

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA MAP6D1 EN EL APARATO DE GOLGI Y EL MANTENIMIENTO DE LA POLARIDAD NEURONAL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas.



Tesinista: SAUCEDO, Daniela Macarena

Firma.....

Director: Dr. BISBAL, Mariano

Firma.....

Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra

INIMEC-CONICET-UNC

Año 2018

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA MAP6D1 EN EL APARATO DE GOLGI Y EL MANTENIMIENTO DE LA POLARIDAD NEURONAL

Tribunal Examinador:

Dra. CARRER, Dolores

Firma:.....

Dra. CRAGNOLINI, Andrea

Firma:.....

Dra. SÁNCHEZ, Mariela

Firma:.....

Calificación:

Fecha:

ÍNDICE

Resumen.....	5
Introducción.....	6
Hipótesis de trabajo.....	11
Objetivo General.....	12
Objetivos Específicos.....	12
Materiales y Métodos.....	13
Resultados.....	18
Discusión.....	34
Conclusión.....	41
Bibliografía.....	42
Agradecimientos.....	46

Tabla de abreviaturas

AG: Aparato de Golgi

GOPs: “Golgi out-post” o Mini-Aparato de Golgi

MT: Microtúbulos

RE: Retículo Endoplasmático

PALABRAS CLAVES: APARATO DE GOLGI, POLARIDAD NEURONAL, GOLGI OUTPOSTS, MICROTÚBULOS, MEMBRANA PLASMÁTICA, AXÓN, DENDRITA.

RESUMEN

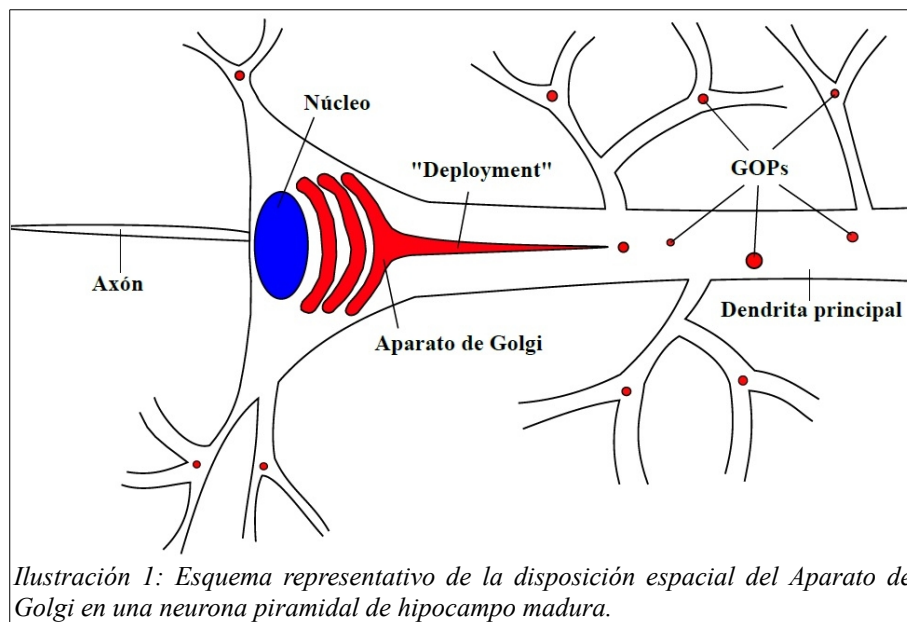
Las neuronas son células altamente polarizadas de las cuales se extienden varias dendritas cortas y gruesas, y un axón funcionalmente distintivo largo, delgado y muy ramificado, que se diferencian no solo en su morfología, sino también en las proteínas de membrana y organelas. En las neuronas piramidales, el Aparato de Golgi tiene una distribución polarizada que juega un importante rol en el desarrollo y mantenimiento de la polaridad neuronal. Además, se complementa con estaciones de Golgi satelitales (GOPs por sus siglas en inglés *Golgi outpost*) en las dendritas, los cuales juegan un papel crucial en la plasticidad neuronal y en el desarrollo del árbol dendrítico. Sin embