienen un alto grado de conservación estructural, pero dista de ser representativo de los eventos que ocurren *in vivo*. Por ejemplo, VAMP2 funciona en la exocitosis de neurotransmisores pero no en la fusión de endosomas tempranos (Link y col, 1993), aún cuando VAMP2 es reciclada a través de este compartimiento. Sin embargo, en experimentos *in vitro* VAMP2 es capaz de formar complejos con SNAREs endosómicas y puede mediar la fusión de liposomas (Fasshauer y col, 1999; Brandhorst y col, 2006).

Por el contrario, ensayos de fusión de liposomas en levaduras (Izawa y col, 2012) y de extractos de células PC12 (Scales y col, 2000; Bethani y col, 2007) demuestran que las SNAREs presentan un alto grado de especificidad en la formación de complejos, pero sugieren que son necesarios mecanismos de control adicionales para lograr la selectividad en el proceso de fusión. Ésta vendría determinada a través de interacciones con proteínas de la familia SM (Sec1/Munc18-like), proteínas Rabs y sus efectores (Scales y col, 2000; Bethani y col, 2007) e incluso fosfolípidos de inositol presentes en la membrana (Furukawa y Mima, 2014). Las proteínas SM actuarían como chaperonas que estabilizan el ensamblaje de complejos aceptores Qabc en la membrana aceptora. Esta combinación de SNAREs proveería más especificidad a la reacción de fusión final que cada Q-SNARE por sí sola.

Las proteínas de anclaje dependientes de Rab5 y otros factores de acercamiento (el complejo HOPS, por ejemplo) mediarían el reclutamiento de SNAREs específicas en el sitio de fusión mientras otras SNAREs no relacionadas serían excluidas por segregación lateral (Bethani y col, 2007; Jahn y Scheller, 2006).

SNAREs implicadas en el crecimiento neurítico: Si bien la maquinaria de fusión (VAMP2/Syntaxin1/SNAP25) que media la liberación de neurotransmisores ha sido

analizada en detalle, poco se conoce sobre las SNAREs implicadas en el tráfico de membrana que media el establecimiento de polaridad neuronal y crecimiento axonal inicial.

Una de las más estudiadas ha sido la R-SNARE VAMP7, también conocida como TI-VAMP (VAMP Toxina-Insensible) ya que no es afectada por las neurotoxinas tetánicas (TeNT) y botulínicas (BoNT), inhibidores de la liberación de neurotransmisores que clivan componentes de la maquinaria de fusión de vesículas sinápticas. VAMP7 es necesaria para el crecimiento neurítico en sistemas neuronales (Martinez-Arca y col, 2000; Martinez-Arca y col, 2001; Alberts y col, 2003) y está implicada en el tráfico de la molécula de adhesión celular L1-CAM (Alberts y col, 2003). Se sabe además que en neuronas en desarrollo VAMP7 presenta una localización subcelular diferente a la de VAMP2 (Coco y col, 1999).

Sin embargo, ratones knockout para VAMP7 presentan desarrollo cerebral normal, con localización similar de las proteínas axonales en el sistema nervioso (Sato y col, 2011; Danglot y col, 2012), lo cual sugiere que esta SNARE esté siendo reemplazada por otra de funciones similares (redundancia funcional).

Otra R-SNARE que ha sido implicada en el tráfico de membrana durante la neuritogénesis es VAMP4. Ésta presenta similitudes estructurales con VAMP7 y es también insensible a la acción de neurotoxinas. Se ha visto que VAMP4 integra la maquinaria de fusión necesaria para la exocitosis de un sistema vesicular denominado Enlargosoma, el cual permite la expansión rápida y regulada de membrana plasmática durante el crecimiento neurítico de líneas celulares neuronales (Cocucci y col, 2008).

Recientemente ha surgido evidencia que sugiere la participación de VAMP4 en el tráfico de PPVs durante la neuritogénesis en cultivos neuronales (Liu y col, 2013; Xu y col, 2014).

En el caso de VAMP2 la evidencia disponible es controversial. Por un lado se ha descrito que en neuronas en desarrollo el clivaje de VAMP2 con neurotóxicas no tiene efecto sobre el crecimiento neurítico (Grosse y col, 1999; Osen-Sand y col, 1996). Sumado a esto, animales knockout para esta R-SNARE muestran un severo deterioro en la liberación de neurotransmisores, pero el crecimiento cerebral es aparentemente normal (Deitcher y col, 1998; Schoch et al., 2001). Por otro lado se ha sugerido que VAMP2 podría dirigir el crecimiento neurítico en cultivos neuronales (Gupton y Gertler, 2010) pero esto ha sido refutado recientemente (Zylbersztein y col, 2012).

Por su parte, las Q-SNAREs han sido apenas analizadas. En el caso de las Syntaxins se tiene conocimiento que la inactivación de Syntaxin1 por acción de toxina botulínica C conduce a una reducción en el crecimiento neurítico en cultivos neuronales (Grosse y col, 1999; Osen-Sand y col, 1996). Otros estudios han mostrado su participación en retracción y extensión neurítica en neuronas en desarrollo (Sakisaka y col, 2004). Se han desarrollado, sin embargo, 2 líneas de animales knockout para la isoforma Syntaxin1A o Syntaxin1B y en ambos casos el desarrollo cerebral es normal, aunque dichos organismos presentan problemas relacionados con la plasticidad sináptica o mueren a las 2 semanas de nacimiento, respectivamente (Fujiwara y col, 2006; Mishima y col, 2014).

Por otro lado se ha descrito que Syntaxin6 estaría implicada en el crecimiento neurítico en líneas celulares neuronales (Cocucci y col, 2008; Kabayama y col, 2008). Syntaxin 13 también ha sido asociada al crecimiento neurítico en líneas de tipo neuronal pero participaría de la vía de secreción constitutiva (Hirling y col, 2000).

En cuanto a las Qbc-SNAREs los datos disponibles también presentan inconsistencias. En el caso de SNAP25 experimentos de silenciamiento genético (Osen-Sand y col, 1993) y de clivaje con neurotoxinas (Osen-Sand y col, 1996; Grosse y col, 1999) en cultivos neuronales indican que es necesaria para el crecimiento neurítico. Sorprendentemente, la ablación génica de SNAP25 en ratones knockout no tiene incidencia en el desarrollo cerebral. De hecho, estos animales mueren al nacimiento por falla respiratoria. Esta discrepancia podría deberse a la expresión de SNAP23, un homólogo cercano que es capaz de reemplazar funcionalmente a SNAP25 en los ratones knockout (Washbourne y col, 2002). Se ha visto también que SNAP23 estaría involucrada en fenómenos de exocitosis regulada expansiva en ciertos clones de la línea neuronal PC12 (Cocucci y col, 2008).

A pesar del papel que se le ha otorgado a la exocitosis regulada en la especificación axonal y crecimiento neurítico, los componentes de la maquinaria de fusión utilizada para tal fin han apenas comenzado a ser caracterizados.

Una pregunta fundamental que surge en vista de las evidencias presentadas es si todas las PPVs utilizarían el mismo conjunto de SNAREs para mediar su fusión a membrana o, por el contrario, si habría combinaciones específicas para cada subpoblación de PPV en particular que permitan segregar la fusión de diferentes grupos vesiculares especial y/o temporalmente (en sitios específicos del cono de crecimiento o en diferentes

estadios de diferenciación neuronal, es decir, durante el crecimiento axonal inicial, la elongación axonal o el comienzo de la sinaptogénesis).

Por otro lado, la línea de evidencia aportada por nuestro laboratorio ha permitido caracterizar una subpoblación de PPVs específica en cuanto a su composición, caracterizada por la presencia de IGF-1R β_{gc} , su transporte por KIF2, direccionamiento a la membrana del cono de crecimiento axonal mediado por TC10 y Exo70/Complejo exocisto y al estímulo que desencadena su exocitosis regulada (IGF-1), pero aún no se tiene indicio de cuales son las SNAREs involucradas en la fusión de dichas PPVs.

A la luz de estos interrogantes es que surge la necesidad de estudiar las proteínas SNAREs involucradas en la fusión y exocitosis de PPVs necesarias para el crecimiento axonal inicial y el establecimiento de la polaridad neuronal.

Esta fue la premisa que motivó el desarrollo del presente trabajo de tesis, y los objetivos de la misma serán presentados a continuación.

Objetivos

Objetivo:

- Determinar la identidad de las proteínas SNAREs involucradas en la exocitosis de las PPVs necesarias para la regulación del crecimiento axonal inicial y el establecimiento de la polaridad neuronal.

Resultados

Resultados

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que el receptor de IGF-1 es esencial para el establecimiento de la polaridad neuronal. Dicho receptor y su ligando regulan la diferenciación axonal a través de la activación de la vía PI3k-Akt-Cdc42. Además, ellos modulan la elongación inicial del axón estimulando la adición de nueva membrana en el cono de crecimiento de neuronas en desarrollo. En el presente trabajo se analizaron las posibles implicancias de las R-SNAREs VAMP2, 4 y 7 y de las Q-SNAREs Syntaxin1 y 6 y SNAP23 y 25 en los fenómenos de fusión de PPVs y expansión del plasmalema que son desencadenados por la activación del receptor de IGF-1.

Los resultados de este trabajo se dividen en dos partes:

Primera parte:

- Determinación de la expresión temporal y localización subcelular de las proteínas VAMP4, VAMP7, Syntaxin1, Syntaxin6, SNAP23 y SNAP25 en neuronas piramidales de hipocampo en cultivo.
- Efecto de la pérdida de la función de las proteínas VAMP4, VAMP7, Syntaxin6 y SNAP23 en el desarrollo de neuronas en cultivo.

Segunda parte:

- Efecto de la activación del receptor de IGF-1 en la asociación de VAMP4, VAMP7, Syntaxin6 y SNAP23 con estructuras vesiculares en el cono de crecimiento.
- Descripción de subpoblaciones de PPVs VAMP4 o VAMP7-positivas en el cono de crecimiento axonal de neuronas piramidales de hipocampo en cultivo.

Primera parte

Determinación de la expresión y localización subcelular de las proteínas SNAREs analizadas en neuronas de hipocampo en cultivo

Dado que la polarización neuronal es un fenómeno restringido espacial y temporalmente, aquellas proteínas cuya expresión se correlacionen en tiempo y espacio con dicho fenómeno probablemente posean un rol participativo en el desarrollo de los mismos.

Basados en esta premisa, el primer conjunto de experimentos de este trabajo de tesis fue realizado para determinar la expresión temporal y distribución subcelular de las SNAREs VAMP2, VAMP4, VAMP7, Syntaxin1 y 6, SNAP23 y SNAP25. Como se describió anteriormente VAMP2 no está involucrada en crecimiento neurítico sino en el guiado axonal (Zylbersztejn y col, 2012), pero fue utilizada como control ya que su distribución subcelular en estadios tempranos de desarrollo neuronal ha sido bien estudiada. Esta R-SNARE se encuentra enriquecida en el axón, sobre todo en el tercio distal, pero se encuentra prácticamente ausente en la zona rica en actina (frente de avance) en el cono de crecimiento. Además, esta proteína muestra una intensa marca en el soma celular (Coco y col, 1999; Alberts y col, 2006).

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo de embriones E18 de rata (Dotti y col., 1988; ver "Materiales y Métodos"), los cuales se estudiaron a diferentes tiempos mediante métodos bioquímicos e inmunocitoquímicos. En el primer caso las células fueron cosechadas a 18, 24, 36, 48 y 72hs, lisadas con buffer RIPA 1X y analizadas por Western blot (ver "Materiales y Métodos"). En el segundo caso las células fueron fijadas en estadio 2 (12 a 15 horas), 3 (18 a 24 horas) y 4 (36, 48 y 72 horas) de diferenciación neuronal y sometidas a técnicas de inmunotinción con anticuerpos específicos dirigidos contra las SNAREs de interés. Posteriormente las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal.

Los resultados obtenidos por bioquímica (Figura 4, panel inferior) muestran que VAMP2, 4 y 7 se expresan en estadios tempranos en las neuronas en desarrollo, lo mismo que las Q-SNAREs Syntaxin6 y SNAP23. Una particularidad de esta última proteína fue que además de la banda esperada para SNAP23 se observó una segunda banda, menos intensa y de menor peso molecular. Ésta parece no ser resultado de marca

inespecífica ya que su expresión varía en sincronía con la banda mayoritaria y se observa en neuronas en cultivo, pero no siempre en preparaciones directas obtenidas de cerebro. Este doblete en SNAP23 ha sido previamente descrito y podría representar productos de clivaje, splicing alternative, modificaciones post-traduccionales (Reales y col, 2005) o isoformas de SNAP23 (Mollinedo y Lazo, 1997).

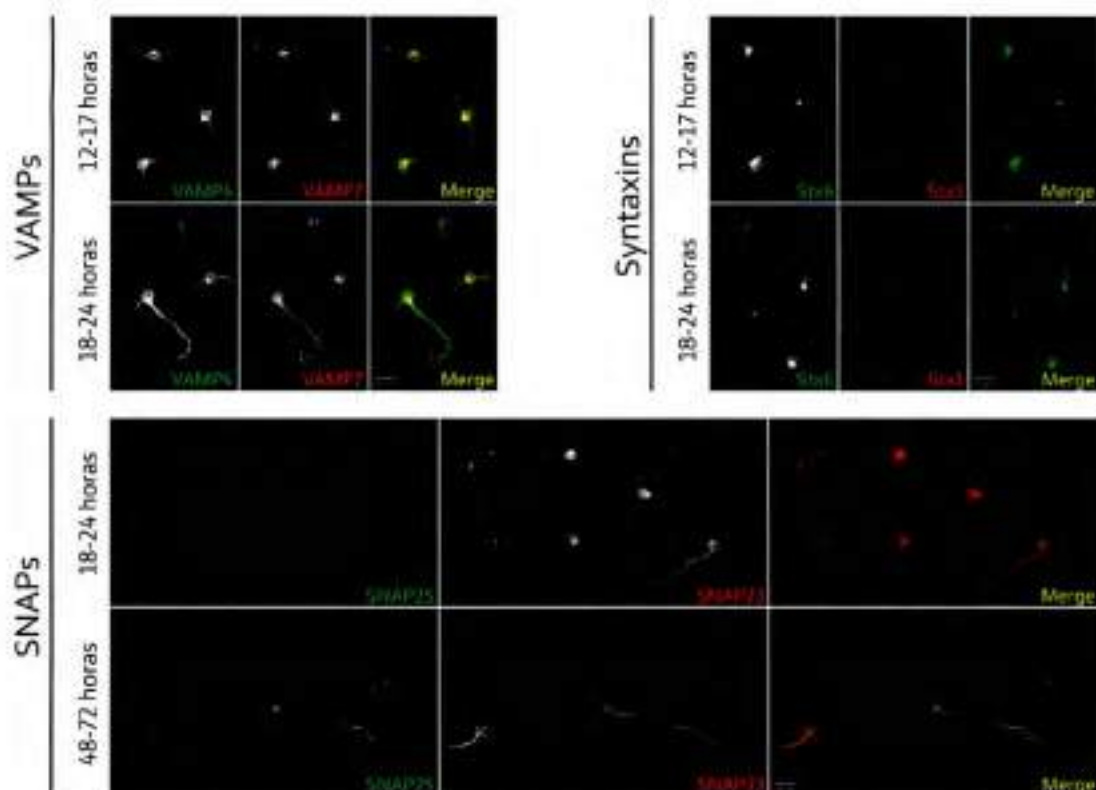


Figura 4. Análisis de los niveles endógenos de las SNAREs estudiadas en neuronas de hipocampo E18 a diferentes tiempos de cultivo. Mediante experimentos de inmunocitoquímica y Western blot se pudo determinar que VAMP4, VAMP7, Syntaxin6 y SNAP23 son expresadas previamente a la transición de estadio 2 a 3 (aproximadamente 15-18hs de cultivo). En cambio, Syntaxin1 y SNAP25 son expresadas a niveles detectables luego de la formación de un axón morfológicamente distinguible y por lo tanto podrían no estar involucradas en el crecimiento axonal inicial. En el caso del ensayo de Western blot nótese la presencia de dobles bandas tanto en el carril de Syntaxin1 como en SNAP23; esto podría deberse a la expresión de isoformas de ambas proteínas. En el ensayo de Western blot se incluyó un carril con la proteína α -Tubulina como control de carga.

Distinto es el caso de Syntaxin1 y SNAP25, las cuales alcanzan niveles de expresión detectables a las 24 horas de cultivo. Dichos resultados fueron ratificados gracias a los datos aportados por las muestras procesadas por inmunocitoquímica (Figura 4, paneles superiores). El hecho de que Syntaxin1 y SNAP25 presentaran niveles de expresión muy bajos durante y posteriormente a la formación de un axón morfológicamente distinguible indicaba que estas SNAREs podrían no estar involucradas en el crecimiento axonal inicial, razón por la cual se las excluyó como posibles candidatos en el presente estudio y no fueron analizadas en los experimentos de pérdida de función.

Es interesante notar que, al igual que en el caso de SNAP23, se evidenció un doble bandeo en los experimentos de bioquímica (Figura 4, panel inferior). Ya el anticuerpo utilizado es capaz de detectar a 2 isoformas de Syntaxin1, llamadas Syntaxin1A y Syntaxin1B (Mishima y col, 2014), es probable que la marca observada sean dichas isoformas.

En la Figura 5 se puede observar con mayor detalle la localización subcelular de las SNAREs expresadas en etapas tempranas de la diferenciación neuronal. En todos los casos se observa que en estadio 2 las proteínas presentan un patrón de distribución similar, localizadas en el soma celular y en todos los procesos menores y sus conos de crecimiento. Ocasionalmente VAMP7 puede encontrarse levemente enriquecida en el extremo distal de las neuritas. En el caso de VAMP4 se observa una marca prominente en posición perinuclear; lo mismo cuenta para VAMP2, VAMP7 y Syntaxin1 pero con menor intensidad. En cambio, esto no ocurre para SNAP23.

El patrón de distribución en estadio 3 varía significativamente dependiendo de cada SNARE en particular. En el caso de las R-SNAREs VAMP2 está enriquecida en el tercio distal del axón en desarrollo, VAMP4 presenta enriquecimiento a lo largo de todo el eje axonal (se mantiene la marca conspicua perinuclear) y VAMP7 presenta localización preferencial en el cono de crecimiento, particularmente en la filopodia del mismo (frente de avance o "*leading edge*") aunque se mantiene una alta concentración de proteína adyacente al núcleo celular. Por su parte, Syntaxin6 presenta una marca robusta en todo el axón (y en localización perinuclear) mientras que SNAP23 muestra un enriquecimiento progresivo en sentido axonal proximal-distal.

Estos resultados en combinación con aquellos surgidos por métodos bioquímicos permitieron restringir nuestro estudio a un conjunto de 4 SNAREs sobre las candidatas escogidas inicialmente: VAMP4, VAMP7, Syntaxin1 y SNAP23.

Estadio 2 -----> Estadio 3

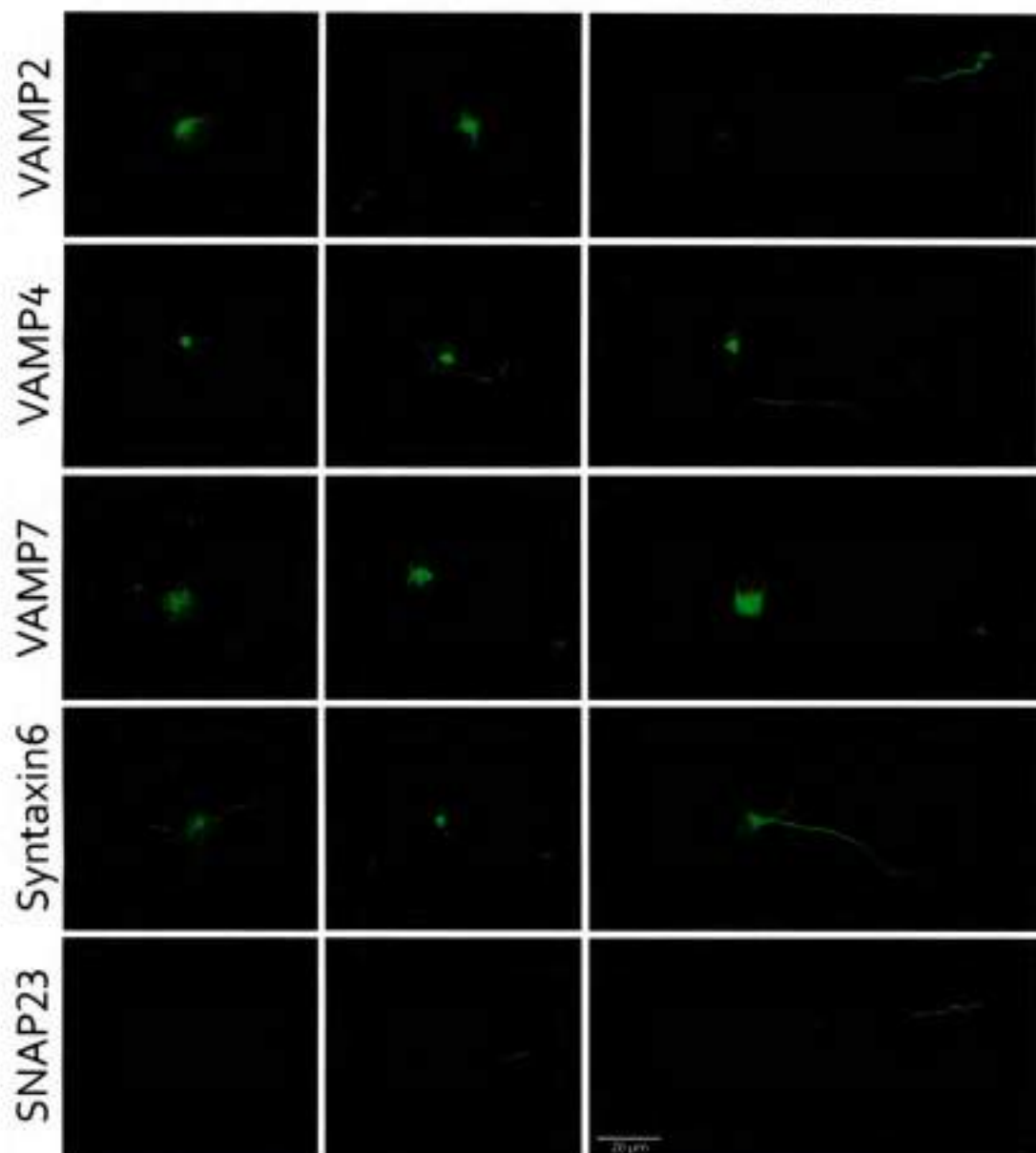


Figura 5. Neuronas piramidales de hipocampo de embriones de rata (E18) fueron cultivadas por 12-18 hs, fijadas y marcadas con anticuerpos contra las SNAREs analizadas. Si bien la distribución de las proteínas estudiadas presentó diferencias dependiendo de cada SNARE en particular, no hubo acumulación preferencial en ninguna neurita durante el estadio 2 en todos los casos estudiados. En cambio, el enriquecimiento axonal de las diferentes SNAREs fue evidente en neuronas en estadio temprano 3 de diferenciación.

Efecto de la pérdida de función de SNAREs en el desarrollo de neuronas de hipocampo en cultivo

Una vez seleccionadas las SNAREs se procedió a evaluar el efecto de la pérdida de función de cada una de ellas sobre el desarrollo de polaridad de neuronas de hipocampo en cultivo. Uno de las formas de lograr la pérdida de función de una proteína es silenciando su expresión en el tipo celular a estudiar. El silenciamiento de la expresión génica de VAMP4, VAMP7, Syntaxin1 y SNAP23 se llevó a cabo utilizando shRNAs (del inglés, **small hairping RNA**) insertados en plásmidos dicistrónicos (ver "Materiales y Métodos"). Éstos contienen 2 marcos de lectura abiertos, uno para insertar la secuencia específica que será procesada como shRNA y otro que contiene una secuencia que codifica la proteína fluorescente verde (GFP). Este marcador de selección permite identificar las células que incorporaron el shRNA (por su color verde) respecto a las que no lo hicieron.

Como primer paso se seleccionaron y diseñaron secuencias de oligonucleótidos específicas, las cuales fueron insertadas dentro de los vectores descritos recientemente. Se produjeron 2 shRNA por proteína SNARE a analizar y 1 ssRNA control (Secuencia Scrambled) la cual no es complementaria (y por ende no silencia) a ningún gen de rata. Los ssRNAs sirven para evaluar los efectos del tratamiento de transfección utilizado. Luego se procedió a analizar su capacidad para silenciar la expresión de las diferentes SNAREs de interés, evaluando si los shRNAs producen disminución de los niveles de proteína endógena. Dado que el método elegido en este estudio para expresar secuencias de DNA es la transfección (ver "Materiales y Métodos") la validación de los shRNAs diseñados por métodos bioquímicos debió efectuarse utilizando líneas celulares derivadas de rata, específicamente la línea C6. Esto obedece al bajo nivel de transfección que poseen los cultivos primarios neuronales, lo cual impide detectar diferencias en expresión proteica como resultado del silenciamiento génico mediante métodos bioquímicos. Por su mayor eficiencia de transfección, las líneas celulares permiten salvar este obstáculo.

Se transfectaron diferentes lotes de células de la línea murina C6 con los shRNAs diseñados, se permitió que éstos fueran expresados por un periodo de 24-30 horas y posteriormente las células se colectaron y procesaron para ser analizadas mediante métodos bioquímicos. Luego se evaluó la disminución específica de los niveles endógenos de las SNAREs analizadas. Mientras que el ssRNA no alteró la expresión de

las SNAREs analizadas, los efectos de los distintos shRNAs fueron variables (Figura 6). Hubo casos donde el silenciamiento de la expresión génica fue escaso (shSyntaxin6, shSNAP23) o moderado (shVAMP4', shVAMP7, shSyntaxin6', shSNAP23') y otros donde tuvo alta eficiencia (shVAMP7'). Finalmente se seleccionó 1 shRNA validado para cada SNARE en particular, a saber: shVAMP4', shVAMP7', shSyntaxin6', shSNAP23' y el ssRNA como secuencia control.



Figura 5. Células de la línea celular C6 fueron transfectadas con shRNAs para VAMP4 (shVAMP4 y shVAMP4'), VAMP7 (shVAMP7 y shVAMP7') y Syntaxin6 (shSyntaxin6' y shSyntaxin6'). Se utilizó una secuencia Scrambled (ssRNA) como control de transfección. Las células fueron cosechadas a 24-30 horas post-transfección y se analizó la proteína total mediante Western blot. Nótese el decrecimiento significativo de la expresión en la mayoría de las SNAREs analizadas. Se incluyó como control de carga a la proteína α -Tubulina.

El siguiente paso fue transfectar los shRNAs validados en cultivos primarios de neuronas de hipocampo y estudiar la morfología de aquellas neuronas que incorporaron dichos shRNAs.

En el método tradicional de transfección las células son expuestas al plásmido o secuencia nucleotídica luego de que se ha logrado una firme adhesión al sustrato, lo cual ocurre generalmente a las 6 horas de plaqueo. Esto planteaba una dificultad en el caso de los experimentos de pérdida de función ya que una disminución apreciable de la expresión génica se alcanzaría recién a las 30-36 horas de cultivo, fuera de la ventana temporal en la que el crecimiento axonal inicial tiene lugar (18 a 24 horas de cultivo). Es por esto que se recurrió a una modificación de la técnica de transfección basada en expresión de transgenes en células no adherentes. Esta técnica modificada, denominada transfección en suspensión (ver "Materiales y Métodos") consiste en exponer a las neuronas al shRNA antes de que éstas sean sembradas en el sustrato, cuando aún están en suspensión. De esta manera la incorporación y expresión de los shRNAs a las células ocurre simultáneamente con el plaqueo de las mismas. Es decir, el tiempo de cultivo transcurrido será igual al tiempo que llevan los shRNA expresándose. Una ventaja

adicional de esta técnica fue que la eficiencia de transfección se incrementó aproximadamente unas 10 veces respecto a la transfección tradicional sobre neuronas ya adheridas al sustrato. Las neuronas transfectadas de esta manera se cultivaron durante 24-30 horas, luego fueron fijadas y se las marcó con anticuerpos dirigidos contra cada SNARE en particular (dependiendo del shRNA utilizado) para evidenciar baja en la expresión proteica endógena. Además se incluyó un anticuerpo que detecta la proteína Taul, marcador específico de axones (Mandell y col., 1996). En el caso del ensayo evaluando la función de VAMP7 no fue posible utilizar Taul (ambos anticuerpos han sido desarrollados en el mismo huésped) por lo que se recurrió a un marcador específico de neuronas, β III tubulina y la presencia de axones se determinó morfológicamente. Aquellos procesos que tuvieran como mínimo 80 μ m de longitud y al menos fueran 20 μ m más largos que el promedio de las neuritas restantes fueron considerados como verdaderos axones.

En el caso de VAMP4, los resultados obtenidos dejaron en evidencia que las neuronas que expresaron shVAMP4' poseían niveles apenas detectables de esa SNARE y no fueron capaces de elaborar un axón, generando solo neuritas menores cortas (Figura 6a, flecha en el panel central) Además, no se observó marcación positiva para Taul en ninguna de las neuritas desarrolladas. Contrariamente, aquellas neuronas que expresaron el ssRNA mostraron niveles normales de VAMP4, similares a los de las neuronas no transfectadas (Figura 6a, punta de flecha en el panel central). En esta condición las neuronas controles mostraron una morfología diferenciada con la presencia de un axón Taul-positivo (Figura 6a, panel superior). Seguidamente se procedió a analizar si falta de capacidad de polarización, o diferenciación axonal en aquellas neuronas que expresaron el shRNA de VAMP4 se debía específicamente a la ausencia de VAMP4 y no era resultado de efectos inespecíficos ("Off Target") derivados del silenciamiento génico. Para ello se llevaron a cabo experimentos de recuperación de fenotipo en los cuales se realizó una cotransfección con shVAMP4' y una construcción llamada VAMP4-HA que codifica para la proteína VAMP4 nativa ("full length") fusionada a un epítopo HA (Hemaglutinina). En las neuronas cotransfectadas la expresión de la proteína VAMP4-HA fue suficiente para revertir la falta de polarización inducida por la expresión del shRNA dirigido contra VAMP4. De hecho, estas neuronas cotransfectadas fueron capaces de polarizar, generando un proceso axonal enriquecido con la proteína Taul (Figura 6a, panel inferior).

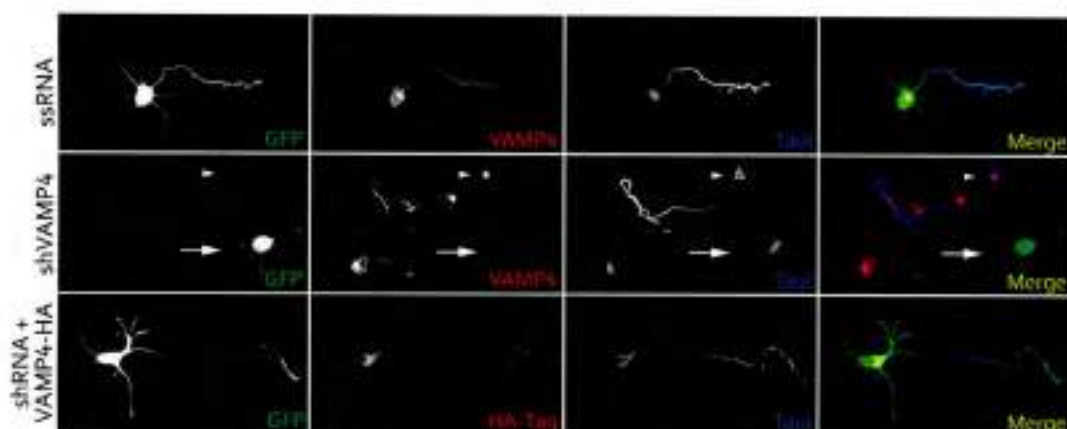


Figura 6a. Ensayos de pérdida de función y rescate fenotípico en neuronas de hipocampo en cultivo. Neuronas piramidales de hipocampo de ratas E18 fueron transfectadas a tiempo cero de cultivo con una secuencia ssRNA como control (panel superior), con un shRNA específico de secuencia dirigido contra VAMP4 (panel central) o con el shRNA en conjunto con la construcción VAMP4-HA. Las células se fijaron a 24-30 horas de cultivo y fueron marcadas con anticuerpos contra VAMP4 (rojo) y el marcador axonal Taul (azul). Nótese que las neuronas expresando shVAMP4' (GFP, verde) al contrario de las células no transfectadas (punta de flecha, panel central) no desarrollaron axones (flecha, en panel del medio). En el caso de las neuronas control (ssRNA) o de las neuronas cotransfectadas con el shRNAs y la SNARE versión completa (full length) hubo desarrollo de axones normales Taul-positivos.

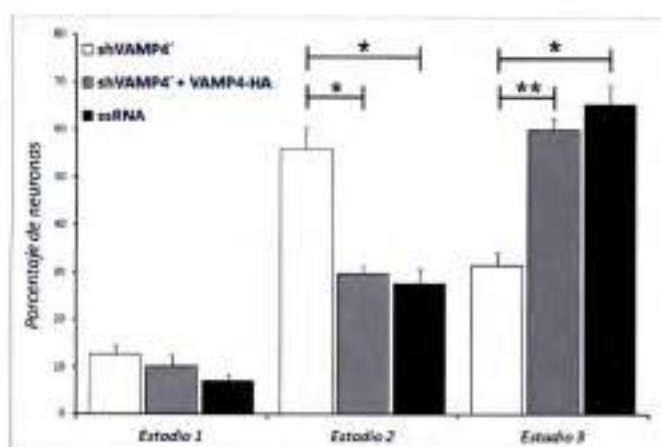


Figura 6b. Cuantificación de ensayos de pérdida y recuperación de función. Se muestran los porcentajes (\pm SEM) de neuronas transfectadas con ssRNA, shVAMP4' o cotransfectadas con shRNA y VAMP4-HA a estadios específicos de diferenciación, después de 24 a 30 horas en cultivo. Un porcentaje significativo de las células transfectadas con shVAMP4' quedaron arrestadas en estadio 2. En contraste, la mayoría de las neuronas transfectadas con ssRNA o con shRNA + VAMP4-HA un axón (estadio 3). n : 3 experimentos independientes.

La significancia estadística entre las condiciones shVAMP4', shVAMP4' + VAMP4-HA y ssRNA para los estadios 2 y 3 fue evaluada por medio de test T. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo de los datos obtenidos observándose que ~31% de las neuronas transfectadas con el shRNA dirigido contra VAMP4 mostraron axones positivos para Taul, mientras que casi el 70% de estas neuronas transfectadas se mantuvieron entre los estadios 1 y 2 de diferenciación. Por el contrario, más del ~65 % de las neuronas control, no transfectadas con el shRNA contra VAMP4, desarrollaron una morfología polarizada (alcanzando un estadio 3 de diferenciación) y mostraron axones positivos para Taul. En el experimento de recuperación de fenotipo el

~60% de las células cotransfectadas fueron capaces de polarizar, mientras que el 40% restante se mantuvieron simétricas, sin formación de axón (Figura 6b).

Se realizaron también experimentos similares a los descritos recientemente silenciando la expresión de Syntaxin6. Los resultados de estos ensayos mostraron que la transfección con shRNA dirigido contra Syntaxin6 reduce significativamente los niveles de expresión de esta SNARE en neuronas de hipocampo en cultivo (Figura 7a). Asimismo, las neuronas transfectadas con el shSyntaxin6' presentaron niveles de expresión de Syntaxin6 bajos y no mostraron una morfología polarizada. Estas neuronas no fueron capaces de desarrollar un axón y solo produjeron neuritas pequeñas y cortas, características de un estadio 2 de diferenciación (Figura 7a, primera fila). Consistente con la falta de polaridad morfológica de las neuronas transfectadas, estas células no pudieron concentrar la proteína Taul en alguna de sus neuritas, evidenciando ésto la falta de un proceso axonal bioquímicamente discernible (Figura 7a, flecha en fila del medio). Contrariamente, los axones de neuronas que se encontraban en el mismo cultivo y que no expresaron shSyntaxin6' fueron claramente Taul positivos (Figura 7a, punta de flecha en fila del medio).

Con el objeto de determinar si la falta en la capacidad de polarización o diferenciación axonal se debía específicamente a la baja en la expresión de Syntaxin6 inducida por el shRNA se realizaron experimentos de rescate de fenotipo similares a los efectuados para VAMP4. Para ello se cotransfectaron neuronas con el shRNA dirigido contra Syntaxin6 y una construcción denominada Stx6-HA que codifica la proteína Syntaxin6 nativa fusionada a un epítotope HA. La expresión de Stx6-HA logró restablecer un fenotipo polarizado. Prueba de ello es la presencia de un axón identificable por la presencia de la proteína Taul en la mayoría de esas neuronas (Figura 7a, última fila).

Al igual que para el estudio de VAMP4 se realizó un análisis cuantitativo de los estadios de diferenciación en el que se encontraban las neuronas transfectadas con shSyntaxin6' comparadas con aquellas que habían incorporado el ssRNA o que habían sido cotransfectadas con shRNA y Stx6-HA. El resultado de esta cuantificación mostró que menos del 35% de las neuronas transfectadas con el shRNA exhibieron axones positivos para Taul, mientras que más del 65% de las neuronas transfectadas se encontraron entre estadio 1 y 2 de diferenciación. Por el contrario ~70% de las neuronas que incorporaron el ssRNA generaron un axón y se encontraron en estadio 3 de desarrollo. Una situación similar ocurrió al evaluar las células de los diferentes estadios

en el experimento de rescate fenotípico: ~65% de las células transfectadas evidenciaron un axón morfológica y bioquímicamente discernible (Figura 7b).

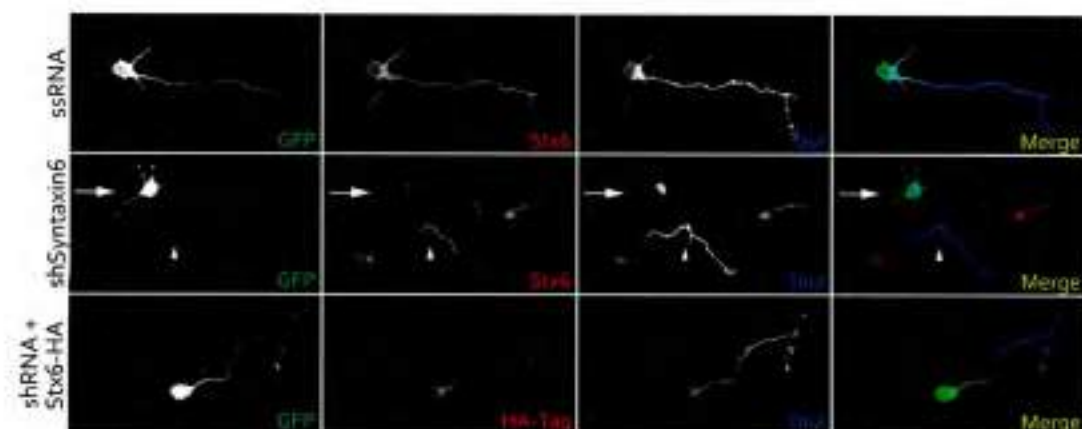


Figura 7a. Ensayos de pérdida de función y rescate fenotípico en neuronas de hipocampo en cultivo. Neuronas piramidales de hipocampo de ratas E18 fueron transfectadas a tiempo cero de cultivo con una secuencia sin sentido (ssRNA) como control (panel superior), con un shRNA secuencia-específico dirigido contra Syntaxin6 (panel central) o con el shRNA en conjunto con la construcción Stx6-HA. Las células se fijaron a 24-30 horas de cultivo y fueron marcadas con anticuerpos contra Syntaxin6 (rojo) y el marcador axonal Tau1 (azul). Nótese que las neuronas expresando shSyntaxin6' (GFP, verde) al contrario de las células no transfectadas (punta de flecha, panel central) no desarrollaron axones (flecha, en panel del medio). En el caso de las neuronas control (ssRNA) o de las neuronas cotransfectadas con el shRNAs y la SNARE versión completa (full length) hubo desarrollo de axones normales Tau1-positivos.

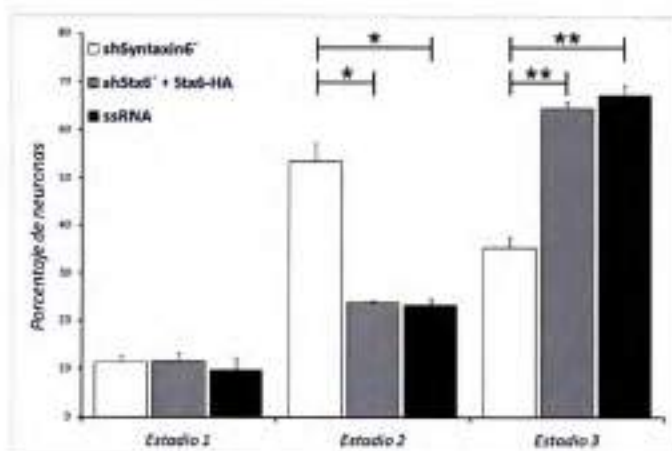


Figura 7b. Cuantificación de ensayos de pérdida y recuperación de función. Se muestran los porcentajes (\pm SEM) de neuronas transfectadas con ssRNA, shStx6' o shRNA + Stx6-HA a estadios de diferenciación específicos (24-30 horas en cultivo). Un gran porcentaje de las células transfectadas con shStx6' quedaron arrestadas en estadio 2, mientras que la mayoría de las neuronas transfectadas con ssRNA o con shRNA + Stx6-HA alcanzaron el estadio 3 de diferenciación. n : 3 experimentos independientes.

La significancia estadística entre las condiciones shStx6', shStx6' + Stx6-HA y ssRNA para los estadios 2 y 3 fue evaluada por medio de test T. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Al evaluar la pérdida de función de SNAP23 mediante silenciamiento de la expresión génica se observó que aquellas neuronas en cultivo que expresaron la construcción shSNAP23' presentaron bajos niveles de proteína SNAP23 endógena en comparación con las células no transfectadas (Figura 8a, fila central). Esta condición impidió que las

células que expresaron el shRNA pudieran desarrollar procesos de tipo axonal; ellas solo presentaron neuritas cortas de longitud equivalente y carentes del marcador axonal Taul (figura 8a, flechas en fila central). Por su parte, las células no transfectadas (figura 8a, punta de flecha en fila central) o aquellas que expresaron la secuencia control (figura 8a, fila superior) mostraron niveles similares y normales de SNAP23 endógena y esto se reflejó en la presencia de axones morfológica y bioquímicamente distinguibles.

Para corroborar que la baja expresión de SNAP23 estaba asociada al impedimento de las neuronas en cultivo para adquirir un fenotipo polarizado se recurrió a ensayos de rescate fenotípico utilizando un plásmido denominado SNAP23-HA que expresa la proteína SNAP23 nativa unida a un epítipo HA que funciona como molécula reportera. Se evidenció que aquellas células que presentaron expresión conjunta del shRNA y el cDNA de la proteína SNAP23 nativa fueron capaces de polarizar de modo normal, generando axones Taul-positivos. Esto fue indicativo de que el drástico efecto observado en las neuronas era consecuencia específica de la depleción de SNAP23 y no al “apagado” inespecífico de otras proteínas.

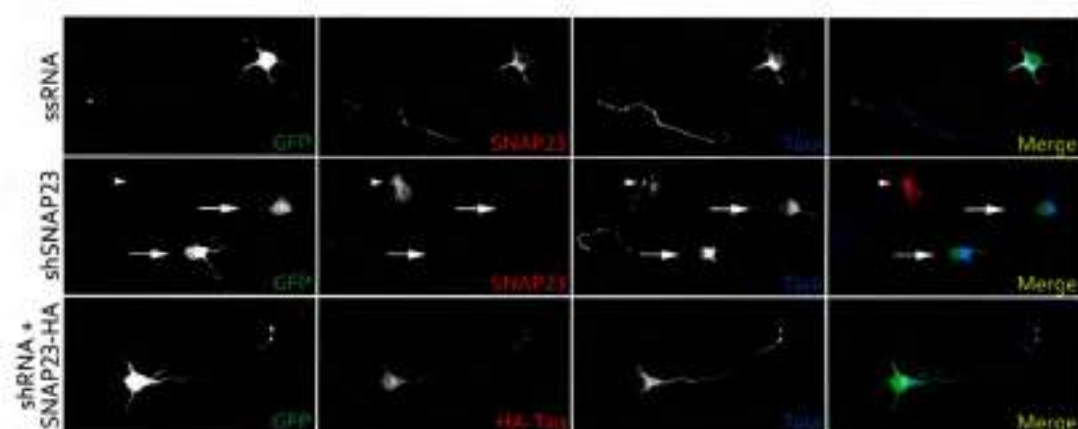


Figura 8a. Ensayos de pérdida de función y rescate fenotípico en neuronas de hipocampo en cultivo. Neuronas piramidales de hipocampo de ratas E18 fueron transfectadas a tiempo cero de cultivo con una secuencia sin sentido (ssRNA) como control (panel superior), con un shRNA secuencia-específico dirigido contra SNAP23 (panel central) o con el shRNA en conjunto con la construcción SNAP23-HA. Las células se fijaron a 24-30 horas de cultivo y fueron marcadas con anticuerpos contra SNAP23 (rojo) y el marcador axonal Taul (azul). Nótese que las neuronas expresando shSNAP23' (GFP, verde) al contrario de las células no transfectadas (punta de flecha, panel central) no desarrollaron axones (flecha, en panel del medio). En el caso de las neuronas control (ssRNA) o de las neuronas cotransfectadas con el shRNAs y la SNARE versión completa (full length) hubo desarrollo de axones normales Taul-positivos.

El análisis de los datos procedentes del conteo de células transfectadas con shRNA mostró que más del 70% de las neuronas que expresaron shSNAP23' quedaron arrestadas en estadio 1 y 2 de diferenciación (Figura 8b). En cambio, en las neuronas que expresaron el ssRNA los datos resultantes mostraron que ~65% de células fueron capaces de polarizar normalmente. Estos altos valores de células en estadio 3 de diferenciación pudieron observarse también en la cuantificación de los experimentos de recuperación de fenotipo (Figura 8b).

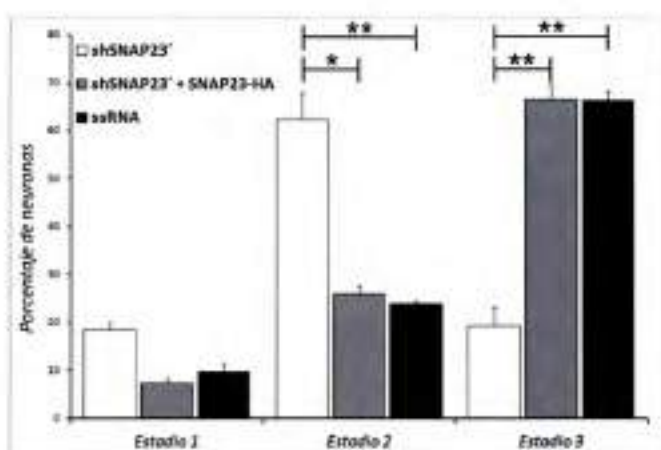


Figura 8b. Cuantificación de ensayos de pérdida y recuperación de función. Se muestran los porcentajes (\pm SEM) de neuronas transfectadas con ssRNA, shRNA o cotransfectadas con shRNA y SNAP23-HA a estadios específicos de diferenciación, después de 24-30 horas en cultivo. Un porcentaje significativo de las células transfectadas con shSNAP23' quedaron arrestadas en estadio 2. En contraste, la mayoría de las neuronas transfectadas con ssRNA o con shRNA + SNAP23-HA exhibieron un axón (estadio 3). *n*: 3 experimentos independientes.

La significancia estadística entre las condiciones shSNAP23', shSNAP23' + SNAP23-HA y ssRNA para los estadios 2 y 3 fue evaluada por medio de test T. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Contrariamente a los estudios de pérdida de función descriptos, el análisis de VAMP7 presentó la dificultad de no poder contar con un marcador axonal, razón por la cual se adoptó un criterio morfológico para discernir entre células polarizadas y no polarizadas. Así, las células que expresaron shVAMP7' y presentaron disminución de la proteína endógena (Figura 9a, flecha en panel inferior) exhibieron en muchos casos procesos similares a un axón (de 80 μ m o más), significativamente más largo que los procesos restantes (al menos 20 μ m de longitud respecto al largo promedio de las demás neuritas). Lo mismo sucedió con aquellas células del mismo cultivo que no introdujeron el plásmido (Figura 9a, punta de flecha en panel inferior). En la situación control la transfección con el ssRNA no afectó los niveles de VAMP7 endógena ni la normal polarización de las neuronas que expresaron el plásmido. En estas células fue evidente la presencia de un axón morfológicamente distinguible (Figura 9a, panel superior). Los datos obtenidos de la cuantificación mostraron que más del 65% de las neuronas

control (transfectadas con ssRNA) desarrollaron una morfología polarizada. En el caso de las células transfectadas con el shRNA VAMP7-dirigido el porcentaje de neuronas polarizadas disminuyó sensiblemente ya que ~55% de las células desarrollan un axón morfológicamente distinguible y el restante 45% queda arrestado en estadios 1 o 2 (Figura 9b). Sin embargo, esta disminución no resultó ser estadísticamente significativa.

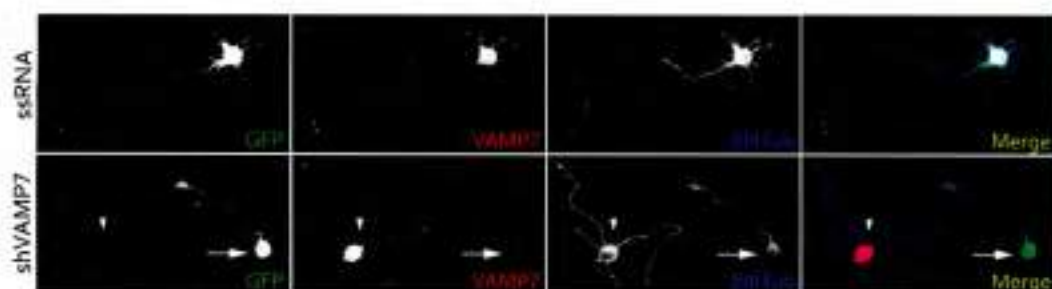


Figura 9a. Ensayos de pérdida de función en neuronas de hipocampo en cultivo. Neuronas piramidales de hipocampo de ratas E18 fueron transfectadas a tiempo cero de cultivo con una secuencia ssRNA como control (panel superior) o con un shRNA secuencia-específico dirigido contra VAMP7 (panel inferior). Las células se fijaron a 24-30 horas de cultivo y fueron marcadas con un anticuerpo contra VAMP7 (rojo). Se utilizó además un anticuerpo dirigido contra el marcador neuronal β III tubulina (azul). Nótese que las neuronas expresando shVAMP7⁺ (GFP, verde; flecha, en panel inferior) y las células no transfectadas (punta de flecha, panel inferior) desarrollaron procesos similares a axones. En el caso de las neuronas control (ssRNA) hubo desarrollo de axones morfológicamente discernibles (panel superior).

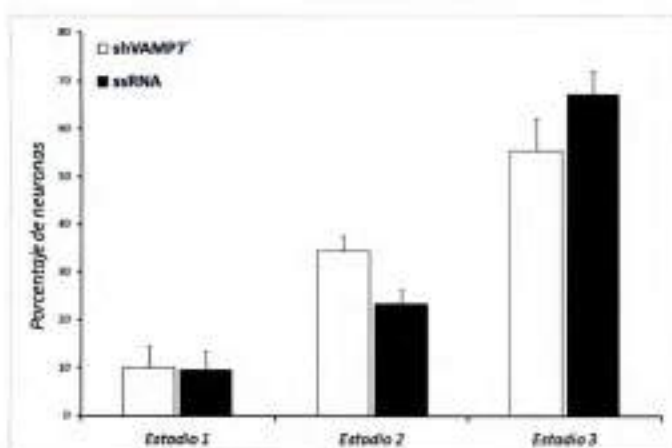


Figura 9b. Cuantificación de ensayos de pérdida de función. Se muestran los porcentajes (\pm SEM) de neuronas transfectadas con ssRNA o shVAMP7⁺ a 24-30 horas en cultivo. Se observó un leve aumento de neuronas en estadio 2 en las células transfectadas con shVAMP7⁺ pero éste no fue estadísticamente significativo. Por otro lado, la mayoría de las neuronas transfectadas con la secuencia control ssRNA desarrollaron un axón discernible morfológicamente (estadio 3). n: 3 experimentos independientes.

La significancia estadística entre las condiciones shVAMP7⁺ y ssRNA para los estadios 2 y 3 fue evaluada por medio de test T.

Considerados en conjunto, los resultados expuestos sugieren que la función de las SNAREs VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 es esencial para el crecimiento inicial axonal en neuronas piramidales de hipocampo. En tanto, VAMP7 parecería estar vinculada a la elongación axonal más que al crecimiento inicial durante el desarrollo axonal.

Segunda parte

Efecto de la activación del receptor de IGF-1 en la asociación de VAMP4, VAMP7, Syntaxin6 y SNAP23 con estructuras vesiculares en el cono de crecimiento

Se ha propuesto que uno de los mecanismos por el cual el factor trófico IGF-1 y su receptor controlarían la agregación y expansión de membrana en el cono de crecimiento (y, en consecuencia, el crecimiento axonal inicial) sería por exocitosis polarizada del receptor de IGF-1 en una neurita en particular. Dado que IGF-1 desencadena el ensamblaje del complejo exocisto, este factor trófico podría regular la inserción de su propio receptor. Este mecanismo de retroalimentación positiva podría amplificar rápidamente la expansión de membrana plasmática en respuesta a IGF-1 y, por lo tanto, la tasa de crecimiento de una neurita indiferenciada (Dupraz y col, 2009).

Es interesante notar que algunas de las SNAREs analizadas hasta el momento además de su rol en el crecimiento neurítico han sido vinculadas en la exocitosis regulada en sistemas no neuronales que guardan analogía con la exocitosis mediada por IGF-1.

Por ejemplo, es bien conocido el rol de SNAP23 en la traslocación a membrana de la proteína transportadora de glucosa GLUT4 en respuesta al estímulo inicial con insulina (Kawanishi y col, 2000; Jewell y col, 2010). En adipocitos se ha demostrado que la translocación de vesículas conteniendo la proteína transportadora de glucosa GLUT 4 desde depósitos intracelulares hacia la membrana plasmática es regulada vía insulina y su receptor. Si bien este es un modelo de estudio no neuronal, muchos de los eventos de señalización desencadenados por estimulación con insulina y activación de su receptor, así como las moléculas y complejos involucrados en la inserción a membrana de GLUT4 presentan similitudes con la estimulación mediada por IGF-1 y la activación de su receptor en neuronas en desarrollo (Chiang y col., 2002; Dupraz y col, 2009; Jewell y col, 2010).

En el caso de Syntaxin6 se ha descrito que en adipocitos es expresada en el TGN y en las vesículas que contienen al transportador GLUT4. Bajo condiciones de estimulación con insulina dicha SNARE facilita el transporte de las vesículas GLUT4-positivas a la membrana plasmática y es además necesaria para la internalización de GLUT4 luego que el estímulo con insulina ha cesado (Perera y col, 2003; Jung y col, 2012). Por estas

razones se diseñó un conjunto de experimentos para analizar el efecto de la estimulación dirigida por IGF-1 sobre la función de VAMP4, VAMP7, Syntaxin6 y SNAP23 y además evidenciar si dicho efecto está relacionado con el tráfico del receptor de IGF-1 a membrana plasmática en la neurona en desarrollo.

Para investigar si las SNAREs VAMP4, VAMP7, Syntaxin6 y SNAP23 pueden mediar la exocitosis del receptor de IGF-1 en respuesta a estimulación con su ligando se procedió a aislar partículas de conos de crecimiento neuronales, denominadas GCPs (del inglés **G**rowth **C**one **P**articles, ver "Materiales y Métodos") a partir de cerebros de embriones de rata de 18 días de gestación y posteriormente se las estimuló con 20 nM de IGF-1 por 5 minutos. Luego de ello los GCPs fueron lisados con un buffer específico para que las PPVs contenidas en su interior fueran liberadas. Dicho buffer está formulado para promover una lisis suave, a modo de permitir la liberación de las PPVs contenidas en los GCPs, las cuales se mantienen intactas. Posteriormente los GCPs se resellan y de esta manera se obtiene una solución donde están presentes tanto las PPVs como las membranas de los GCPs, llamadas membrana de cono de crecimiento o GCM (Ellis y col, 1985). Acto seguido las estructuras membranosas obtenidas (PPVs + GCM) fueron incubadas con un anticuerpo anti- β gc que reconoce la subunidad β inmunquímicamente distinta del receptor de IGF-1, la cual es expresada en altos niveles en estadios neuronales tempranos (Quiroga y col., 1995). Dado que en la membrana de las PPVs el receptor de IGF-1 está orientado con las cadenas β gc hacia el exterior (disposición "inside-out" en la vesícula) el anti- β gc fue capaz de unirse específicamente a dicho receptor. Los complejos PPV+GCM/anti- β gc fueron entonces específicamente inmunoprecipitados con microesferas de sefarosa unidas a proteína A (ver "Materiales y Métodos"). Se separó la fracción soluble de la muestra (sobrenadante, SN) de la fracción conteniendo las microesferas unidas al complejo PPV+GCM/anti- β gc (inmunoprecipitado, IP) y las muestras obtenidas de estos experimentos de inmunoprecipitación fueron posteriormente analizadas por Western blot utilizando anticuerpos específicos contra la subunidad β gc (control) y las SNAREs en estudio (Figura 10). Es importante destacar que en este conjunto de experimentos se contó con una situación control donde la mezcla PPVs + GCM no fue incubada con el anti- β gc, para evaluar la posible unión inespecífica de las microesferas de sefarosa-proteína A con la muestra.

Adicionalmente se hicieron experimentos de estimulación de GCPs inmunoprecipitando las estructuras membranosas obtenidas con diferentes anti-SNAREs en lugar de utilizar el anti- β gc. Se muestran los resultados obtenidos de la inmunoprecipitación con Syntaxin6 (Figura 11).

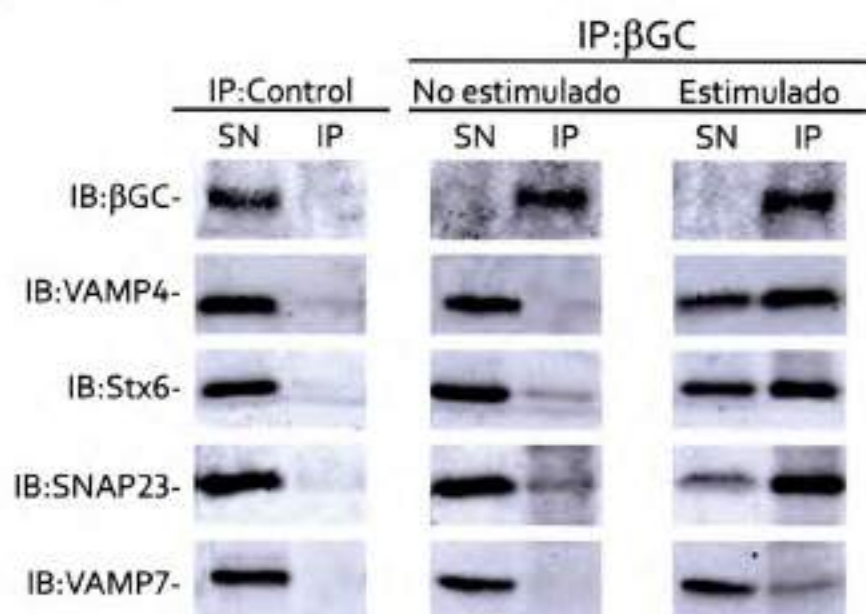


Figura 10. Ensayo de inmunoprecipitación (IP) en fracciones membranosas de conos de crecimiento axonal. Los GCPs fueron aisladas de cerebros de ratas E18, estimulados con 20 nM de IGF-1, sometidos a lisis suave y entonces se desarrollaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo específico contra la subunidad β del receptor de IGF-1 denominado anti- β GC. Las muestras fueron procesadas para ser analizadas mediante Western blot con el anti- β GC y distintos anti-SNAREs. En los IP realizados con anti- β GC la estimulación con IGF-1 disparó una interacción significativa entre las VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 con el receptor de IGF-1, mientras que VAMP7 mostró una asociación muy baja con dicho receptor (compárese la segunda columna respect a la tercera columna del panel).

Los resultados de estos experimentos mostraron que, en conos de crecimiento la estimulación con el factor trófico IGF-1 promueve una interacción significativa entre la R-SNARE VAMP4 con el receptor de IGF-1; la misma situación cuenta para las Q-SNAREs Syntaxin 6 y SNAP23. Esta interacción está restringida espacialmente al cono de crecimiento y tiene lugar probablemente como resultado de los procesos de exocitosis que dirigen la inserción a membrana plasmática del receptor de IGF-1.

Por otro lado, el grado de asociación de la R-SNARE VAMP7 con el receptor de IGF-1 disparada por estimulación con su ligando es, en caso de existir, escaso.

En los experimentos donde se inmunoprecipitaron PPVs + GCM conteniendo Syntaxin6 es notoria la asociación/interacción de esta SNARE con VAMP4 y SNAP23 frente al estímulo con IGF-1, situación que no se evidencia en las muestras que no sido tratadas con el citado factor trófico.

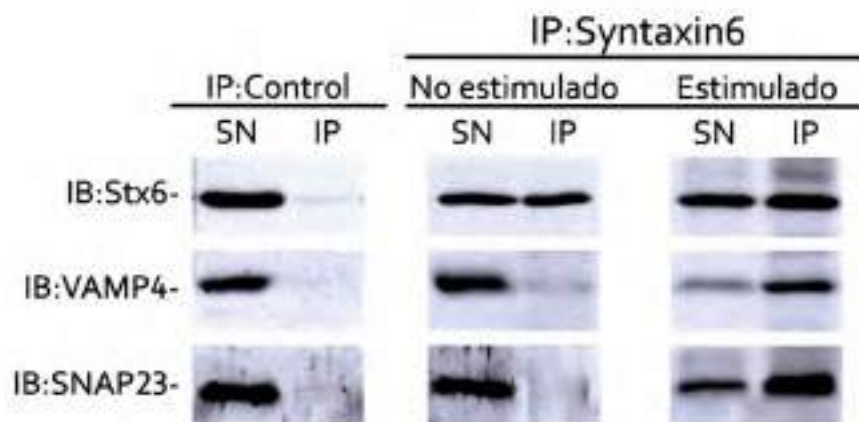


Figura 11. Ensayo de inmunoprecipitación (IP) en fracciones membranosas de conos de crecimiento axonal. Las partículas de conos de crecimiento fueron aisladas de cerebros de ratas E18, estimuladas con 20 nM de IGF-1, sometidas a lisis suave y entonces se desarrollaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo específico dirigido contra Syntaxin6. Las muestras fueron procesadas para ser analizadas mediante Western blot con los anticuerpos contra Syntaxin6, VAMP4 y SNAP23. Los IP realizados utilizando anti-Syntaxin6 mostraron que ésta coimmunoprecipita con VAMP4 y SNAP23 tras la estimulación con IGF-1 (compárese la segunda columna respecto a la tercera columna del panel).

Un evento de ocurrencia temprana durante la diferenciación neuronal es el enriquecimiento del receptor de IGF-1 en su forma activable en una neurita menor en estadio 2 (Sosa y col, 2006). Para ser activado, el receptor de IGF-1 necesita ser insertado en la membrana plasmática neuronal de modo que su sitio de unión a ligando quede expuesto al espacio extracelular.

Habiéndose determinado la existencia de una interacción entre VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 con el receptor de IGF-1 en respuesta al estímulo con su ligando, el siguiente paso fue estudiar las consecuencias de la pérdida de función de VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 en la acumulación selectiva y dirigida del receptor de IGF-1 activado (es decir, fosforilado) en neuronas inmaduras. Para tal fin se utilizó un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la forma fosforilada del IGF-1R (Sosa y col, 2006; Dupraz y col, 2009). Para este experimento las neuronas fueron transfectadas en suspensión con los shRNA SNARE-dirigidos o con el ssRNA, cultivadas durante 12 horas, privadas de factores de crecimiento durante 3-4 horas y estimuladas por 5 minutos con IGF-1 20 nM. Seguidamente, las células fueron fijadas y procesadas por inmunofluorescencia para ser analizadas en el microscopio. Los ensayos se realizaron por duplicado a los fines de contar con neuronas tratadas bajo las mismas condiciones experimentales para ser inmunomarcadas con el anticuerpo anti-fosfoIGF-1R o bien con el anticuerpo anti- β ge, el cual reconoce tanto la forma fosforilada como la no fosforilada del receptor de

IGF-1 (Quiroga y col, 1995). En ambas situaciones se utilizó un anticuerpo dirigido contra β III tubulina para poder discernir verdaderas neuronas en estadio 2 respecto a células gliales, las cuales en muchos casos presentan morfologías similares a las neuronas inmaduras.

Cuando se analizó el efecto de la depleción de VAMP4 sobre la distribución del receptor de IGF-1 fosforilado se observó que en aquellas neuronas transfectadas con el ssRNA la distribución del receptor de IGF-1 activado se concentró en una neurita específicamente (Figura 12, flecha en panel superior). En contraste, las neuronas transfectadas con el shRNA dirigido contra VAMP4 exhibieron marca del receptor de IGF-1 activado mucho menos intensa y no confinada a ningún proceso menor en particular (Figura 12, punta de flecha en panel central). Cuando se analizó la distribución del receptor de IGF-1 total (fosforilado y no fosforilado) mediante anti- β gc se observó que éste exhibe un patrón punteado (presumiblemente intracelular) en todas las neuritas, encontrándose distribuido de modo homogéneo en toda la célula. Esto puso en evidencia que la falta de receptor activable en membrana plasmática se debería a un defecto en la externalización del mismo y no a la alteración de su tráfico desde TGN al cono de crecimiento (Figura 12, panel inferior).

El silenciamiento de Syntaxin6 por expresión de su shRNA específico permitió evidenciar una situación similar a la observada para VAMP4: no hubo distribución polarizada del receptor de IGF-1 fosforilado (Figura 13, punta de flecha en fila central) a pesar de que el receptor de IGF-1 se localizaba en toda la extensión de la neurona (Figura 13, fila inferior). Distinta fue la situación de las neuronas transfectadas con el ssRNA, que lograron concentrar el receptor fosforilado a un proceso en particular (Figura 13, flecha en fila superior).

La expresión normal de SNAP23 en neuronas en desarrollo también fue determinante en la distribución polarizada del receptor de IGF-1 activable. Así quedó demostrado por la marcación conspicua con el anti-fosfo IGF-1R en solo un proceso menor en aquellas neuronas transfectadas con el ssRNA (Figura 14, flecha en panel superior), o la marca tenue y difusa obtenida con el mismo anticuerpo al marcar células transfectadas con el plásmido shSNAP23 (Figura 14, punta de flecha en panel central). Como en los 2 casos anteriores la marca con anti- β gc en células transfectadas con el shRNA permitió observar la disponibilidad del IGF-1R en toda la neurona (Figura 14, panel inferior).

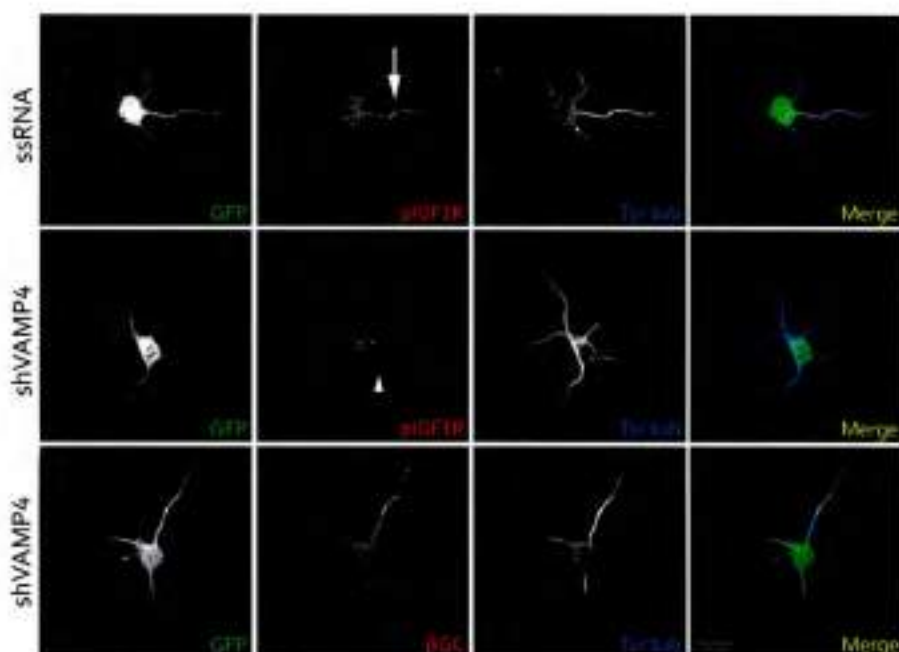


Figura 12. Micrografía de triple fluorescencia mostrando la distribución del receptor de IGF-1 fosforilado (rojo, panel superior y central) o la subunidad β_{gc} del IGF-1R (rojo, panel inferior), de tubulina tirosinada (azul), y el marcador de transfección GFP (verde). Las neuronas fueron transfectadas con ssRNA (panel superior) o con el shRNA dirigido a VAMP4 (panel central e inferior). Nótese la diferencia de polarización del receptor de IGF-1 activo (inserto en membrana) a una de las neuritas de una célula transfectada con ssRNA (panel superior, flecha) respecto de una célula transfectada con shRNA (panel central, punta de flecha).

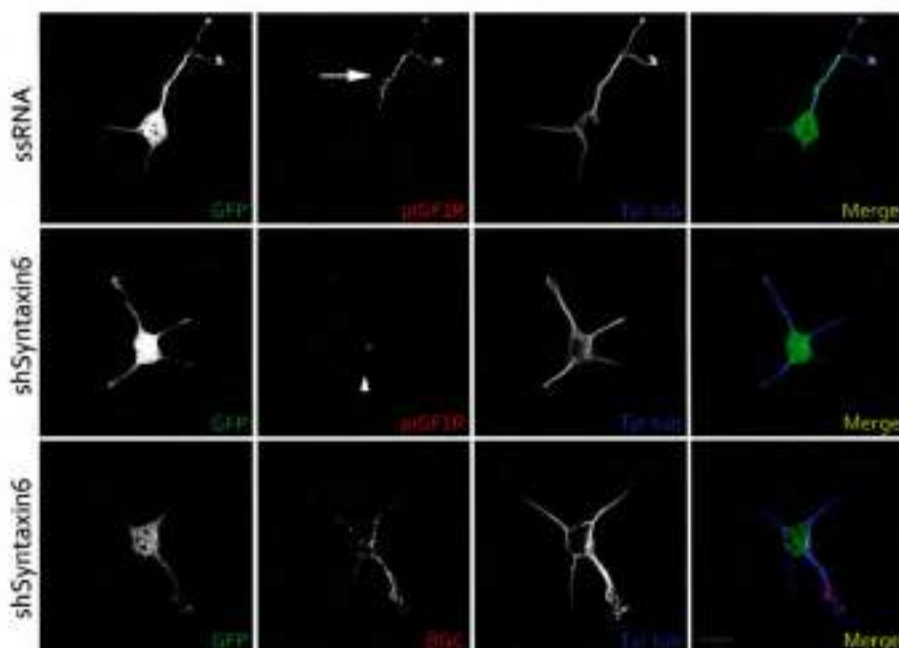


Figura 13. Micrografía de triple fluorescencia mostrando la distribución del receptor de IGF-1 fosforilado (rojo, panel superior y central) o la subunidad β_{gc} del IGF-1R (rojo, panel inferior), de tubulina tirosinada (azul), y el marcador de transfección GFP (verde). Las neuronas fueron transfectadas con ssRNA (panel superior) o con el shRNA dirigido a Syntaxin6 (panel central e inferior). Nótese la diferencia de polarización del receptor de IGF-1 activo (inserto en membrana) a una de las neuritas de una célula transfectada con ssRNA (panel superior, flecha) respecto de una célula transfectada con shRNA (panel central, punta de flecha).

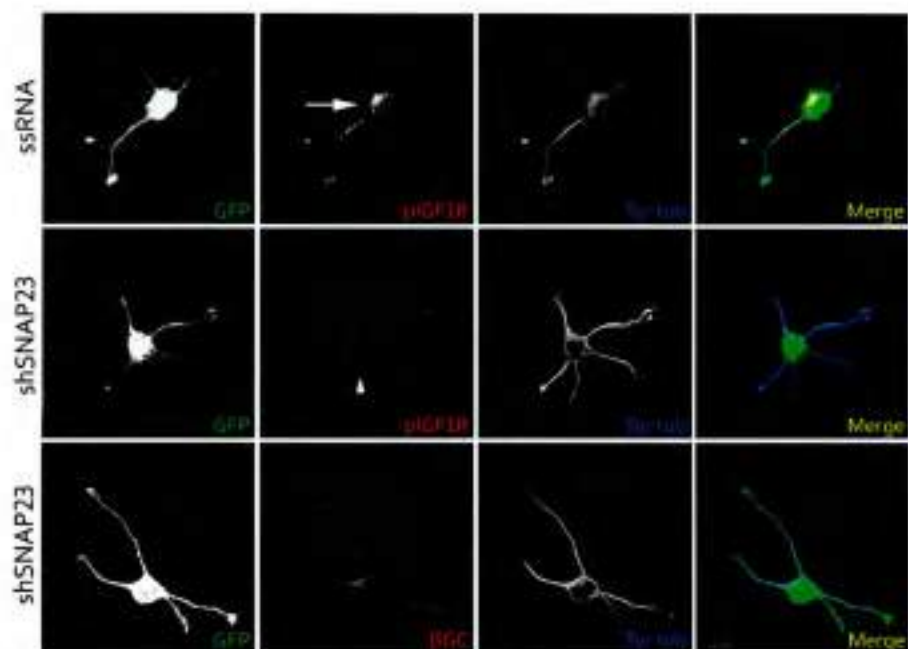


Figura 14. Micrografía de triple fluorescencia mostrando la distribución del receptor de IGF-1 fosforilado (rojo, panel superior y central) o la subunidad β del IGF-1R (rojo, panel inferior), de tubulina tiosinada (azul), y el marcador de transfección GFP (verde). Las neuronas fueron transfectadas con ssRNA (panel superior) o con el shSNAP23 (panel central e inferior). Nótese la diferencia de polarización del receptor de IGF-1 activo a una de las neuritas de una célula transfectada con ssRNA (panel superior, flecha) respecto de una célula transfectada con shRNA (panel central, punta de flecha).

La cuantificación de los datos obtenidos en estos ensayos se basó en el cálculo del Índice de Polaridad o “índice de polarización de receptor de IGF-1 activo”, el cual permite determinar si una neurona en estadio 2 presenta o no distribución polarizada del receptor de IGF-1 activable (Dupraz y col, 2009). Éste se define como la intensidad de fluorescencia (medida en unidades arbitrarias) de la neurita más brillante dividida por la intensidad de fluorescencia promedio (medida también en unidades arbitrarias) de las neuritas restantes presentes en la misma célula. Como se muestra en la Figura 15, el índice fue significativamente más alto en las neuronas transfectadas con el ssRNA respecto a aquellas transfectadas con shVAMP4', Syntaxin6' y SNAP23'.

Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que las SNAREs VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 son necesarias para la externalización polarizada del receptor de IGF-1 en estadio 2 de diferenciación neuronal y por lo tanto, para el crecimiento axonal inicial en neuronas piramidales de hipocampo en cultivo.

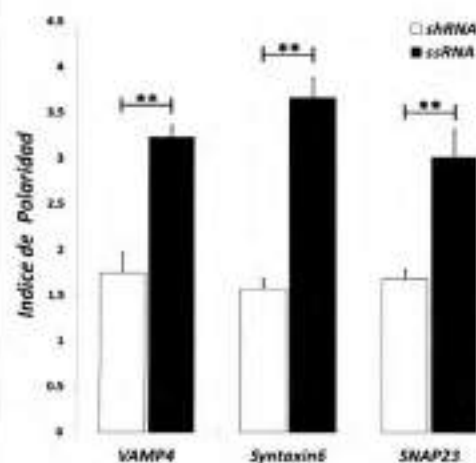


Figura 15. Cuantificación de los experimentos de polarización del receptor de IGF-1 activable. Índice de polaridad (\pm SEM) de neuronas control o neuronas conteniendo el shRNA SNARE-dirigido después de 12-16hs en cultivo. Nótese que el índice de polaridad es significativamente más alto en las neuronas transfectadas con ssRNA en comparación con aquellas transfectadas con shVAMP4', shSyntaxin6' o shSNAP23'. Esto ocurre como consecuencia de que estas últimas células son incapaces de externalizar el receptor de IGF-1 activable. n : 3 experimentos independientes.

La significancia estadística entre las condiciones shRNA y ssRNA para cada SNARE en particular fue evaluada por medio de test T. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Descripción de subpoblaciones de PPVs VAMP4 o VAMP7-positivas en el cono de crecimiento axonal de neuronas piramidales de hipocampo en cultivo

Como se describió en la sección anterior se denomina PPVs a todo tipo de estructuras vesiculares que permitan la expansión de la membrana plasmática en neuronas en desarrollo y que son capaces de sufrir exocitosis regulada. Se hace evidente que ésta es una definición de tipo funcional ya que hasta el momento no se han descrito marcadores bioquímicos que sirvan para distinguir a las PPVs de otros tipos vesiculares e incluso, que permitan diferenciar entre diferentes poblaciones de PPVs. Al respecto, se ha descrito que en ciertos clones de la línea PC12 existirían al menos 2 poblaciones vesiculares involucradas en crecimiento neurítico definidas por la presencia de VAMP4 o VAMP7 en su superficie. Se ha sugerido además que esta situación podría ser extensiva a neuronas creciendo en condiciones *ex vivo* (D'Alessandro y col, 2010; Meldolesi, 2012). Esta hipótesis fue cobrando fuerza a lo largo de este trabajo de tesis ya que los resultados obtenidos sugieren que VAMP4 estaría implicada en el tráfico de PPVs conteniendo al receptor de IGF-1, no ocurriendo así para VAMP7. Por otro lado, se sabe que durante el desarrollo neuronal VAMP7 está involucrada en el tráfico de PPVs que contienen la molécula de adhesión celular L1 (Alberts y col, 2003). Otra observación que llamó la atención fue la segregación espacial progresiva que presentan VAMP4 y VAMP7 en conos de crecimiento de neuronas en cultivo. La marca de ambas SNAREs parece solaparse a 18-24 horas de cultivo, cuando el crecimiento axonal inicial

tiene lugar (Figura 16, panel superior), pero a 36-48 horas de cultivo (durante la fase de elongación axonal) se evidencia una completa falta de colocalización entre ellas (Figura 16, panel inferior). Ante esta situación surgió la necesidad de analizar en mayor detalle la distribución de VAMP4 y VAMP7 en conos de crecimiento de neuronas en etapas de crecimiento axonal inicial. Para ello se realizaron cultivos de neuronas de hipocampo de embriones de rata de 18 días de gestación, los cuales fueron fijados transcurridas 18-24 horas y procesados por métodos inmunocitoquímicos para ser analizados mediante microscopía confocal.

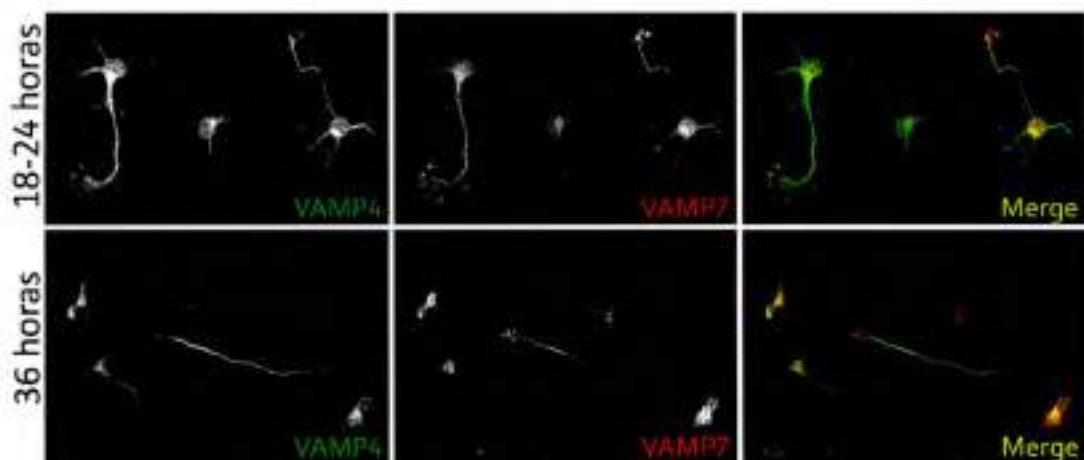


Figura 16. Patrones de distribución de VAMP4 y VAMP7 en neuronas piramidales E18 a 18-24 horas (panel superior) y a 36 horas de cultivo (panel inferior). Nótese la escasa colocalización de VAMP4 y VAMP7 en el cono de crecimiento durante la fase de elongación axonal (36 horas).

Las células fueron inmunomarcadas simultáneamente con anticuerpos anti-VAMP4 y anti-VAMP7. Se obtuvieron micrografías de alta magnificación (a aumento de 100X) de conos de crecimiento axonales, las cuales fueron posteriormente mejoradas mediante algoritmos de deconvolución y se estudió la distribución de ambas VAMPs utilizando el Índice de correlación de Manders como parámetro de colocalización. Los valores obtenidos (expresados en porcentaje) indican que aproximadamente un 10% del total de vesículas analizadas presentan colocalización. Este valor es coincidente con la baja colocalización observada entre VAMP4 y VAMP7. Esto sugiere que ellas estarían presentes en poblaciones vesiculares diferentes. Es interesante destacar que VAMP4 marca exclusivamente vesículas (Figura 17, segundo panel); en cambio, VAMP7 está asociada tanto a vesículas como a túbulo-vesículas (Figura 17, panel superior; puntas de flecha y flechas, respectivamente). Así, estas 2 subpoblaciones vesiculares parecen divergir morfológicamente y en cuanto a su composición de R-SNAREs.

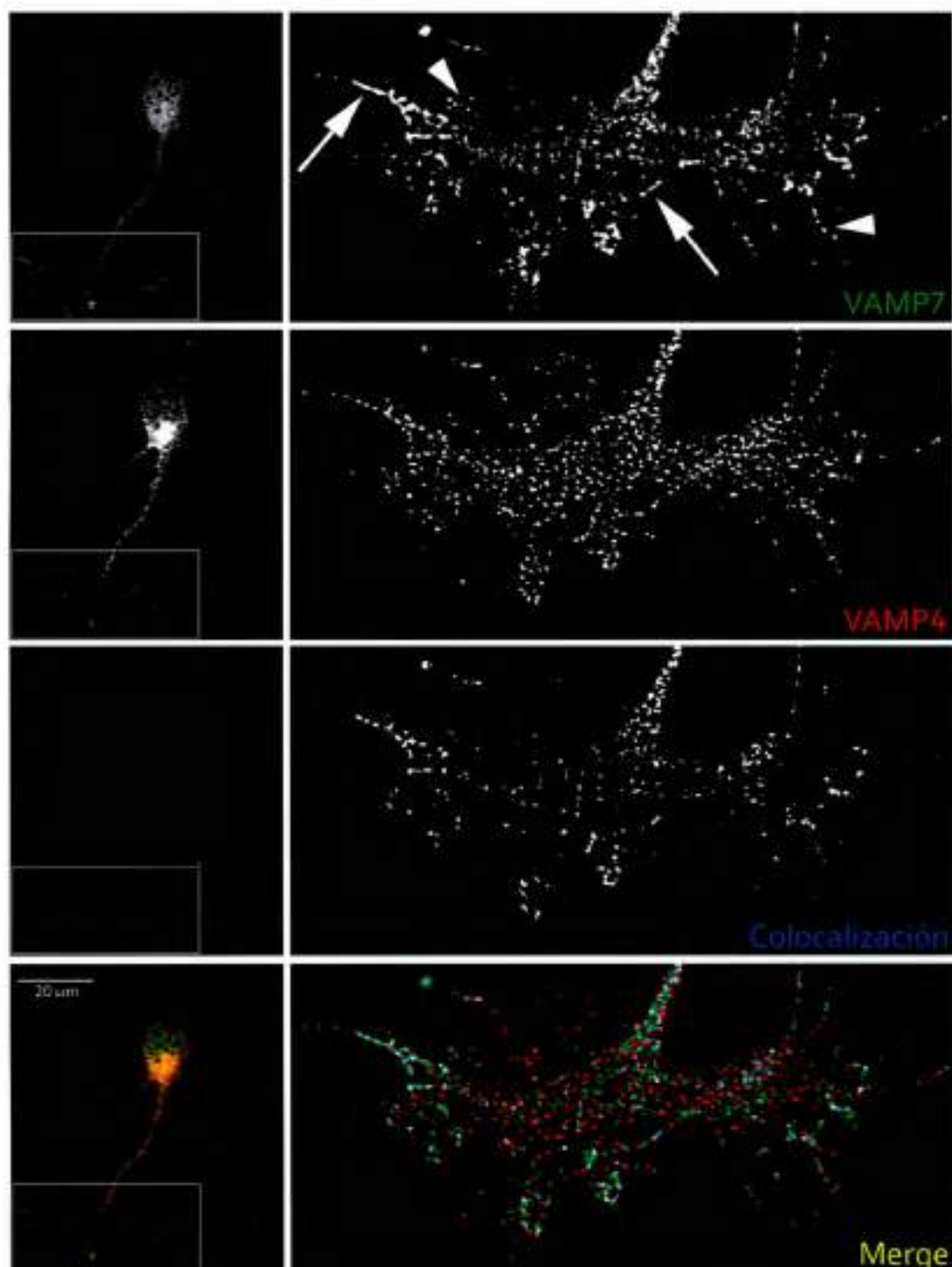


Figura 17. Neuronas piramidales E18 fueron cultivadas por 18-24 horas, fijadas y marcadas con anti-VAMP4 (rojo) y anti-VAMP7 (verde). Se obtuvieron micrografías de alta magnificación de conos de crecimiento y se analizó la distribución de ambas VAMPs utilizando el Índice de Manders como parámetro de colocalización (columna izquierda). Los valores obtenidos indican que aproximadamente un 10% del total de vesículas analizadas presentan colocalización. Este valor es coincidente con la escasa colocalización observada entre estructuras tipo vesiculares conteniendo a VAMP4 y VAMP7. Nótese que mientras que VAMP4 marca exclusivamente vesículas (segundo panel izquierdo) VAMP7 está presente tanto en vesículas como en túbulos (panel superior izquierdo; puntas de flecha y flechas, respectivamente).

Cotejados en conjunto, los datos obtenidos de este experimento y de ensayos anteriores sugieren la existencia de 2 subpoblaciones vesiculares presentes en el cono de crecimiento axonal en estadios tempranos de diferenciación. La primera está conformada por estructuras vesiculares y es definida por la presencia de la SNARE VAMP4, siendo éstas PPVs las encargadas de mediar la expansión de membrana y el crecimiento axonal inicial. La segunda subpoblación se caracteriza por estar compuesta por túbulos y vesículas y está definida bioquímicamente por la presencia de la SNARE VAMP7.

Discusión

Discusión

Patrón de expresión temporal y localización subcelular de diferentes SNAREs en neuronas de hipocampo en cultivo

Inicialmente se analizó la expresión de las proteínas SNAREs seleccionadas por estar implicadas en el crecimiento neurítico en neuronas piramidales de hipocampo E18 en cultivo.

Los resultados obtenidos de la primera línea experimental mostraron que, en neuronas creciendo en cultivo, las SNAREs seleccionadas inicialmente como candidatas presentaron diferencias no solo en su distribución subcelular sino además en el patrón de expresión temporal a estadios tempranos de diferenciación, lo cual será detallado a continuación.

La distribución subcelular de VAMP2 y su expresión temprana han sido ya motivo de estudio de otros grupos de investigación en cultivos neuronales (Coco y col, 1999; Alberts y col, 2006; Gupton y Gertler, 2010). En concordancia con estos datos, VAMP2 se expresó a estadios tempranos de diferenciación neuronal y mostró una distribución celular similar a la descrita en la bibliografía disponible. Tal como se mencionó en la sección **Resultados** debido a que esta SNARE está implicada en guiado axonal y no en el crecimiento axonal inicial (Zylbersztein y col, 2012) solo fue utilizada como control, razón por la cual se la excluyó de los posteriores conjuntos de experimentos.

Respecto a VAMP4 se encontró que esta SNARE es expresada a estadios tempranos de diferenciación y se localiza principalmente en posición perinuclear (probablemente en el TGN), ocurriendo durante el crecimiento axonal inicial un enriquecimiento a lo largo de todo el eje del axón en desarrollo. La localización preferencial de VAMP4 en TGN ya era conocida, al igual que su expresión en cerebro y líneas celulares neuronales (Stegmaier y col, 1999). Sin embargo, la conspicua concentración de VAMP4 en el axón en crecimiento (y su expresión temprana) fue un hallazgo novedoso ya que solo recientemente ha surgido evidencia de la presencia de VAMP4 en conos de crecimiento en cultivos neuronales (Liu y col, 2013; Xu y col, 2014). También se ha descrito que VAMP4 es expresada en el área CA1 del hipocampo en rata, donde las neuronas piramidales expresan este marcador en TGN y en las terminales presinápticas axonales (Raingo y col, 2012).

La distribución subcelular de VAMP7 en neuronas de hipocampo a estadios tempranos de diferenciación concuerda con lo especificado en trabajos anteriores (Coco y col, 1999; Muzerelle y col, 2003; Alberts y col, 2006), donde VAMP7 se localiza en el frente de avance del cono de crecimiento y a su vez es expresada en el soma celular. Sin embargo, poca información hasta el momento se conocía sobre cómo esta proteína se expresa tempranamente en neuronas en cultivo.

En el caso de Syntaxin6 se encontró una situación similar a la observada para VAMP4 en cuanto a expresión temprana en cultivos neuronales y a una localización subcelular prominente en TGN con enriquecimiento paulatino en el eje axonal durante la polarización de la neurona. Se conocía que Syntaxin6 es expresada a altos niveles en cerebro y su presencia en TGN en células no neuronales ya había sido reportada (Bock y col, 1996). En cuanto al enriquecimiento dual en TGN y axón en estadios tempranos de diferenciación se tenía conocimiento de una situación similar solo en células PC12 inducidas a diferenciación por acción del factor trófico NGF (Kabayama y col, 2008). De esta manera, los datos obtenidos para Syntaxin6 en este trabajo permiten ampliar la ocurrencia de estos eventos a cultivos primarios.

Es interesante notar que la interacción entre Syntaxin6 y VAMP4 mediando diversos pasos en el tráfico intracelular de membranas ha sido ampliamente descrita (Steehmaier y col, 1999; Kreykenbohm y col, 2002; Laufman y col, 2011). Esto podría, en principio, explicar la similitud en cuanto a distribución temporal y espacial de VAMP4 y Syntaxin6 en estadios tempranos y en el axón en crecimiento.

En cuanto a SNAP23 (también conocida como Syndet) si bien recientemente se describió que está presente en diferentes regiones del cerebro en estadios postnatales tempranos (Prescott y Chamberlain, 2011), prácticamente se desconocía tanto su localización subcelular como su patrón de expresión temporal a estadios tempranos en neuronas en cultivo. Los datos obtenidos por inmunofluorescencia mostraron que SNAP23 se presenta distribuida homogéneamente en toda la célula cuando la neurona aún es simétrica. Una vez que el crecimiento inicial axonal tiene lugar la distribución de SNAP23 cambia, encontrándose enriquecida en el axón en crecimiento. Este dato encontró su correlato en aquellos obtenidos por métodos bioquímicos, los cuales mostraron que SNAP23 es expresada a estadios tempranos de cultivo. Otro punto que merece atención es el hecho de que, en neuronas hipocámpales adultas, SNAP23 presenta una distribución subcelular restringida al compartimiento somato-dendrítico

mientras que su homólogo SNAP25 se concentra en el compartimiento axonal (Chen y col, 1999; Suh y col, 2010). Este cambio drástico de localización subcelular dependiente del estadio de diferenciación neuronal ha sido también reportado para otras SNAREs, por ejemplo VAMP7 (Coco y col, 1999).

Cuando se estudió SNAP25 fue llamativo su patrón de expresión temporal, ya que se alcanzaron niveles detectables de esta proteína recién entre las 24 y 36 horas de cultivo, después de que los eventos de polarización neuronal y crecimiento axonal inicial han tenido lugar. Evidencia de trabajos anteriores permitieron respaldar estas observaciones. Se ha descrito que SNAP25 juega un rol esencial en la elongación axonal durante el desarrollo y es expresada en conos de crecimiento durante estadios tardíos de elongación axonal en neuronas en cultivo y células PC12 (Osen-Sand y col, 1993). Además se ha visto que tanto los transcritos de mRNA como la proteína SNAP25 están en bajos niveles al día 15-16 de gestación y ellos recién son incrementados durante la maduración postnatal cerebral y en la etapa adulta (Oyler y col, 1991; Frassoni y col, 2005; Suh y col, 2010). Lo mismo ocurre en la retina embrionaria y en el tubo neural, donde los niveles de mRNA y proteína SNAP25 son bajos durante el desarrollo temprano y su incremento tiene lugar al comienzo de la sinaptogénesis. Este patrón de expresión tardía es también exhibido por otras proteínas involucradas en la función sináptica, tal como Sinapsina I y está en contraste con el de componentes axonales como GAP43, cuya expresión temprana ha sido relacionada con rol en el crecimiento axonal (Catisca y col, 1991).

Una situación similar ocurrió con Syntaxin1, la cual presentó niveles bajos de expresión proteica durante las primeras 24 horas de cultivo neuronal. Dado que existen 2 isoformas de Syntaxin1, denominadas Syntaxin1A y Syntaxin1B cabía la posibilidad de que el método de detección utilizado no estuviera englobando a ambas isoformas. En este sentido es importante remarcar que el anticuerpo utilizado detecta ambas isoformas de Syntaxin1, Syntaxin1A y Syntaxin1B. Al igual que SNAP25, Syntaxin1 parece incrementar su nivel endógeno fuera del lapso temporal en el que el crecimiento axonal inicial tiene lugar. Esta situación podría tener respuesta al considerar la siguiente evidencia: si bien se ha reportado que Syntaxin1 y SNAP25 son necesarias para el crecimiento y/o elongación neurítica (Osen-Sand y col, 1993; Igarashi y col, 1996; Osen-Sand y col, 1996; Kimura y col, 2003) estudios recientes han demostrado que ambas SNAREs son esenciales para la supervivencia celular. Esto es así ya que

participan de una vía de reciclaje de membrana que mantiene procesos celulares vitales y que es distinta de aquella encargada de liberación de neurotransmisores (Peng y col, 2013). Se encontró que el clivaje de SNAP25 con toxina botulínica C y E y el clivaje de Syntaxin1 con toxina botulínica C inducen muerte neuronal, y que el agregado exógeno de otras SNAREs homólogas como SNAP23 y Syntaxin2, 3 ó 4 rescata a las neuronas de sufrir degeneración celular. El clivaje debe eliminar casi todo el reservorio endógeno de las citadas SNAREs para que ocurra muerte celular, ya que una pequeña cantidad de ellas presente en la neurona puede prevenir la degeneración celular. Esto se ha comprobado en neuronas cultivadas a partir de ratones knockout para SNAP25, las cuales crecen normalmente pero degeneran y mueren luego de 1 semana en cultivo (Washbourne y col, 2002; Delgado-Martínez y col, 2007). Recientemente se diseñó un ratón doble knockout para Syntaxin1A y 1B el cual presenta letalidad embrionaria y cuyas neuronas tienen el mismo comportamiento en cultivo que aquellas del knockout para SNAP25 (Mishima y col, 2014). En apoyo a los datos exhibidos arriba, se ha demostrado también en neuronas maduras en cultivo que la toxina botulínica C promueve primeramente degeneración neurítica y posteriormente apoptosis (Berliocchi y col, 2005). A la luz de esta evidencia se hace entendible que la alteración de la expresión normal de Syntaxin1 y/o SNAP25 estará afectando procesos celulares necesarios para la viabilidad celular y que, en última instancia, tienen poca (o ninguna) relación con la agregación de membrana en el cono de crecimiento.

La información derivada del primer conjunto de experimentos permitió conocer la distribución espacial y temporal del grupo de SNAREs inicialmente seleccionadas por tener implicancia en procesos de crecimiento neurítico y desarrollo axonal. Algunas de ellas, como VAMP4, VAMP7, Syntaxin6 y SNAP23 presentaron niveles de expresión y localización subcelular que estarían en concordancia con su participación en la adquisición de un fenotipo polarizado. Otras proteínas como SNAP25 y Syntaxin1 mostraron un patrón de expresión temporal que permitió excluirlas del grupo SNAREs candidatas. Estas probablemente sean prescindibles para los eventos de adquisición de polaridad neuronal y tienen injerencia en procesos necesarios para asegurar la viabilidad celular.

Las proteínas VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 participan en el crecimiento axonal inicial en neuronas piramidales de hipocampo en cultivo

El análisis de expresión temporal y distribución espacial sugería que las proteínas VAMP4, VAMP7, SNAP23 y Syntaxin6 podían estar involucradas en el crecimiento inicial del axón y la adquisición de un fenotipo polarizado.

Los estudios de pérdida de función de estas proteínas por silenciamiento de expresión génica demostraron que cuando se alteró el nivel endógeno de algunas SNAREs en neuronas en estadios tempranos de diferenciación estas células fueron incapaces de desarrollar un axón, manteniendo un fenotipo simétrico y quedando por ende arrestadas entre estadios 1 y 2.

Para demostrar que la falta de polarización en estas neuronas se debía a la pérdida de expresión de estas proteínas y no a efectos secundarios del proceso de transfección o silenciamiento inespecífico se recurrió a 2 ensayos; por un lado, el control con el ssRNA y por otro, la recuperación de fenotipo. Así, las neuronas que fueron sometidas a experimentos control y de rescate fenotípico desarrollaron axones de manera normal, alcanzando el estadio 3 de diferenciación. Este fue el caso de VAMP4, SNAP23 y Syntaxin6. En las 3 SNAREs mencionadas se observó que las neuronas que coexpresaron el shRNA SNARE-dirigido y una versión de la proteína a silenciar fueron capaces de desarrollar un axón, el cual mostró ser positivo para el marcador axonal Tau-1. Este resultado claramente indica que la pérdida de polarización que experimentaron las neuronas bajo tratamiento con los shRNA se debe específicamente a la falta de expresión de VAMP4, Syntaxin6 o SNAP23.

Si bien se desconocía hasta el momento que estas proteínas tuvieran un efecto en neuronas creciendo en cultivo, evidencia proveniente de sistemas neuronales y no neuronales podría ayudar a interpretar los resultados observados.

VAMP4 ha sido estudiada en modelos no neuronales y tradicionalmente se la ha descrito como una SNARE necesaria en el tráfico entre organelas intracelulares. Sin embargo, reciente y extensa evidencia aboga a favor del papel de VAMP4 en exocitosis regulada. Se ha encontrado que esta R-SNARE es necesaria para la liberación de gránulos líticos en células NK ("Natural Killer") del sistema inmune (Krzewski y col, 2011), la agregación de membrana en ciertos clones de la línea neuronal PC12 (Cocucci y col, 2008) y la exocitosis de una población de vesículas sinápticas en cultivos de

neuronas hipocampales maduras (Raingo y col, 2012). Además, se ha demostrado que, en conjunto con Syntaxin6, dirige el ciclo de exocitosis y reciclado en una población de vesículas sinápticas pequeñas en cerebro de rata (Kreykenbohm y col, 2002). Quizás el dato más relevante es que VAMP4 y el receptor de IGF-1 se encuentran presentes en grupos de PPVs a las que se encuentra asociada Rab10, una GTPasa implicada en desarrollo axonal (Liu y col, 2013).

Syntaxin6 por su parte, está implicada en múltiples vías endosómicas y endocíticas. Existe extensa evidencia que implica a Syntaxin6 en eventos de tráfico anterógrado y retrógrado, endocitosis y reciclado. Se ha demostrado también que Syntaxin6 es necesaria para el crecimiento neurítico inducido por NGF de células PC12. Se ha sugerido que la inhibición del crecimiento neurítico se debería a la reducción en el envío dirigido de componentes de microdominios de membrana como glicosil fosfatidilinositol (GPI) y gangliósido GM1 desde el complejo de Golgi a membrana plasmática (Kabayama y col, 2008). Dichos microdominios de membrana, también conocidos como balsas lipídicas (*"lipid rafts"*) han sido extensivamente estudiados dado su rol en las vías de señalización mediada por receptores para factores de crecimiento (Pike, 2005). En línea con esto último, se ha demostrado en adipocitos que la activación de la vía IGF-1/IG1-R induce la diferenciación de estas células y que este evento es dependiente de microdominios (Huo y col, 2003; Hong y col, 2004). Es posible entonces que Syntaxin6 esté involucrada en el crecimiento inicial axonal mediando el envío de PPVs al cono de crecimiento conteniendo componentes esenciales para el ensamblaje/funcionamiento de los mencionados microdominios, e incluso al mismo receptor de IGF-1.

Adicionalmente, Syntaxin6 podría mediar otros eventos implicados en la polarización neuronal. Por ejemplo, se conoce que Syntaxin6 es esencial para la migración de células endoteliales ya que es responsable de la correcta expresión de FAK (kinasa de adhesión focal) y funciona en el reciclado de integrinas (Zhang y col, 2008; Tiwari y col, 2011). Es también necesaria para mediar la traslocación del receptor de EGF desde membrana plasmática al núcleo celular en células HeLa, y así desencadenar eventos de señalización celular (Du y col, 2014). Por tanto, Syntaxin6 podría ser requerida en distintas vías de tráfico en la neurona, ya sea mediando la adhesión celular o eventos de señalización celular de largo alcance y la perturbación de estos procesos evitaría que la neurona adquiriera un fenotipo polarizado.

En el caso de SNAP23 ha sido implicada en procesos de exocitosis en diferentes modelos no neuronales (Martin-Martin y col, 2000; Feldmann y col, 2009; Chat y col, 2010; Skalski y col, 2010). Es bien conocido su papel en la exocitosis regulada de vesículas que contienen al transportador de glucosa GLUT4 en respuesta a estímulo con insulina en adipocitos (Rea y col, 1998; Kawanishi y col, 2000; Jewell y col, 2010). Este sistema no neuronal de exocitosis regulada tiene la particularidad de exhibir gran similitud con la exocitosis de PPVs en respuesta a IGF-1 en conos de crecimiento e inserción del receptor de IGF-1 en el plasmalema. De hecho, ambos sistemas comparten vías de señalización desencadenadas por estimulación y activación de su receptor, moléculas y complejos involucrados en la inserción a membrana (Chiang y col., 2002; Dupraz y col, 2009; Jewell y col, 2010). Es probable entonces que SNAP23 pueda estar implicada en la agregación de membrana al cono de crecimiento y en la inserción del receptor de IGF-1 a membrana plasmática. Se ha sugerido que SNAP23 juega un rol crítico en estadios tempranos de desarrollo embrionario. En relación a esto se ha reportado que ratones knockout para esta SNARE tienen mortalidad temprana durante la gestación (entre 3 a 4 días de vida intrauterina), lo cual pone de manifiesto la importancia de esta SNARE en etapas del desarrollo de un organismo (Suh y col, 2011). En el experimento de pérdida de función de VAMP7 el crecimiento axonal inicial no es afectado. De hecho, las neuronas en estadios tempranos de diferenciación pudieron desarrollar proceso de tipo axonal, de manera similar a lo que ocurrió con aquellas células que fueron sometidas a experimentos control. Varias evidencias permiten generar una explicación posible a los efectos de pérdida de función descritos en la bibliografía y lo observado en este trabajo. Alguno de los ensayos que reportaron los efectos de VAMP7 sobre el crecimiento neurítico han sido realizados en base a la sobreexpresión de versiones dominantes negativas y/o constitutivamente activas de esta R-SNARE en cultivos neuronales (Martinez-Arca y col, 2000; Martinez-Arca y col, 2001). En el caso de las versiones dominantes negativas, se ha descrito y comprobado que tienen claros efectos apoptóticos sobre las neuronas. De hecho, en los estudios citados estas construcciones solo pudieron ser expresadas en cultivo agregando previamente inhibidores de apoptosis. A pesar de ello, las neuronas transfectadas presentan axones que cumplen con el criterio morfológico arriba mencionado. Por otro lado, las versiones constitutivamente activas de VAMP7 carecen del extremo amino terminal, denominado dominio Longin. Este segmento se ha descrito que se encuentra

en conformación plegada sobre VAMP7 e inhibe su asociación con otras SNAREs (Vivona y col, 2010). Además, posee una señal de localización a endosomas y lisosomas. (Martinez-Arca y col, 2003). Cuando se elimina el dominio Longin de VAMP7 se obtiene una versión truncada de esta SNARE que es prácticamente idéntica a VAMP2/Synaptobrevin y que generalmente se acumula en la membrana plasmática del cono de crecimiento. Se ha demostrado que la sobreexpresión de VAMP2 por medio de plásmidos en cultivo tiene efectos positivos sobre la elongación axonal (Shirasu y col, 2000). Otros trabajos se valen de experimentos de pérdida de función mediante siRNA para demostrar el rol de VAMP7 en crecimiento neurítico pero no utilizan experimentos de recuperación de fenotipo para demostrar un efecto específico del siRNA (Alberts y col, 2002). Un detalle no menor es que se han diseñado 2 líneas de ratones knockout para VAMP7 y ambas presentan desarrollo cerebral normal, con localización correcta de las proteínas "carga" de VAMP7. En cultivo las neuronas exhiben axones sensiblemente más cortos, las neuronas están indudablemente polarizadas (Sato y col, 2011; Danglot y col, 2012). Es probable que en los animales knockout la falta de esta VAMP7 sea suplida por VAMP4, proteína con la cual presentan una gran homología.

Sin duda alguna VAMP7 tiene implicancia en el desarrollo neuronal al controlar el tráfico de moléculas de adhesión celular y agregación de membrana al cono de crecimiento como lo demuestra un extenso cuerpo de evidencia (Alberts y col, 2003; Alberts y col, 2006). Sin embargo, su rol parece ser prominente en elongación neurítica más que en crecimiento inicial axonal.

Las SNAREs VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 participan en la agregación de membrana en los conos de crecimiento neuronales disparada por la activación del receptor de IGF-1

Los datos obtenidos gracias a los ensayos de pérdida de función denotaban que 3 de las 4 SNAREs tenían efectos significativos sobre el crecimiento inicial axonal. Dado que el receptor de IGF-1 está directamente implicado en la adquisición de polaridad neuronal surgió el interrogante si las SNAREs analizadas podían estar relacionadas en algún nivel con el mencionado receptor.

Los resultados provenientes de los experimentos de inmunoprecipitación de PPVs en

GCPs estimulados con IGF-1 dan cuenta de que las SNAREs VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 son capaces de asociarse/interaccionar entre sí y/o con las vesículas que contienen el receptor de IGF-1 como consecuencia de la acción del citado factor trófico. Sumado a esto, los ensayos de inserción polarizada del receptor de IGF-1 activable aportaron evidencia del requerimiento de las SNAREs estudiadas en la externalización polarizada del receptor de IGF-1 en estadio 2 y, en consecuencia de su importancia en el crecimiento axonal inicial en neuronas en cultivo.

La interpretación más directa a los resultados obtenidos es que VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 formen parte de un complejo SNARE que permita la fusión de PPVs con el plasmalema del cono de crecimiento y la consecuente inserción del receptor de IGF-1R en la membrana plasmática. Un punto a favor de este supuesto es que estas 3 SNAREs están implicadas en la exocitosis expansiva en ciertos clones de la línea celular PC12 que carecen de las SNAREs necesarias para neurosecreción, es decir, VAMP2, Syntaxin1 y SNAP25 (Cocucci y col, 2008). Esta situación podría ser semejante a la que atraviesa la neurona en desarrollo durante las primeras 24 horas de cultivo, donde SNAP25 y Syntaxin1 están en concentraciones extremadamente bajas como para dirigir eventos masivos y sostenidos de fusión y VAMP2 está presente pero parece no ser requerida para el crecimiento neurítico inicial.

Es de destacar, como fue explicado en la sección **Introducción** de este trabajo, que la formación de complejos SNAREs estables depende del ensamblaje de haces helicoidales compuestos por 1 hélice R y 3 hélices Q: Qa, Qb y Qc. Dado que Syntaxin6 posee una hélice Qc (a diferencia de la mayoría de las Syntaxins, que tienen una hélice Qa) al igual que SNAP23, es poco probable que tenga lugar la formación de un complejo SNARE estable (Cocucci y col, 2008). No obstante, la formación de complejos SNAREs con estas características han sido descritos. Uno de ellos es denominado configuración de SNAREs unitarias (Unitary-SNARE Configuration) pues no hay preensamblaje de complejos Qabc en la membrana aceptora. El tipo de exocitosis resultante de esta interacción entre SNAREs es relativamente lento, capaz de mediar eventos de fusión en el orden de 1-100 segundos pero tiene la ventaja de poder promover una intensiva movilización de vesículas desde el interior celular a membrana plasmática (Kasai y col, 2012). Además de ocurrir en células no neuronales este tipo de exocitosis es posible esté presente en neuronas (Pickett y Edwardson, 2006). El complejo VAMP4/Syntaxin6/SNAP23 es probable que opere bajo esta configuración de

baja estabilidad. Curiosamente, la exocitosis de vesículas que contienen al transportador GLUT4 en respuesta al estímulo con insulina es dirigida principalmente por SNAREs (siendo SNAP23 una de ellas) que interactúan en la mencionada conformación. Como se mencionó con anterioridad, este sistema no neuronal de exocitosis regulada comparte similitudes con la exocitosis de PPVs en respuesta a IGF-1 en neuronas, de ahí la relevancia de esta última observación. Se ha propuesto que SNAP23, la cual dirige la exocitosis de vesículas en varios tipos de células no neuronales (neutrófilos, mastocitos, células β pancreáticas, adipocitos) probablemente promueva eventos de exocitosis sostenida en el tiempo actuando en complejos como el antes descrito (Kasai y col, 2012). El hecho de que la exocitosis de PPVs regulada por IGF-1 permita la agregación de grandes secciones de plasmalema y que un porcentaje considerable de los eventos de fusión ocurran en el lapso de segundos (Dupraz y col, 2009) provee soporte adicional al modelo sugerido.

Evidencia adicional que apoya la formación de complejos entre las mencionadas SNAREs proviene de sistemas no neuronales que presentan un fenotipo polarizado y que son capaces de sufrir ciclos de crecimiento y diferenciación. Este es el caso de las células epiteliales de las glándulas mamarias durante el período de lactancia. En ellas, la exocitosis regulada de ciertas moléculas componentes de la leche como la caseína dependería de la asociación de VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 (Chat y col, 2010).

Otra posible explicación a los resultados observados es que las SNAREs estudiadas estén involucradas en el tráfico y/o exocitosis de las PPVs que contienen al receptor de IGF-1 pero no participen necesariamente en el mismo complejo de fusión. Esta consideración es válida ya que en los experimentos de inmunoprecipitación se trabajó con estructuras membranosas provenientes de conos de crecimientos axonales y no fue posible determinar si las proteínas inmunoprecipitadas (β gc o Syntaxin6) estaban asociadas a PPVs, a membrana plasmática o vesículas de reciclaje. Por esta razón se analizarán todos los posibles escenarios en los cuales las citadas interacciones podrían tener lugar.

En el caso de VAMP4 la posibilidad de que esta R-SNARE esté presente en las PPVs que transportan al receptor de IGF-1 y promueva así su externalización es plausible ya que VAMP4 es necesaria para la agregación de membrana y el concomitante crecimiento neurítico en clones de células PC12 (Cocucci y col, 2008) y dirige la exocitosis de una subpoblación de vesículas sinápticas en neuronas hipocámpales

adultas (Raingo y col, 2012). Es importante notar que VAMP4 posee un motivo dileucina rodeado por 2 regiones ácidas que le permite ser reciclada activamente desde la superficie celular hacia el TGN, donde ella se encuentra concentrada (Hinnery y col, 2003; Zeng y col, 2003; Tran y col, 2007). Esto sería crucial en términos de mantener un constante suministro de PPVs VAMP4-positivas desde TGN a membrana plasmática durante situaciones de agregación de grandes áreas de plasmalema sostenida en el tiempo. VAMP4 también ha sido relacionada con exocitosis regulada y traslocación de receptores de membrana en sistemas no neuronales. En células del músculo cardíaco, por ejemplo, se ha descrito que la estimulación con insulina promueve la traslocación a membrana del transportador de ácidos grasos de cadena larga CD36, fenómeno que es dependiente de VAMP4. El tráfico y exocitosis regulada de las vesículas que contienen a CD36 es similar a la del transportador GLUT4 (Schwenk y col, 2010; Steinbusch y col, 2011).

Alternativamente, VAMP4 podría ser necesaria para asegurar que las PPVs se agreguen a membrana en momentos y localizaciones específicas y no ocurra fusión prematura. Se ha descrito que VAMP4 es esencial para la maduración de granulos neurosecretorios en ciertos tipos celulares, haciendo que éstos se vuelvan competentes para sufrir exocitosis regulada. Los granulos inmaduros presentan Synaptotagmin 4, un inhibidor de la exocitosis regulada que es removido por VAMP4 durante el tráfico a membrana plasmática (Eaton y col, 2000). Es interesante notar que en cultivos de neuronas de hipocampo Synaptotagmin 4 se localiza principalmente en el complejo de Golgi y en las neuritas durante estadios tempranos (Ibata y col, 2000), similar a la distribución observada para VAMP4. De modo que una situación donde VAMP4 controle la competencia de las PPVs para responder o no a diferentes estímulos podría tener lugar en los conos de crecimiento de neuronas en desarrollo.

En el caso de Syntaxin6 la asociación con el receptor de IGF-1 y su externalización podrían ser resultado de interacciones en más de un paso del tráfico de membranas a nivel del cono de crecimiento. Por ejemplo, se ha determinado recientemente que el motor microtubular KIF5C transporta a Syntaxin6 hacia el cono de crecimiento (datos de nuestro laboratorio no publicados). Se conoce que KIF5C presenta una localización subcelular axonal específica, se acumula en la neurita que será el futuro axón y ha sido vinculada a la axogénesis (Jacobson y col, 2006).

Por otro lado, en adipocitos y células musculares ha sido descrito que Syntaxin6 regula

el ciclo de exocitosis, endocitosis/reciclado y re-exocitosis del transportador GLUT4 en respuesta al estímulo con insulina (Perera y col, 2003; Jung y col, 2012, Foley y Klip, 2014). En relación a esto último existe evidencia de que el receptor de IGF-1 bajo estimulación con su ligando sufre un ciclo de externalización, endocitosis y re-exocitosis en diferentes tipos celulares. Particularmente la endocitosis y el reciclado del receptor revisten gran importancia ya que son necesarios para la activación sostenida y a largo plazo de la vía PI3K/Akt (Romanelli y col, 2007). Este tráfico es altamente dinámico ya que 30 minutos luego de la estimulación un 86% del receptor inicialmente presente en membrana plasmática ha sido internalizado, y al cabo de 2 horas el 90% del receptor internalizado ha sido reinsertado en el plasmalema. Dado que se conoce que los GCPs cuentan con maquinaria de síntesis, transcripción y tráfico de membranas (Nozumi y col, 2010; Estrada-Bernal y col, 2012) y ya que ellos retienen la capacidad de sufrir exocitosis regulada, probablemente posean la capacidad de realizar endocitosis. Desde esta perspectiva es posible argumentar que parte de la interacción medida por métodos bioquímicos en GCPs estimulados sean resultado de la suma de fenómenos de exocitosis y endocitosis rápida. En relación con esto último, se ha demostrado que la endocitosis del receptor de IGF-1 (luego de su activación y fosforilación) es mediada por SNAP29 (también conocida como GS32), un miembro de la familia SNAP25 implicado en controlar el desensamblaje de complejos SNAREs y en procesos endocíticos (Rotem-Yehudar y col, 2001). Se conoce que una de las SNAREs que se asocian con preferencia a SNAP29 es Syntaxin6 (Wong y col, 1999), por lo cual es posible que ésta pueda estar implicada en procesos de endocitosis del IGF-1R como se sugirió más arriba.

Más allá del rol preciso (directo o indirecto) que juegan estas SNAREs en la exocitosis del receptor de IGF-1 lo que resulta realmente novedoso es la identificación de proteínas SNAREs regulando el tráfico y la inserción de PPVs que contienen el receptor de IGF-1 a la membrana plasmática del cono de crecimiento.

VAMP4 y VAMP7 definen 2 subpoblaciones de PPVs diferentes

La evidencia aportada por este trabajo de tesis permitió determinar que el receptor de IGF-1 es transportado a la membrana del cono de crecimiento en PPVs VAMP4-positivas. Por otra parte, VAMP7 mostró no estar asociada a dicho receptor. Surgió

entonces la interrogante sobre si VAMP4 y VAMP7 estarían presentes en diferentes poblaciones vesiculares en el cono de crecimiento a estadios tempranos de polarización. Los resultados aportados por el análisis de conos de crecimiento a alta magnificación y colocalización permitieron conocer que VAMP4 y VAMP7 estarían espacialmente separadas (Figura 18). Este resultado está en concordancia con evidencia disponible de estudios anteriores. El primer indicio proviene del estudio de la estructura de ambas R-SNAREs. Tanto VAMP4 como VAMP7 portan señales de localización a compartimientos celulares específicos. VAMP4 posee un motivo dileucina que le permite ser reciclada activamente a TGN a través de la proteína adaptadora AP1 (Hinnens y col, 2003), mientras que VAMP7 posee en su dominio Longin una señal de localización a endosomas, hacia donde es transportada mediante la proteína adaptadora AP3 (Martinez-Arca y col, 2003).

Por otro lado se conoce que ciertas líneas neuronales como PC12 pueden expresar 2 formas de crecimiento, una mediada por VAMP7 y otra mediada por VAMP4. Se había sugerido que ambas formas de crecimiento también estarían presentes en neuronas donde el crecimiento mediado por VAMP4 podría predominar en las etapas iniciales del desarrollo mientras que el crecimiento dependiente de VAMP7 toma predominancia en etapas tardías. La existencia de 2 formas diferentes de crecimiento neurítico podría ser más eficiente para hacer frente a las necesidades celulares en distintas etapas del desarrollo neuronal (D'Alessandro y col, 2010).

Recientemente se ha descrito que VAMP4 y VAMP7 definen poblaciones vesiculares diferentes en las sinapsis de neuronas de hipocampo en cultivo, donde participan en fenómenos de liberación asincrónica de neurotransmisores. En ambos casos, estas vesículas forman complejos SNAREs con Syntaxin1 y SNAP25, al igual que lo hace VAMP2 (Hua y col, 2011; Raingo y col, 2012; Ramirez y Kavalali, 2012).

Por último, se ha descrito que VAMP7 puede sufrir exocitosis ante estímulos con IGF-1 en neuronas en desarrollo (Burgo y col, 2012). En concordancia con este reporte, resultados de nuestro laboratorio han demostrado el efecto de estimulación con IGF-1 sobre la expresión de LI-CAM en conos de crecimiento y la agregación de membrana para la elongación axonal (Dupraz y col, 2009).

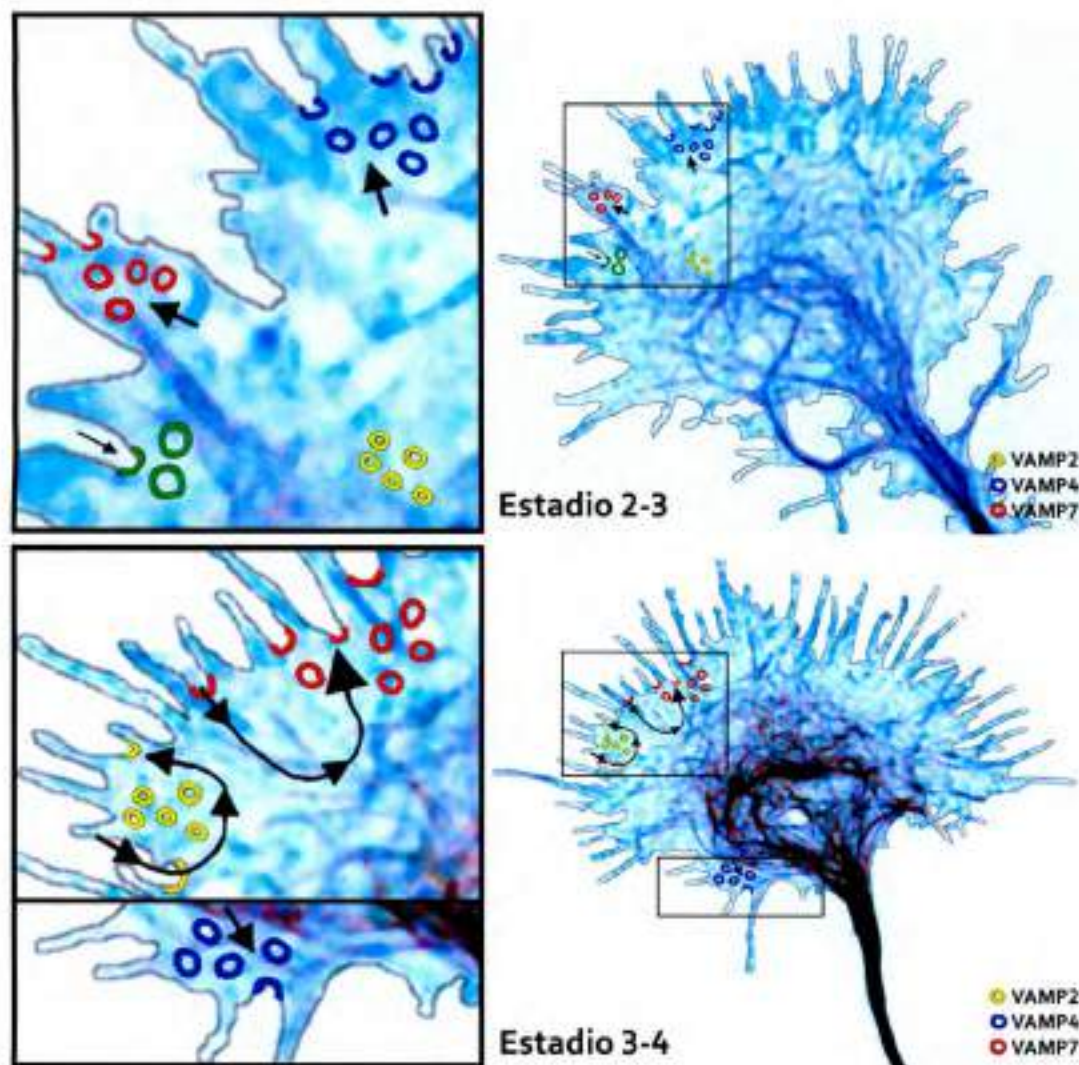


Figura 18. Tráfico de membranas en conos de crecimiento en cultivo de neuronas en estadios de desarrollo temprano y posteriores. El modelo de arriba ilustra la estructura de conos de crecimiento en estadio 2-3 de crecimiento neurítico. Las vesículas azules son los PPVs VAMP4-positivas agregando membrana al plasmalema (flecha gruesa). Las vesículas rojas son los PPVs VAMP7-positivas sufriendo exocitosis (flecha gruesa). Las vesículas VAMP2-positivas (amarillas) contienen receptores para Semaforina 3A y son necesarias para el guiado axonal. Las vesículas verdes pertenecen a procesos de endocitosis constitutiva. Su flecha es más pequeña que la de las vesículas exocíticas ya que es necesaria una prevalencia de la exocitosis para que las neuritas crezcan. El modelo de abajo ilustra un cono de crecimiento similar perteneciente a un axón en estadio 3-4. Las vesículas VAMP7-positivas aportan al crecimiento en esta etapa, aunque ellas también son activamente recicladas. La flecha de exocitosis es por tanto más gruesa que la de endocitosis. En contraste, las vesículas VAMP2-positivas involucradas en el guiado axonal no contribuyen a la expansión de membrana ya que ellas presentan niveles similares de exocitosis y endocitosis. Las vesículas VAMP4-positivas probablemente sigan agregando membrana al plasmalema para que la elongación axonal tenga lugar (basado en D'Alessandro y col, 2010).

La evidencia mostrada, en conjunto con los resultados aportados por este trabajo resultan sumamente interesantes ya que dan cuenta de, al menos, 2 poblaciones vesiculares con funciones complementarias que estarían presentes a lo largo de toda la vida de la neurona, pero cuya función varía (crecimiento/elongación axonal o liberación de neurotransmisores) según el estado de desarrollo celular.

A la vista de estos hallazgos se vuelve evidente el rol de VAMP4 en la formación y mantenimiento de redes neuronales. De hecho, trabajos recientes resaltan que VAMP4 es crítica para las funciones cerebrales y es requerida para cambios adaptativos en el cerebro, mediando la expresión de formas plasticidad sináptica a corto y largo plazo que se cree son la base del aprendizaje y la memoria. Tal es su importancia que la alteración de la expresión de VAMP4 está implicada en varias patologías. Una de ellas es el síndrome de Coffin–Lowry (CLS), una forma de retardo mental caracterizada por deficiencia en el aprendizaje y consolidación de la memoria. Se ha demostrado que el gen que codifica la proteína Rsk2 (Ribosomal s6 kinase 2) está implicado en el desarrollo de esta enfermedad y actúa como regulador negativo del crecimiento axonal. De hecho, en animales modelos knockout para Rsk2 la supervivencia de neuronas deficientes en Rsk2 no está reducida, sino que estas células desarrollan axones significativamente más largos. Además del crecimiento axonal desregulado se observó en el cerebro de estos animales un incremento significativo en la expresión de VAMP4 e IGF-1 a lo largo de todo el hipocampo, lo cual es llamativo ya que ambas proteínas parecerían además funcionar en la misma vía biológica (Fischer y col, 2009; Mehmood y col, 2011).

Por otro lado, se ha descrito que ocurren alteraciones en la expresión de VAMP4 en estadios tempranos de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Alieva y col, 2014), en modelos animales con predisposición al alcoholismo (Wolstenholme y col, 2011) y en individuos con tendencias suicidas (Wasserman y col, 2005), lo cual pone de relieve la importancia de esta SNARE en el normal funcionamiento del cerebro y del sistema nervioso central e incluso en el desarrollo de patrones de comportamiento.

Conclusiones

Conclusiones

La aceptación de la exocitosis regulada como mecanismo general que promueve la adquisición de polaridad en la neurona ha permitido un avance significativo en el estudio de las vesículas precursoras de plasmalema. Sin embargo, al momento existen cuestiones fundamentales que no han sido del todo resueltas. Por ejemplo, poco se conoce acerca de la composición bioquímica de estas vesículas, como ellas son específicamente dirigidas e insertadas en el cono de crecimiento o que factores están implicados en la regulación de su exocitosis. Encontrar respuesta a estas interrogantes ha sido el motor que ha impulsado los estudios que han surgido de nuestro grupo de investigación.

En este caso particular, las evidencias aportadas por este trabajo de tesis han servido para identificar las proteínas SNAREs específicas implicadas en la regulación del crecimiento inicial de axones y el establecimiento de polaridad. Por otra parte, las mismas están involucradas en la inserción del receptor de IGF-1 en la membrana plasmática del cono de crecimiento en neuronas en cultivo.

Específicamente se demostró que VAMP4, Syntaxin6 y SNAP23 son expresadas tempranamente en cultivo primario de neuronas de hipocampo y que ellas se encuentran enriquecidas en el axón en desarrollo y son requeridas para el establecimiento de polaridad neuronal.

Además, se presentó evidencia de que las mencionadas SNAREs son capaces de responder al estímulo de IGF-1 e interactuar con las PPVs conteniendo el receptor de este factor de crecimiento. Es decir, participarían en la exocitosis de las PPVs IGF-1R positivas.

Finalmente, se describieron 2 poblaciones vesiculares diferentes que se encuentran presentes en conos de crecimiento de neuronas en desarrollo, definidas por la presencia de VAMP4 o VAMP7.

Otro grupo de SNAREs parecerían ser necesarias para la elongación axonal en estadios posteriores de diferenciación (VAMP7, Syntaxin1 and SNAP25) y por ende no serían esenciales en la regulación del crecimiento neurítico inicial y el establecimiento de polaridad.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata

Para los cultivos de neuronas piramidales de hipocampo, se utilizaron embriones de rata de 18 días de vida intrauterina. Las ratas preñadas fueron anestesiadas con CO₂ y se les practicó una cesárea. Los embriones fueron trasladados a una campana de flujo laminar donde fueron decapitados. Se extrajeron los cerebros y se los colocó en cápsulas de Petri conteniendo solución estéril de Hanks (HEPES 10 mM; NaCl 4 g; KCl 200 mg; glucosa 500 mg; KH₂PO₄ 30 mg; NA₂HPO₄ 23,7 mg; H₂O esp 500 ml, pH: 7.4) a 4°C. Los hipocampos se extrajeron mediante microcirugía bajo lupa estereoscópica Carl Zeiss y se incubaron en solución de tripsina al 0,25% a 37°C durante 15 minutos para digerir la matriz de adhesión intercelular. Luego fueron lavados 3 veces durante 5 minutos cada vez con solución de Hanks a 4 °C y colocados en tubo plástico estéril de 15 ml conteniendo 3 ml medio de cultivo DMEM/HS10% (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco®– suplementado con suero de caballo al 10%) a 37°C. En los casos en los que las células fueron destinadas a experimentos de transfección en suspensión el medio DMEM/HS10% fue reemplazado por medio de transfección OPTIMEM (Gibco). Los hipocampos fueron disociados utilizando pipetas Pasteur de vidrio de diámetros decrecientes hasta lograr una suspensión homogénea. Las células disociadas fueron sembradas sobre discos de vidrio-cubreobjetos previamente cubiertos con poli-L-lisina (1mg/ml en buffer borato pH: 8; el exceso de poli-L-lisina es eliminado con 4-5 lavados de agua miliQ) con una densidad aproximada de unas 5000 células/cm² y mantenidas en medio de cultivo DMEM/HS10%. Los cultivos fueron mantenidos durante 1-2 horas en incubador a 37°C, CO₂ al 5% y humedad constante, lo que les permite asociarse a los cubreobjetos con poli-L-lisina. Una vez adheridas las neuronas, el medio DMEM/HS10% fue sustituido por la mezcla N2-Neurobasal (suplementos B27 2%v/v y N2 1%v/v, piruvato 0.1mM, glutamina 0,2mM y albumina 0,1%p/v. disueltos en medio definido N2 – Gibco® –). Para permitir la supervivencia y el crecimiento neuronal, este medio de cultivo contiene niveles altos de insulina, suficiente para estimular los receptores de insulina como así también los receptores de IGF-1.

En algunos experimentos (donde se especifica) las células fueron incubadas con mezcla N2-Neurobasal con bajo contenido de insulina; ésta se encuentra en cantidad suficiente

para permitir el crecimiento celular pero no para promover la activación de receptores de IGF-1.

Inmunofluorescencia

Las neuronas creciendo en cultivo *in vitro* fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos cada vez con buffer fosfato salino (PBS: NaCl 4,25 gr; Na₂HPO₄, 6,4 gr; NaH₂PO₄ 1,01 gr; H₂O csp 500 ml) a 37 °C. Luego los cultivos fueron fijados con solución de paraformaldehído/sacarosa al 4% (p/v) en PBS a 37 °C. El fijador actuó durante 20-30 minutos a temperatura ambiente, entonces las células fueron lavadas 3 veces por 5 minutos cada vez con PBS, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 6 minutos y lavadas nuevamente con PBS (3 veces por 5 minutos). Los discos de vidrio con las células adheridas fueron trasladados a cámara húmeda donde se los cubrió con una solución bloqueante (Suero de caballo al 5% y Tritón X-100 al 0,05% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente con el fin de cubrir epítopes inespecíficos presentes en la muestra. Posteriormente las células fueron incubadas con el/los anticuerpo/s primario/s durante 1 a 3 horas a temperatura ambiente o 12 horas a 4 °C y lavadas con PBS (3 veces por 5 minutos).

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

Anticuerpos primarios

-Anticuerpo policlonal anti- VAMP2 producido en conejo (Cat. ab70222, ABCAM). Dilución 1:1000 IF y 1:2000 WB.

-Anticuerpo policlonal anti- VAMP4 producido en conejo (Cat. 136 002, Synaptic Systems). Dilución 1:100 IF, 1:250 WB y 1:150 IP.

-Anticuerpo monoclonal anti- VAMP7/SYBL1 [clón 158.2] producido en ratón (Cat. ab36195, ABCAM). Dilución 1:100 IF, 1:250 WB y 1:150 IP.

-Anticuerpo monoclonal anti- Syntaxin1 [clón 78.2] producido en ratón (Cat. 110 011, Synaptic Systems). Dilución 1:150 IF y 1:400 WB.

- Anticuerpo policlonal anti- Syntaxin6 producido en conejo (Cat. 110 062, Synaptic Systems). Dilución 1:150 IF, 1:600 WB y 1:250 IP.
- Anticuerpo policlonal anti- SNAP23 producido en ratón (Cat. 111 202, Synaptic Systems). Dilución 1:75 IF y 1:200 WB.
- Anticuerpo monoclonal anti- SNAP25 [clón SP12] producido en ratón (Cat. VAM-SV012E, Stress Gen). Dilución 1:75 IF 1:200 WB.
- Anticuerpo policlonal anti- β gc producido en conejo (Quiroga y col., 1995). Dilución 1:75 IF, 1:200 WB y 1:150 IP.
- Anticuerpo policlonal anti- β III tubulina III producido en conejo (Cat. T2200, Sigma). 1:2000 IF y 1:4000 WB.
- Anticuerpo monoclonal anti- Tau1 [clon PC1C6] producido en ratón (Cat. MAB3420, Millipore). Dilución 1:400 IF.
- Anticuerpo monoclonal anti- tubulina tirosinada [clon TUB-IA2] producido en ratón (Cat. T-9028, Sigma). Dilución 1:2000 IF.
- Anticuerpo monoclonal anti- alfa tubulina [clon DM A1] producido en ratón (Cat. MA1-25052, Thermo Scientific). Dilución 1:2000 WB.
- Anticuerpo monoclonal anti- fosfoIGF-1 Receptor (Y980) producido en conejo (Cat. C14A11, Cell Signalling). Dilución 1:25 IF.
- Anticuerpo monoclonal anti-HA [clón 3F10] producido en rata (Cat. 11802600, Roche) dilución 1:400 IF.

Anticuerpos secundarios

- Anticuerpo Alexa Fluor 488 anti- IgG de conejo producido en cabra (Cat. A21441, Molecular Probes). Dilución 1:1000 IF.
- Anticuerpo Alexa Fluor 488 anti- IgG de ratón producido en cabra (Cat. A11001, Molecular Probes). Dilución 1:1000 IF.

Anticuerpo Alexa Fluor 546 anti- IgG de conejo producido en cabra (Cat. A11035, Molecular Probes). Dilución 1:1000 IF.

Anticuerpo Alexa Fluor 568 anti- IgG de ratón producido en cabra (Cat. A11031, Molecular Probes). Dilución 1:1000 IF.

Anticuerpo Alexa Fluor 633 anti- IgG de conejo producido en cabra (Cat. A21086, Molecular Probes). Dilución 1:1000 IF.

Anticuerpo Alexa Fluor 633 anti- IgG de rata producido en cabra (Cat. A21094, Molecular Probes). Dilución 1:1000 IF.

Anticuerpo Alexa Fluor 633 anti- IgG de ratón producido en cabra (Cat. A21052, Molecular Probes). Dilución 1:1000 IF.

Anticuerpo Odyssey IRdye CW 800 anti- IgG de conejo producido en cabra (Cat. 926-32210, LI-COR). Dilución 1:15000 WB.

Anticuerpo Odyssey IRdye CW 800 anti- IgG de ratón producido en cabra (Cat. 926-32210, LI-COR). Dilución 1:15000 WB.

Para el registro de las imágenes confocales se utilizó un microscopio confocal espectral FluoView® FV1000 con objetivos 60X (AN 1.42) y 100X (AN 1.4). Las fotografías fueron procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop CS. El cálculo del Índice de Polaridad fue efectuado con el software Image J. El análisis de deconvolución y la cuantificación de las imágenes resultantes fue realizada utilizando el software Olympus cellSens versión 1.9.

Transfección

Transfección convencional: Este protocolo es utilizado en células en cultivo adheridas al sustrato (líneas o cultivo primario). Se utilizaron placas de plástico de 3,5 mm con alta densidad de células (~60-75%).

Se preparó la solución de transfección mezclando 250 µl de medio de transfección Optimem a 37 °C con 6-7 µl de Lipofectamina 2000 (incubados durante 5 minutos) y agregando posteriormente 50 µl de Optimem a 37 °C con una cantidad de DNA

determinada según el experimento (entre 1,5 a 4 μg). Se incubó la solución resultante durante 20-30 minutos a temperatura ambiente, luego se agregó 700 μl de Optimem a 37 °C y acto seguido se procedió a reemplazar con este medio de transfección el medio definido en el que se encontraban creciendo las células. El proceso de transfección tuvo una duración de entre 60 a 90 minutos. Posteriormente se reemplazó el medio transfectante por medio de cultivo a 37 °C y se permitió la expresión de las diferentes construcciones por un lapso de 24-36 horas.

Transfección en suspensión: Este protocolo fue utilizado para células aún no adheridas al sustrato y se realizó en paralelo al cultivo primario de neuronas piramidales, iniciándose generalmente al momento de tripsinizar los hipocampos de ratas E18. Se preparó la solución de transfección mezclando 50 μl de medio de transfección Optimem a 37 °C con 1,2 μl de Lipofectamina 2000 (incubados durante 5 minutos) y agregando posteriormente 30 μl de Optimem a 37 °C con una cantidad de DNA determinada según el experimento (entre 0,4 a 1,2 μg). Se incubó la solución resultante durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Paralelamente se disgregaron los hipocampos sometidos a acción de la tripsina en medio de transfección Optimem (se agregó 1 ml de éste por cada 20 hipocampos obtenidos) y se determinó en cámara de Neubauer la cantidad de células presentes en la suspensión celular. Se agregó el equivalente a 50.000-70.000 células (~15-20 μl) al complejo Optimem/Lipofectamina/DNA y acto seguido se depositó esta mezcla directamente sobre los vidrios tratados con poli-L-lisina, formando una gota sobre los mismos. Se permitió que la reacción de transfección tuviera lugar durante 60 a 90 minutos, luego que las células se adhirieron al sustrato se retiró la gota de complejo transfectante y se reemplazó con medio definido N2-neurobasal. Una vez finalizada la transfección (tiempo cero de cultivo primario) se permitió la expresión de las diferentes construcciones por un lapso de 24-36 horas.

Biología Molecular: preparación de construcciones

Construcción de los vectores para expresión de shRNAs: para generar los diferentes shRNAs se utilizó un vector comercial denominado pSuperNeo+GFP (Oligoengine). Éste fue digerido con las enzimas de restricción *BglIII* y *HindIII* (Promega). El plásmido en esta configuración abierta fue utilizado para insertar diferentes secuencias de oligonucleótidos. Éstos fueron previamente diseñados en base a algoritmos y programas

específicos y sintetizados comercialmente (GBT Oligos). Es importante destacar que cada oligonucleótido consta de una secuencia complementaria (no mostrada) diseñada de tal manera que al hibridar ambas se formen extremos que empalman con los sitios de restricción *BglIII* y *HindIII* del vector abierto. Dicha hibridación entre pares de secuencias complementarias se logra mediante gradientes de temperatura que pueden programarse en una PCR (por ejemplo). Las secuencias utilizadas se detallan a continuación:

VAMP4: 5' *gatccccggtggacgaagttattgatttcaagagaaatcaataacttegtccaccctttta* 3'

VAMP4': 5' *gatccccgaatattaccaaggttaatttcaagagaaattaccttggaatattctttta* 3'

Syntaxin6: 5' *gatccccgcgactgaattgagcataattcaagagattatgctcaattcagtcgctttta* 3'

Syntaxin6': 5' *gatccccgaacaatctccgcagcataattcaagagatagctgctggagattgtctttta* 3'

SNAP23: 5' *gatccccgaaggcatggaccanaataattcaagagattatttggtccatgcctctttta* 3'

SNAP23': 5' *gatccccgaatcaagactatcactattcaagagatagtgatagcttgattctttta* 3'

VAMP7: 5' *gatccccgaagcatcactccgagaatttcaagagaaattctcggagtgatctctttta* 3'

VAMP7': 5' *gatccccgacagcagattgtgtatcttcaagagaaagatacacaaactctgctctttta* 3'

ssRNA: 5' *gatccccgtgtatgattaggtaacggtcaagagaccgttacctaatacatacactttta* 3'

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

Obtención y subclonado de construcciones utilizadas para experimentos de recuperación de fenotipo: en principio las construcciones codificando versiones nativas de las diferentes SNAREs utilizadas fueron adquiridas de diferentes grupos de investigación. El Dr. Marc Coppelino donó generosamente la construcción VAMP4-GFP (citada en Skalski y col, 2010); la Dra. Sima Lev tuvo el mismo gesto y donó la construcción HA-Syntaxin6 (descrita en Laufman y col, 2010). La Dra. Giulia Baldini por su parte aportó el constructo SNAP23-GFP (citado en Chierigatti y col, 2004). La construcción HA-Syntaxin6 fue utilizada directamente para los experimentos de rescate fenotípico, no así los plásmidos codificando VAMP4, VAMP7 y SNAP23. Ellos debieron previamente ser subclonados en un vector que expresa el epítipo HA (hemaglutinina), denominado pCMV-HA (Clontech).

En el caso de VAMP4 el subclonado en el vector pCMV-HA fue realizado por digestión del constructo VAMP4-GFP con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, lo cual resultó en la liberación del fragmento de interés. Posteriormente éste fue ligado con el vector pCMV-HA abierto en *EcoRI* y *BglII*.

El subclonado de SNAP23 requirió de 2 pasos por falta de sitios compatibles entre el vector pCMV-HA y el inserto conteniendo el cDNA de SNAP23. En el primer paso se aisló el fragmento conteniendo la secuencia codificante para SNAP23 por digestión con las enzimas *HindIII* y *XbaI* y se la insertó en un vector pBKSII+ (Stratagene) abierto en *HindIII* y *XbaI*. Una vez ligado y chequeado, este constructo fue cortado con las enzimas *Sall* y *NotI* y se obtuvo un fragmento conteniendo la secuencia de SNAP23. Éste posteriormente fue clonado dentro de un vector pCMV-HA abierto en *Sall* y *NotI*. Todas las construcciones HA-marcadas fueron analizadas y secuenciadas.

Preparación de GCPs

Las partículas de conos de crecimiento aislados o GCPs (del inglés Growth Cone Particles; Lohse y col, 1996) fueron obtenidos a partir del homogeneizado de cerebros de embriones de rata de 18 días de vida intrauterina en una solución de sucrosa 0,32 M, $MgCl_2$ 3mM y Hepes 1mM conteniendo inhibidores de proteasas y de fosfatasa (Aprotinina 2 $\mu g/ml$; Leupeptina 2 $\mu g/ml$; Pepstatina 1 $\mu g/ml$; PMSF 100 $\mu g/ml$ y Ortovanadato 2 $\mu g/ml$). El homogenato se centrifugó a baja velocidad (15 minutos a 3500 rpm en rotor SA-600) y el sobrenadante LSS (del inglés Low Speed Supernatant) fue sometido a una ultra centrifugación isopícnica en un gradiente discontinuo de sucrosas con densidades de 0,32 M (aportada por el LSS) 0,83 M, 1M, y 2,66 M a una velocidad de 50000 rpm. durante 40 minutos con rotor VTi50.1 (Beckman). Se tomó la fracción ubicada en la interfase LSS-0,83 M (fracción que contiene los conos de crecimiento aislados o GCPs, designada fracción "A"). Los restantes elementos del LSS fueron obtenidos de las fracciones ubicadas en las interfaces 0,83-1M ("B") y 1 M-2,66 M ("C").

La fracción "A" se cargó en un tubo conteniendo un colchón de sacarosa 2.66M y fue centrifugada 16000 rpm por 1 hora (en rotor TYPE60, Beckman) a 4°C. Posteriormente se recuperó la interfase Banda "A"/Sacarosa 2,66 M y se obtuvo una solución altamente enriquecida en partículas de conos de crecimiento (GCPs) aislados. Se midió su

concentración por métodos colorimétricos y espectrofotometría y luego fueron utilizados en los ensayos de estimulación con IGF-1 e inmunoprecipitación.

Ensayos de estimulación de GCPs con IGF-1

Se tomó una alícuota de GCPs por reacción a realizar, de manera que su concentración fuera de ~300 mg de proteína total. Ésta fue llevada a un volumen final de 200 μ l con solución de sacarosa 0,32 M. Seguidamente se adicionó factor de crecimiento IGF-1 en una concentración final de 20 nM durante 15 min y a 4°C en agitación constante. Posteriormente se agregó 100 μ l de una solución de estimulación (3 μ l saponina 2%; 30 μ l buffer intracelular 10X [Hepes 20 mM, ClNa 5 mM, ClK 50 mM, Cl₂Mg 3 mM]; 3 μ l ATP y 64 μ l H₂O) y se dejó reaccionar durante 5 minutos a 37°C. La finalidad de esta estimulación fue favorecer la exocitosis de PPVs. Para tales experimentos fue realizado un control que no fue estimulado con IGF-1.

Los GCPs estimulados y no estimulados fueron incubados con 200 μ l buffer de lisis (Ice Cold Lysis Buffer: EDTA 0,5 mM; Tris-HCl pH:7,5 6mM; Tritón X100 1% v/v; NaCl 150 mM; PMSF 1mM; Aprotinina y H₂O). Dicho buffer está formulado para promover una lisis suave, a modo de permitir la liberación de las PPVs contenidas en los GCPs, las cuales se mantienen intactas. Posteriormente los GCPs se resellan y de esta manera se obtiene una solución donde están presentes tanto las PPVs como las membranas de los GCPs, llamadas membrana de cono de crecimiento o GCM (Ellis y col, 1985). Este complejo de estructuras membranosas fue incubado con el anticuerpo primario de elección durante toda la noche a 4 °C en agitación constante.

Inmunoprecipitación de estructuras membranosas derivadas de conos de crecimiento axonales

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

Se tomó una alícuota de 20 μ l por cada condición a efectuar. Las microesferas fueron lavadas, centrifugadas y resuspendidas con solución de sacarosa 0,32 M o PBS 1X de 4

a 5 veces (3 minutos de agitación a 4 °C, posterior centrifugación a 4000 RPM y 4 °C durante 3 minutos, remoción del sobrenadante y resuspensión). Una vez concluidos los lavados las microesferas fueron agregadas a la mezcla de estructuras membranosas (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 GCM no fueron incubadas con anticuerpo primario, de modo de evidenciar union inespecifica de las microesferas con las estructuras membranosas

Luego de la incubación del complejo PPVs+GCM / Anticuerpo primario /Microesferas la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 4.000 RPM y 4 °C, se recolectó el sobrenadante (SN) y se procedió a concentrarlo por el método de metanol/cloroformo. Al volumen de sobrenadante inicial se le agregó 1 volumen de metanol y 0.25 volúmenes de cloroformo. Esta mezcla se agitó vigorosamente y fue centrifugada a 14.000 RPM por 2 minutos a 4 °C. Paso seguido se eliminó el sobrenadante (fase superior) cuidando de no perder la interfase donde se encontraban las proteínas. Posteriormente se agregó un volumen de metanol a la muestra, la cual fue nuevamente agitada y centrifugada a 14000 g por 2 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado, el pellet de proteínas se secó en estufa a 37 °C y finalmente fue resuspendido en 50 µl de sample buffer 5X.

Paralelamente, el precipitado de microesferas con las PPVs/GCM unidas (IP) fue lavado como se explicó anteriormente a fines de eliminar cualquier traza de material inespecifico. Paso seguido dicho precipitado fue resuspendido en Sample Buffer 5X.

Sobrenadante y precipitado fueron entonces calentados a 90-95 °C por 5 minutos e inmediatamente almacenados a -20 °C para su posterior análisis mediante Western blot.

Este último paso además de promover la desnaturalización de las proteínas en general es necesario para romper la unión entre las microesferas y las PPVs/GCM.

Electroforesis y Western blot

Para realizar electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS se utilizó el sistema descrito por Laemli (1970). La composición del gel separador fue de 10% al 15% de poliacrilamida según el peso molecular de la proteína a resolver. Para un gel al 10% la composición fue: poliacrilamida 10% (p/v), bis-acrilamida (N,N-metilen-

bis-acrilamida) 0,27% (p/v), TEMED (N,N,N,N,tetra-metilendiamina) 0,025% (v/v), persulfato de amonio 0,09% (p/v), Tris-HCl 0,375 M pH: 8,8, y SDS 0,1% (p/v). La composición del gel concentrador fue: poli-acrilamida 3% (p/v), bis-acrilamida (N,N-metilen-bis-acrilamida) 0,08% (p/v), TEMED (N,N,N,N,tetra-metilendiamina) 0,1% (v/v), persulfato de amonio 0,15% (p/v), Tris-HCl 0,125 M pH:6,8, y SDS 0,1% (p/v). A las muestras analizadas se les adicionó inhibidores de proteasas y de fosfatasa (aprotinina 2 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 2 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina 1 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 100 $\mu\text{g/ml}$ y ortovanadato 2 $\mu\text{g/ml}$). Cuando las muestras procedieron del raspado (con buffer RIPA 1X) de células crecidas en cultivo éstas se sonicaron durante 15 segundos a fines de romper las membranas celulares y lograr una muestra homogénea. Seguidamente se le agregó Sample Buffer (glicerol 3% (v/v), 2-mercaptoetanol 1,6% (v/v); SDS 1% (p/v); Tris-HCl 0,0625 M pH: 6,8). Luego las muestras se calentaron a 90-95 °C durante 5 minutos. El buffer de corrida electroforética estaba compuesto por Tris 0,0025 M – Glicina 0,2 M pH: 8,3, conteniendo SDS 0,1% (p/v). La electroforesis se desarrolló a 70V a temperatura ambiente hasta que las proteínas se concentraron en el gel separador y luego el voltaje se incrementó a 90V hasta que el frente de la corrida llegó al final del gel. Para la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, GE Healthcare) se utilizó el método húmedo, manteniéndose constante una intensidad de corriente de 300mA durante 75 minutos en buffer Tris-Glicina (Tris 0,0025 M; Glicina 0,2 M pH: 8,3; SDS 0,1% p/v) conteniendo 20% de metanol. Una vez finalizada la transferencia las membranas se colorearon con Ponceau 0,2%(p/v) en ácido acético al 1% (v/v) y fueron luego lavadas con ácido acético al 1% (v/v) para corroborar si la corrida y la transferencia se realizaron correctamente. Las membranas fueron luego bloqueadas durante una hora en TTBS 0,05% (Tris 50 mM; NaCl 200 mM; 0,05% (v/v) de Tween 20) conteniendo 5% de leche descremada. Los membranas transferidas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en solución TTBS 0,05%-leche descremada durante toda la noche a 4 °C. Luego de ser lavadas en agitación 3 veces durante 10 minutos con TTBS al 0,05%, fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios Odyssey IRdye CW 800. Tras los 3 lavados del anticuerpo secundario durante 10 minutos en agitación con TTBS al 0,05% las membranas fueron analizadas utilizando un equipo de detección Odyssey (Odyssey Infrared Imaging System, LI-COR Biosciences).

Bibliografía

Bibliografía

Akhmanova A y Hammer JA 3rd (2010).

Linking molecular motors to membrane cargo. *Curr Opin Cell Biol.* Aug; 22 (4): 479-487.

Alberts P, Rudge R, Hinnens I, Muzerelle A, Martinez-Arca S, Irinopoulou T, Marthiens V, Tooze S, Rathjen F, Gaspar P y Galli T (2003).

Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion. *Mol Biol Cell.* Oct; 14 (10): 4207-4220.

Alberts P, Rudge R, Irinopoulou T, Danglot L, Gauthier-Rouvière C y Galli T (2006).

Cdc42 and actin control polarized expression of TI-VAMP vesicles to neuronal growth cones and their fusion with the plasma membrane. *Mol Biol Cell.* Mar; 17 (3): 1194-1203.

Alieva AK, Shadrina MI, Filatova EV, Karabanov AV, Illarioshkin SN, Limborska SA y Slominsky PA (2014).

Involvement of endocytosis and alternative splicing in the formation of the pathological process in the early stages of Parkinson's disease. *BioMed Research International.* Vol. 2014, Article ID 718732, 6 pages. doi:10.1155/2014/718732.

Antonin W, Holroyd C, Tikkanen, R, Honing S y Jahn R (2000).

The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Mol Biol Cell.* 11: 3289-3298.

Arimura N y Kaibuchi K (2007).

Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* Mar; 8 (3): 194-205.

Bard F y Malhotra V (2006).

The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22: 439-55.

Berliocchi L, Fava E, Leist M, Horvat V, Dinsdale D, Read D y Nicotera P (2005).

Botulinum neurotoxin C initiates two different programs for neurite degeneration and neuronal apoptosis. *J Cell Biol.* Feb 14; 168 (4): 607-618.

Bethani I, Lang T, Geumann U, Sieber JJ, Jahn R y Rizzoli SO (2007).

The specificity of SNARE pairing in biological membranes is mediated by both proof-reading and spatial segregation. *EMBO J.* Sep 5; 26 (17): 3981-3992.

Bock JB, Lin RC y Scheller RH (1996).

A new syntaxin family member implicated in targeting of intracellular transport vesicles. *J Biol Chem.* Jul 26; 271(30): 17961-17965.

Bock JB, Matern HT, Peden AA y Scheller RH (2001).

A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*. Feb 15; 409 (6822): 839-841.

Bouquet C y Nothias F (2007).

Molecular mechanisms of axonal growth. *Adv Exp Med Biol*. 621:1-16.

Bradke F y Dotti CG (1997)

Neuronal polarity: Vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron*. Dec; 19 (6): 1175-1186.

Bradke F y Dotti CG (1999)

The role of local actin instability in axon formation. *Science*. Mar 19; 283 (5409): 1931-1934.

Brandhorst D, Zwilling D, Rizzoli SO, Lippert U, Lang T y Jahn R.

Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 2701-2706 (2006).

Bray D (1970).

Surface movements during the growth of single explanted neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 65: 905-910.

Broeke JH, Roelandse M, Luteijn MJ, Boiko T, Matus A, Toonen RF y Verhage M (2010).

Munc18 and Munc13 regulate early neurite outgrowth. *Biol Cell*. Jun 30; 102 (8): 479-488.

Burgo A, Casano AM, Kuster A, Arold ST, Wang G, Nola S, Verraes A, Dingli F, Loew D y Galli T (2013).

Increased activity of the vesicular soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor TI-VAMP/VAMP7 by tyrosine phosphorylation in the Longin domain. *J Biol Chem*. Apr 26; 288 (17): 11960-11972.

Caceres A, Banker G, Steward O, Binder L y Payne M (1984).

MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res*. Apr; 315 (2): 314-318.

Cao XC y Barlowe C (2000).

Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes. *J Cell Biol*. 149: 55-65.

Catsicas S, Larhammar D, Blomqvist A, Sanna PP, Milner RJ y Wilson MC (1991).

Expression of a conserved cell-type-specific protein in nerve terminals coincides with synaptogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. Feb 1; 88 (3): 785-789.

Chat S, Layani S, Mahaut C, Henry C, Chanut E y Truchet S (2011).

Characterisation of the potential SNARE proteins relevant to milk product release by mouse mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol*. May; 90 (5): 401-413.

Chen D, Minger SL, Honer WG y Whiteheart SW (1999).

Organization of the secretory machinery in the rodent brain: distribution of the t-SNAREs, SNAP-25 and SNAP-23. *Brain Res.* Jun 12; 831(1-2): 11-24.

Chernomordik LV y Kozlov MM (2003).

Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Ann. Rev Biochem.* 72: 175-207.

Chiang SH, Hou JC, Hwang J, Pessin JE y Saltiel AR (2002).

Cloning and Functional Characterization of Related TC10 Isoforms, a Subfamily of Rho Proteins Involved in Insulin-stimulated Glucose Transport. *J Biol Chem.* Apr 12; 277 (15): 13067-13073.

Chieriegatti E, Chicka MC, Chapman ER y Baldini G (2004).

SNAP-23 functions in docking/fusion of granules at low Ca^{2+} . *Mol Biol Cell.* Apr; 15 (4): 1918-1930.

Chieriegatti E y Meldolesi J (2005).

Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 6: 181-187.

Coco S, Raposo G, Martinez S, Fontaine JJ, Takamori S, Zahraoui A, Jahn R, Matteoli M, Louvard D, Galli T (1999).

Subcellular localization of tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein (VAMP)/VAMP7 in neuronal cells: evidence for a novel membrane compartment. *J Neurosci.* Nov 15; 19 (22): 9803-9812.

Cocucci E, Lorusso A, Ongania GN, Klajn A y Meldolesi J (2006).

Non-secretory exocytoses in the brain. *J Physiol Paris.* Mar-May; 99 (2-3): 140-145.

Cocucci E, Racchetti G, Rupnik M y Meldolesi J (2008).

The regulated exocytosis of enlargeosomes is mediated by a SNARE machinery that includes VAMP4. *J Cell Sci.* Sep 15; 121(18): 2983-2991.

Craig AM, Wyborski RJ, Banker G (1995).

Preferential addition of newly synthesized membrane protein at axonal growth cones. *Nature.* 375: 592-594.

D'Alessandro R, Racchetti G, Meldolesi J (2010).

Outgrowth of neurites is a dual process. *Commun Integr Biol.* Nov; 3 (6): 576-578.

Da Silva JS y Dotti CG (2002).

Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 3: 694-704.

Danglot L, Zylbersztejn K, Petkovic M, Gauberti M, Meziane H, Combe R, Champy MF, Birling MC, Pavlovic G, Bizot JC, Trovero F, Della Ragione F, Proux-Gillardeaux V, Sorg T, Vivien D, D'Esposito M y Galli T (2012).

Absence of TI-VAMP/Vamp7 leads to increased anxiety in mice. *J Neurosci.* Feb 8; 32 (6): 1962-1968.

De Camilli P (1993).

Exocytosis goes with a SNAP. *Nature*. Jul 29; 364 (6436): 387-388.

Deitcher DL, Ueda A, Stewart BA, Burgess RW, Kidokoro Y y Schwarz TL (1998).

Distinct requirements for evoked and spontaneous release of neurotransmitter are revealed by mutations in the *Drosophila* gene neuronal-synaptobrevin. *J Neurosci*. Mar 15; 18 (6): 2028-2039.

Delgado-Martinez I, Nehring RB y Sørensen JB (2007).

Differential abilities of SNAP-25 homologs to support neuronal function. *J Neurosci*. Aug 29; 27 (35): 9380-9391.

Dent EW y Gertler FB (2003).

Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*. Oct 9; 40 (2): 209-227.

Dotti CG, Sullivan CA y Banker GA (1998).

The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*. 8: 1454-1468.

Du Y, Shen J, Hsu JL, Han Z, Hsu MC, Yang CC, Kuo HP, Wang YN, Yamaguchi H, Miller SA y Hung MC (2014).

Syntaxin 6-mediated Golgi translocation plays an important role in nuclear functions of EGFR through microtubule-dependent trafficking. *Oncogene*. Feb 6; 33 (6): 756-770.

Dupraz S, Grassi D, Bernis ME, Sosa L, Bisbal M, Gastaldi L, Jausoro I, Cáceres A, Pfenninger KH y Quiroga S (2009).

The TC10-Exo70 complex is essential for membrane expansion and axonal specification in developing neurons. *J Neurosci*. Oct 21; 29 (42): 13292-13301.

Eaton BA, Haugwitz M, Lau D y Moore HP (2000).

Biogenesis of regulated exocytotic carriers in neuroendocrine cells. *J Neurosci*. Oct 1; 20 (19): 7334-7344.

Ellis L, Wallis I, Abreu E y Pfenninger KH (1985).

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*. Nov; 101 (5 Pt 1): 1977-1989.

Estrada-Bernal A, Sanford SD, Sosa LJ, Simon GC, Hansen KC y Pfenninger KH (2012).

Functional complexity of the axonal growth cone: a proteomic analysis. *PLoS One*. 7 (2): e31858.

Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT y Jahn R (1998).

Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA*. Dec 22; 95 (26): 15781-15786.

Fasshauer D, Antonin W, Margittai M, Pabst S y Jahn R (1999).

Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J. Biol. Chem.* 274, 15440–15446.

Fasshauer D (2003).

Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim. Biophys Acta.* 1641, 87–97.

Feldmann A, Winterstein C, White R, Trotter J y Krämer-Albers EM (2009).

Comprehensive analysis of expression, subcellular localization, and cognate pairing of SNARE proteins in oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* Jun; 87 (8): 1760-1772.

Ferreira A, Niclas J, Vale RD, Banker GC y Kosik KS (1992).

Suppression of kinesin expression in cultured hippocampal neurons using antisense oligonucleotides. *J Cell Biol.* 117: 595–606.

Ferreira A, Cáceres A y Kosik KS (1993).

Intraneuronal compartments of the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 13: 3112-3123.

Fischer M, Pereira PM, Holtmann B, Simon CM, Hanauer A, Heisenberg M y Sendtner M (2009).

P90 Ribosomal s6 kinase 2 negatively regulates axon growth in motoneurons. *Mol Cell Neurosci.* Oct; 42 (2): 134-141.

Foley KP y Klip A (2014).

Dynamic GLUT4 sorting through a syntaxin-6 compartment in muscle cells is derailed by insulin resistance-causing ceramide. *Biol Open.* Apr 4. pii: bio.20147898v1.

Frasson C, Inverardi F, Coco S, Ortino B, Grumelli C, Pozzi D, Verderio C y Matteoli M (2005).

Analysis of SNAP-25 immunoreactivity in hippocampal inhibitory neurons during development in culture and in situ. *Neuroscience.*131(4): 813-823.

Fujita A, Koinuma S, Yasuda S, Nagai H, Kamiguchi H, Wada N y Nakamura T (2013).

GTP hydrolysis of TC10 promotes neurite outgrowth through exocytic fusion of Rab11- and L1-containing vesicles by releasing exocyst component Exo70. *PLoS One.* Nov 4; 8 (11): e79689.

Fujiwara T, Mishima T, Kofuji T, Chiba T, Tanaka K, Yamamoto A y Akagawa K (2006).

Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity. *J Neurosci.* May 24; 26 (21): 5767-5776.

Fukuda M y Mikoshiba K (2000).

Expression of synaptotagmin I or II promotes neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurosci Lett.* Dec 1; 295 (1-2): 33-36.

Furukawa N y Mima J (2014).

Multiple and distinct strategies of yeast SNAREs to confer the specificity of membrane fusion. *Sci Rep.* Mar 4; 4: 4277.

Gerber SH y Südhof TC (2002).

Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*. Feb; 51 (1): 3-11.

Georges PC, Hadzimechalis NM, Sweet ES y Firestein BL (2008).

The yin-yang dendrite morphology: unity of actin and microtubules. *Mol Neurobiol*. 38 (3): 270-284.

Goslin K, Schreyer DJ, Skene JH y Banker GA (1996).

Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature*. 336: 672-674.

Grosse G, Grosse J, Tapp R, Kuchinke J, Gorsleben M, Fetter I, Höhne-Zell B, Gratzl M y Bergmann M (1999).

SNAP-25 requirement for dendritic growth of hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. Jun 1; 56 (5): 539-546.

Gupton SL y Gertler FB (2010).

Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuritogenesis. *Dev Cell*. May 18; 18 (5): 725-736.

Hammer JA 3rd y Wu XS (2002).

Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 14: 69-75.

Hammer JA 3rd y Wagner W (2013).

Functions of class V myosins in neurons. *J Biol Chem*. Oct 4; 288 (40): 28428- 28434.

Hammond C (2001)

Chapter 1: Neurons (pp 3-21). Cellular and Molecular Neurobiology (Second Edition) May 31; ISBN-10: 0123116244. ISBN-13: 978-0123116246. Academic Press.

Hazuka CD, Foletti DL, Hsu SC, Kee Y, Hopf FW y Scheller RH. (1999).

The sec6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains. *J Neurosci*. 19: 1324-1334.

Hinners I, Wendler F, Fei H, Thomas L, Thomas G y Tooze SA (2003).

AP-1 recruitment to VAMP4 is modulated by phosphorylation-dependent binding of PACS-1. *EMBO Rep*. Dec; 4 (12): 1182-1189.

Hirling H, Steiner P, Chaperon C, Marsault R, Regazzi R y Catsicas S (2000).

Syntaxin 13 is a developmentally regulated SNARE involved in neurite outgrowth and endosomal trafficking. *Eur J Neurosci*. Jun; 12 (6): 1913-1923.

Hong S, Huo H, Xu J y Liao K (2004).

Insulin-like growth factor-1 receptor signaling in 3T3-L1 adipocyte differentiation requires lipid rafts but not caveolae. *Cell Death Differ*. Jul; 11 (7): 714-723.

Hong W (2005).

SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta*. Jun 30; 1744 (2): 120-144.

Hsu S, Ting A, Hazuka C, Davanger S, Kenny J, Kee Y y Scheller RH (1996).

The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron*. Dec; 17 (6): 1209-1219.

Hua Z, Leal-Ortiz S, Foss SM, Waites CL, Garner CC, Voglmaier SM y Edwards RH (2011).

v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools. *Neuron*. Aug 11; 71 (3): 474-487.

Huo H, Guo X, Hong S, Jiang M, Liu X y Liao K (2003).

Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction. *J Biol Chem*. Mar 28; 278 (13): 11561-11569.

Ibata K, Fukuda M, Hamada T, Kabayama H y Mikoshiba K (2000).

Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neurites. *J Neurochem*. Feb; 74 (2): 518-526.

Igarashi M, Kozaki S, Terakawa S, Kawano S, Ide C y Komiya Y (1996).

Growth cone collapse and inhibition of neurite growth by Botulinum neurotoxin C1: a t-SNARE is involved in axonal growth. *J Cell Biol*. Jul; 134 (1): 205-215.

Izawa R, Onoue T, Furukawa N y Mima J (2012).

Distinct contributions of vacuolar Qabc- and R-SNARE proteins to membrane fusion specificity. *J Biol Chem*. Jan 27; 287 (5): 3445-3453.

Jacobson C, Schnapp B y Banker GA (2006).

A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron*. Mar 16; 49 (6): 797-804.

Jahn R y Grubmuller H (2002).

Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol*. 14: 488-495.

Jahn R, Lang T y Südhof TC (2003)

Membrane fusion. *Cell*. 112: 519-533.

Jahn R (2004)

Principles of exocytosis and membrane fusion. *Ann N Y Acad Sci*. 1014: 170-178.

Jahn R y Scheller RH (2006).

SNAREs - Engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Sep; 7 (9): 631-643.

Jahn R y Fasshauer D (2012).

Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*. Oct 11; 490 (7419): 201-207.

Jewell JL, Oh E y Thurmond DC (2010).

Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Mar; 298 (3): R517-531.

Jung JJ, Inamdar SM, Tiwari A y Choudhury A (2012).

Regulation of intracellular membrane trafficking and cell dynamics by syntaxin-6. *Biosci Rep.* Aug; 32 (4): 383-391.

Kabayama H, Takei K, Fukuda M, Ibata K y Mikoshiba K (1999).

Functional involvement of synaptotagmin I/II C2A domain in neurite outgrowth of chick dorsal root ganglion neuron. *Neuroscience.* 88 (4): 999-1003.

Kabayama H, Tokushige N, Takeuchi M y Mikoshiba K (2008).

Syntaxin 6 regulates nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. *Neurosci Lett.* May 16; 436 (3): 340-344.

Kamal A, Stokin G, Yang Z, Xia C y Goldstein LS (2000).

Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron.* 28: 449-459.

Kasai H, Takahashi N y Tokumaru H (2012).

Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiol Rev.* Oct; 92 (4): 1915-1964.

Katz L y Brennwald P (2000).

Testing the 3Q:1R "rule": mutational analysis of the ionic "zero" layer in the yeast exocytic SNARE complex reveals no requirement for arginine. *Mol Biol Cell.* Nov; 11 (11): 3849-3858.

Kawanishi M, Tamori Y, Okazawa H, Araki S, Shinoda H y Kasuga M (2000).

Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Mediation of complex formation between syntaxin4 and VAMP2. *J Biol Chem.* Mar 17; 275 (11): 8240-8247.

Kimura K, Mizoguchi A y Ide C (2003).

Regulation of growth cone extension by SNARE proteins. *J Histochem Cytochem.* Apr; 51 (4): 429-433.

Kreykenbohm V, Wenzel D, Antonin W, Atlachkine V y von Mollard GF (2002).

The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners. *Eur J Cell Biol.* May; 81(5): 273-280.

Krzewski K, Gil-Krzewska A, Watts J, Stern JN y Strominger JL (2011).

VAMP4- and VAMP7-expressing vesicles are both required for cytotoxic granule exocytosis in NK cells. *Eur J Immunol.* Nov; 41 (11): 3323-3329.

Laufman O, Hong W y Lev S (2011).

The COG complex interacts directly with Syntaxin 6 and positively regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *J Cell Biol.* Aug 8; 194 (3): 459-472.

Laurino L, Wang XX, De La Houssaye BA, Sosa L, Dupraz S, Caceres A, Pfenninger KH y Quiroga S (2005).

PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J Cell Sci.* 118: 3653-3662.

Ledesma MD y Dotti CG (2003).

Membrane and cytoskeleton dynamics during axonal elongation and stabilization. *Int Rev Cytol.* 227: 183-219.

Leoni C, Menegon A, Benfenati F, Toniolo D, Pennuto M y Valtorta F (1999).

Neurite extension occurs in the absence of regulated exocytosis in PC12 subclones. *Mol Biol Cell.* Sep; 10 (9): 2919-2931.

Link E, McMahon H, Fischer von Mollard G, Yamasaki S, Niemann H, Südhof TC y Jahn R (1993).

Cleavage of cellubrevin by tetanus toxin does not affect fusion of early endosomes. *J Biol Chem.* Sep 5; 268 (25): 18423-18426.

Liu Y, Xu XH, Chen Q, Wang T, Deng CY, Song BL, Du JL y Luo ZG (2013).

Myosin Vb controls biogenesis of post-Golgi Rab10 carriers during axon development. *Nat Commun.* 4: 2005.

Lockerbie RO, Miller VE y Pfenninger KH (1991).

Regulated plasmalemmal expansion in nerve growth cones. *J Cell Biol.* Mar; 112 (6): 1215-1227.

Lohse K, Helmke SM, Wood MR, Quiroga S, de la Houssaye BA, Miller VE, Negre-Aminou P y Pfenninger KH (1996).

Axonal origin and purity of growth cones isolated from fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* Oct 23; 96 (1-2): 83-96.

Mandel JW y Banker GA (1996).

A spatial gradient of Tau phosphorylation in nascent neurons. *J Neurosci.* 16: 5727-5740.

Malinow R y Malenka RC (2002).

AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 25: 103-126.

Martín-Martín B, Nabokina SM, Blasi J, Lazo PA y Mollinedo F (2000).

Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis. *Blood.* Oct 1; 96 (7): 2574-2583.

Martinez-Arca S, Alberts P, Zahraoui A, Louvard D y Galli T (2000).

Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J Cell Biol.* May 15; 149 (4): 889-900.

Martinez-Arca S, Coco S, Mainguy G, Schenk U, Alberts P, Bouillé P, Mezzina M, Prochiantz A, Matteoli M, Louvard D y Galli T (2001).

A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. *J Neurosci.* Jun 1; 21 (11): 3830-3838.

Martinez-Arca S, Rudge R, Vacca M, Raposo G, Camonis J, Proux-Gillardeaux V, Daviet L, Formstecher E, Hamburger A, Filippini F, D'Esposito M y Galli T (2003).

A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 22; 100 (15): 9011-9016.

Mascotti F, Cáceres A, Pfenninger KH y Quiroga S (1997).

Expression and distribution of IGF-1 receptors containing a β -subunit variant (β gc) in developing neurons. *J Neurosci*. Feb 15; 17 (4): 1447-1459.

Meldolesi J (2011).

Neurite outgrowth: this process, first discovered by Santiago Ramon y Cajal, is sustained by the exocytosis of two distinct types of vesicles. *Brain Res Rev*. Jan 7; 66 (1-2): 246-255.

Mehmood T, Schneider A, Sibille J, Marques Pereira P, Pannetier S, Ammar MR, Dembele D, Thibault-Carpentier C, Rouach N y Hanauer A (2011).

Transcriptome profile reveals AMPA receptor dysfunction in the hippocampus of the Rsk2-knockout mice, an animal model of Coffin-Lowry syndrome. *Hum Genet*. Mar; 129 (3): 255-269.

Mishima T, Fujiwara T, Sanada M, Kofuji T, Kanai-Azuma M y Akagawa K (2014).

Syntaxin 1B, but Not Syntaxin 1A, Is Necessary for the Regulation of Synaptic Vesicle Exocytosis and of the Readily Releasable Pool at Central Synapses. *PLoS One*. Feb 28, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0090004.

Mitchison T y Kirschner M (1988).

Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*. 1: 761-772.

Mollinedo F y Lazo PA (1997).

Identification of two isoforms of the vesicle-membrane fusion protein SNAP-23 in human neutrophils and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Feb 24; 231(3): 808-812.

Morfini G, Quiroga S, Rosa A, Kosik K y Cáceres A (1997).

Suppression of KIF2 in PC12 cells alters the distribution of a growth cone nonsynaptic membrane receptor and inhibits neurite extension. *J Cell Biol*. 138: 657-669.

Morfini G, Szebenyi G, Brown H, Pant H, Pigino G, DeBoer S, Breffer U y Brady ST (2004).

A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J*. 23: 2235-2245.

Murthy M, Garza D, Scheller RH y Schwarz TL (2003).

Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists. *Neuron*. Feb 6; 37 (3): 433-447.

- Muzerelle A, Alberts P, Martínez-Arca S, Jeannequin O, Lafaye P, Mazié JC, Galli T y Gaspar P (2003).**
Tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein localizes to a presynaptic membrane compartment in selected terminal subsets of the rat brain. *Neuroscience*. 122 (1): 59-75.
- Nakazawa H, Sada T, Toriyama M, Tago K, Sugiura T, Fukuda M y Inagaki N (2012).**
Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth. *J Neurosci*. Sep 12; 32 (37): 12712-12725.
- Nozumi M, Togano T, Takahashi-Niki K, Lu J, Honda A, Taoka M, Shinkawa T, Koga H, Takeuchi K, Isobe T y Igarashi M (2010).**
Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 6; 106 (40): 17211-17216.
- Osen-Sand A, Catsicas M, Staple JK, Jones KA, Ayala G, Knowles J, Grenningloh G y Catsicas S (1993).**
Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Nature*. Jul 29; 364 (6436): 445-448.
- Osen-Sand A, Staple JK, Naldi E, Schiavo G, Rossetto O, Petitpierre S, Malgaroli A, Montecucco C y Catsicas S (1996).**
Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. *J Comp Neurol*. Apr 1; 367 (2): 222-234.
- Oyler GA, Polli JW, Wilson MC y Billingsley ML (1991).**
Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 15; 88 (12): 5247-5251.
- Palade GE (1975).**
Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science*. 89: 347-358.
- Paglini G, Kunda P, Quiroga S, Kosik KS y Cáceres A (1988).**
Suppression of radixin and moesin alters growth cone morphology, motility, and process formation in primary cultured neurons. *J Cell Biol*. 143: 443-455.
- Paglini G, Peris L, Diez-Guerra J, Quiroga S y Cáceres A (2001).**
The Cdk5-p35 kinase associates with the Golgi apparatus and regulates membrane traffic. *EMBO Rep*. 2: 1139-1144.
- Perera HK, Clarke M, Morris NJ, Hong W, Chamberlain LH y Gould GW (2003).**
Syntaxin 6 regulates Glut4 trafficking in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Biol Cell*. Jul; 14 (7): 2946-2958.
- Peng L, Liu H, Ruan H, Tepp WH, Stoothoff WH, Brown RH, Johnson EA, Yao WD, Zhang SC y Dong M (2013).**
Cytotoxicity of botulinum neurotoxins reveals a direct role of syntaxin 1 and SNAP-25 in neuron survival. *Nat Commun*. 4: 1472.

- Perera HK, Clarke M, Morris NJ, Hong W, Chamberlain LH y Gould GW (2003).**
Syntaxin 6 regulates Glut4 trafficking in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Biol Cell*. Jul; 14 (7): 2946-2958.
- Peretti D, Peris L, Rosso S, Quiroga S y Cáceres A (2000).**
Evidence for the involvement of KIF4 in the anterograde transport of L1-containing vesicles. *J. Cell Biol.* 149: 141-152.
- Pfenninger KH y Friedman LB (1993).**
Sites of plasmalemmal expansion in growth cones. *Brain Res Dev Brain Res*. Feb 19; 71 (2): 181-192.
- Pfenninger KH, Laurino L, Peretti D, Wang X, Rosso S, Morfini G, Cáceres A y Quiroga S (2003).**
Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J Cell Sci*. Apr 1; 116 (7): 1209-1217.
- Pfenninger KH (2009).**
Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task. *Nat Rev Neurosci*. Apr; 10 (4): 251-261.
- Pickett JA y Edwardson JM (2006).**
Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic*. Feb; 7 (2): 109-116.
- Pike LJ (2005).**
Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta*. Dec 30; 1746 (3): 260-273.
- Prescott GR y Chamberlain LH (2011).**
Regional and developmental brain expression patterns of SNAP25 splice variants. *BMC Neurosci*. Apr 28; 12: 35.
- Puri N, Kruhlak MJ, Whiteheart SW y Roche PA (2003).**
Mast cell degranulation requires N-ethylmaleimide-sensitive factor-mediated SNARE disassembly. *J Immunol*. Nov 15; 171 (10): 5345-5352.
- Quiroga S, Garofalo RS y Pfenninger KH (1995).**
Insulin-like growth factor I receptors of fetal brain are enriched in nerve growth cones and contain a β -subunit variant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 4309-4312.
- Racchetti G, Lorusso A, Schulte C, Gavello D, Carabelli V, D'Alessandro R y Meldolesi J (2010).**
Rapid neurite outgrowth in neurosecretory cells and neurons is sustained by the exocytosis of a cytoplasmic organelle, the enlargeosome. *J Cell Sci*. Jan 15; 123 (2): 165-170.

- Raino J, Khvotchev M, Liu P, Darios F, Li YC, Ramirez DM, Adachi M, Lemieux P, Toth K, Davletov B y Kavalali ET (2012).**
VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nat Neurosci.* Mar 11; 15 (5): 738-745.
- Ramirez DM y Kavalali ET (2012).**
The role of non-canonical SNAREs in synaptic vesicle recycling. *Cell Logist.* Jan 1; 2 (1): 20-27.
- Ratner N, Bloom G, y Brady ST (1998).**
A role for Cdk5 kinase in fast anterograde axonal transport: novel effects of olomoucine and the APC tumor suppressor protein. *J Neurosci.* 18: 7717-7726.
- Rea S, Martin L, McIntosh S, Macaulay S, Ramsdale T, Baldini G y James D (1998).**
SynDET, an adipocyte target SNARE involved in the insulin-induced translocation of GLUT4 to the cell surface. *J Biol Chem.* Jul 24; 273 (30): 18784-18792.
- Reales E, Mora-López F, Rivas V, García-Poley A, Brieva JA y Campos-Caro A (2005).**
Identification of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor exocytotic machinery in human plasma cells: SNAP-23 is essential for antibody secretion. *J Immunol.* Nov 15; 175 (10): 6686-6693.
- Romanelli R, LeBeau A, Fulmer C, Lazzarino D, Hochberg A y Wood T (2007).**
Insulin-like growth factor type-I receptor internalization and recycling mediate the sustained phosphorylation of Akt. *J Biol Chem.* Aug 3; 282 (31): 22513-22524.
- Rosso S, Bollati F, Bisbal M, Peretti D, Sumi T, Nakamura T, Quiroga S, Ferreira A y Cáceres A (2004).**
LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons. *Mol. Biol. Cell.* 15: 3433-3449.
- Rotem-Yehudar R, Galperin E y Horowitz M (2001).**
Association of insulin-like growth factor 1 receptor with EHD1 and SNAP29. *J Biol Chem.* Aug 31; 276 (35): 33054-33060.
- Rothman JE (1994).**
Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* 372: 55-63.
- Rothman JE y Warren G (1994).**
Implication of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol.* 4: 220-233.
- Sakisaka T, Baba T, Tanaka S, Izumi G, Yasumi M y Takai Y (2004).**
Regulation of SNAREs by tomosyn and ROCK: implication in extension and retraction of neurites. *J Cell Biol.* Jul 5; 166 (1): 17-25.

- Sato M, Yoshimura S, Hirai R, Goto A, Kunii M, Atik N, Sato T, Sato K, Harada R, Shimada J, Hatabu T, Yorifuji H y Harada A (2011).**
The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo. *Traffic*. Oct; 12 (10): 1383-1393.
- Scales SJ, Chen YA, Yoo BY, Patel SM, Doung YC y Scheller RH (2000).**
SNAREs contribute to the specificity of membrane fusion. *Neuron*. May; 26 (2): 457-464.
- Schoch S, Deak F, Königstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Südhof TC y Kavalali ET (2001).**
SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science*. 294: 1117-1122.
- Schwenk R, Dirx E, Coumans W, Bonen A, Klip A, Glatz J y Luiken J (2010).**
Requirement for distinct vesicle-associated membrane proteins in insulin- and AMP-activated protein kinase (AMPK)-induced translocation of GLUT4 and CD36 in cultured cardiomyocytes. *Diabetologia*. Oct; 53 (10): 2209-2219.
- Shirasu M, Kimura K, Kataoka M, Takahashi M, Okajima S, Kawaguchi S, Hirasawa Y, Ide C y Mizoguchi A (2000).**
VAMP-2 promotes neurite elongation and SNAP-25A increases neurite sprouting in PC12 cells. *Neurosci Res*. Aug; 37 (4): 265-275.
- Skalski M, Yi Q, Kean M, Myers D, Williams K, Burtnik A y Coppolino M (2010).**
Lamellipodium extension and membrane ruffling require different SNARE-mediated trafficking pathways. *BMC Cell Biol*. Aug 10; 11: 62. doi:10.1186/1471-2121-11-62.
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, y Rothman JE (1993a).**
SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 362: 318-324.
- Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH y Rothman JE (1993b).**
A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. Nov 5; 75 (3): 409-418.
- Sosa L, Dupraz S, Laurino L, Bollati F, Bisbal M, Cáceres A, Pfenninger K y Quiroga S (2006).**
IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat Neurosci*. 9 (8): 993-995.
- Steggmaier M, Klumperman J, Foletti DL, Yoo JS y Scheller RH (1999).**
Vesicle-associated membrane protein 4 is implicated in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol Biol Cell*. Jun; 10 (6): 1957-1972.
- Steinbusch L, Schwenk R, Ouwens D, Diamant M, Glatz J y Luiken J (2011).**
Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci*. Aug; 68 (15): 2525-2538.

- Steiner P, Sarria JC, Huni B, Marsault R, Catsicas S y Hirling H (2002).**
Overexpression of neuronal Sec1 enhances axonal branching in hippocampal neurons. *Neuroscience*. 113: 893–905.
- Suh Y, Terashima A, Petralia R, Wenthold R, Isaac J, Roche K y Roche PA (2010).**
A neuronal role for SNAP-23 in postsynaptic glutamate receptor trafficking. *Nat Neurosci*. Mar; 13 (3): 338-343.
- Suh YH, Yoshimoto-Furusawa A, Weih KA, Tessarollo L, Roche KW, Mackem S y Roche PA (2011).**
Deletion of SNAP-23 results in pre-implantation embryonic lethality in mice. *PLoS One*. Mar 29; 6 (3): e18444.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R y Brunger AT (1998).**
Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. Sep 24; 395 (6700): 347-353.
- Takeda S, Yamazaki H, Seog D, Kanai Y, Terada S y Hirokawa N (2000).**
Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associating vesicles important for neurite building. *J Cell Biol*. 148: 1255–1265.
- Tang BL (2001).**
Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. *J Neurochem*. Dec; 79 (5): 923-930.
- Tiwari A, Jung JJ, Inamdar SM, Brown CO, Goel A y Choudhury A (2011).**
Endothelial cell migration on fibronectin is regulated by syntaxin 6-mediated alpha5beta1 integrin recycling. *J Biol Chem*. Oct 21; 286 (42): 36749-36761.
- Tran T, Zeng Q y Hong W (2007).**
VAMP4 cycles from the cell surface to the trans-Golgi network via sorting and recycling endosomes. *J Cell Sci*. 120, 1028-1041.
- Tsaneva-Atanasova K, Burgo A, Galli T y Holcman D (2009).**
Quantifying neurite growth mediated by interactions among secretory vesicles, microtubules, and actin networks. *Biophys J*. 96: 840–857.
- Vega IE y Hsu SC (2001).**
The exocyst complex associates with microtubules to mediate vesicle targeting and neurite outgrowth. *J Neurosci*. 21, 3839–3848.
- Vivona S, Liu CW, Strop P, Rossi V, Filippini F y Brunger AT (2010).**
The longin SNARE VAMP7/T1-VAMP adopts a closed conformation. *J Biol Chem*. Jun 4; 285 (23): 17965-17973.
- Wang T, Liu Y, Xu XH, Deng CY, Wu KY, Zhu J, Fu XQ, He M y Luo ZG (2011).**
Lgl1 activation of rab10 promotes axonal membrane trafficking underlying neuronal polarization. *Dev Cell*. Sep 13; 21 (3): 431-44.

- Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Mathews JR, Lopez-Bendito G, Molnar Z, Becher MW, Valenzuela CF, Partridge LD y Wilson (2002).**
Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci.* 5: 19-26.
- Wasserman D, Geijer T, Rozanov V y Wasserman J (2005).**
Suicide attempt and basic mechanisms in neural conduction: relationships to the SCN8A and VAMP4 genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* Feb 5; 133B (1): 116-119.
- Whyte JR y Munro S (2002).**
Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci.* Jul 1; 115 (13): 2627-2637.
- Wolstenholme JT, Warner JA, Capparuccini MI, Archer KJ, Shelton KL y Miles MF (2011).**
Genomic analysis of individual differences in ethanol drinking: evidence for non-genetic factors in C57BL/6 mice. *PLoS One.* 6 (6): e21100.
- Wong SH, Xu Y, Zhang T, Griffiths G, Lowe SL, Subramaniam VN, Seow KT y Hong W (1999).**
GS32, a novel Golgi SNARE of 32 kDa, interacts preferentially with syntaxin 6. *Mol Biol Cell.* Jan; 10 (1): 119-134.
- Wood MR, DeBin J, Strichartz GR, Pfenninger KH (1992).**
Plasmalemmal insertion and modification of sodium channels at the nerve growth cone. *J Neurosci.* Aug; 12 (8): 2948-2959.
- Xu XH, Deng CY, Liu Y, He M, Peng J, Wang T, Yuan L, Zheng ZS, Blackshear PJ y Luo ZG (2014).**
MARCKS regulates membrane targeting of Rab10 vesicles to promote axon development. *Cell Res.* Mar 25. DOI: 10.1038/cr.2014.33.
- Yang B, Gonzalez L Jr, Prekeris R, Steegmaier M, Advani RJ y Scheller RH (1999).**
SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J Biol Chem.* 274: 5649-5653.
- Zeng Q, Tran T, Tan H y Hong W (2003).**
The cytoplasmic domain of Vamp4 and Vamp5 is responsible for their correct subcellular targeting. *J Biol Chem.* 278 (25): 23046-23054.
- Zhang Y, Shu L y Chen X (2008).**
Syntaxin 6, a regulator of the protein trafficking machinery and a target of the p53 family, is required for cell adhesion and survival. *J Biol Chem.* Nov 7; 283 (45): 30689-30698.
- Zylbersztejn K, Petkovic M, Burgo A, Deck M, Garel S, Marcos S, Bloch-Gallego E, Nothias F, Serini G, Bagnard D, Binz T y Galli T (2012).**
The vesicular SNARE Synaptobrevin is required for Semaphorin 3A axonal repulsion. *J Cell Biol.* Jan 9; 196 (1): 37-46.

Abreviaturas

Abreviaturas

- α -, β - y γ -SNAP:** Soluble NSF Attachment Proteins, proteínas solubles de unión a NSF.
- ADF:** Actin Depolymerizing Factor, factor depolimerizante de actina.
- AP1:** Adaptor protein 1, proteína adaptadora 1.
- AP3:** Adaptor protein 3, proteína adaptadora 3.
- APP:** Amieloid Precursor Protein, proteína precursora amiloide.
- β gc :** β Growth Cone, subtipo de subunidad β del IGF-1R localizada en conos de crecimiento axonales.
- BoNT:** Botulinum Neurotoxin, neurotoxina botulínica.
- Cdc42:** Cell division control protein 42, proteína de control de la división celular.
- Cdk5:** Cyclin-dependent kinase 5, kinasa dependiente de ciclina 5.
- CLS:** Coffin-Lowry Sndrome, síndrome de Coffin-Lowry.
- EGF:** Epithelial Growth Factor, factor de crecimiento epitelial.
- FAK:** Focal Adhesion Kinase, kinasa de adhesión focal.
- GAP43:** Growth Asociated Protein of 43 Kd, proteína asociada al crecimiento de 43 Kd.
- GCM:** Growth Cone Membrane, membrana de cono de crecimiento.
- GCPs:** Growth Cone Particles, Partículas de conos de crecimiento aisladas.
- GFP:** Green Fluorescent Protein, proteína verde fluorescente.
- GLUT 4:** Glucose Transporter 4, transportador de Glucosa tipo 4.
- GPI:** Glycosyl Phosphatidylinositol, glicosil fosfatidilinositol.
- GTPasa:** Guanosine-5'-Triphosphate hidrolase, enzima hidrolizante de guanosina trifosfato.
- HA:** Hemagglutinin, epítopo inmunogénico Hemaglutinina.
- IGF-1:** Insulin-like Growth Factor Type 1, Factor de Crecimiento Similar a Insulina tipo 1.
- IGF-1R:** Insulin-like Growth Factor Type 1 Receptor, Receptor del Factor de Crecimiento Similar a Insulina tipo 1.
- IP:** Inmunoprecipitado.
- IRS:** Insulin Receptor Substrate 1, sustrato del receptor de insulina 1.
- KIF2, 3, 4, 5 y 5C:** Kinesin Family 2, 3, 4, 5 and 5C, proteínas de la familia de las Kinesinas 2, 3, 4, 5 y 5C, respectivamente.

- LI-CAM:** L1 Cell Adhesion Molecule, molécula de adhesión celular L1.
- Lgl1:** Lethal giant larvae 1, proteína supresora de tumores Larva gigante letal 1.
- LIMK1:** LIM domain kinase 1, kinasa de dominio LIM 1.
- MAP2:** Microtubule-Associated Protein 2, Proteína asociada a microtúbulos 2.
- mRNA:** Messenger RNA, RNA mensajero.
- NGF:** Nerve Growth Factor, factor de crecimiento nervioso.
- NK:** Natural Killer, células del sistema inmune.
- NSF:** NEM Sensitive Factor, factor sensible a NEM (N-Etilmaleimida).
- PBS:** Phosphate Buffer Saline, buffer fosfato salino.
- PI3K:** Phosphatidyl Inositol 3 Kinase, Enzima Fosfatidil Inositol 3 Kinasa.
- PPVs:** Plasmalemal Precursor Vesicles, vesículas precursoras del plasmalema.
- Rsk2:** Ribosomal s6 kinase 2, protein kinasa s6 ribosómica.
- shRNA:** Small hairpin RNA, RNA de horquilla pequeña.
- SM:** Sec1/Munc18-like proteins, proteínas de la familia Sec1/Munc18.
- SN:** Sobrenadante.
- SNAP23, 25 y 29:** Synaptosomal Associated Protein of 23, 25 and 29Kd, proteínas asociadas a sinaptosomas de 23, 25 y 29 Kd, respectivamente.
- SNARE:** SNAP Receptors, receptores del factor SNAP.
- ssRNA:** Scrambled shRNA, secuencia shRNA sin sentido.
- SEM:** Standard Error of the Mean, error estandar de la media.
- TeNT:** Tetanic Neurotoxin, neurotoxina tetánica.
- TGN:** Trans Golgi Network, red del Trans Golgi.
- TI-VAMP:** Toxin-Insensitive VAMP, VAMP insensible a neurotoxinas.
- t-SNARE:** Target SNARE, SNARE de la membrana blanco.
- v-SNARE:** Vesicular SNARE, SNARE presente en la membrana de la vesícula.
- VAMP2, 4 y 7:** Vesicle Associated Membrane Protein 2, 4 and 7, proteínas de membrana asociadas a vesícula 2, 4 y 7, respectivamente.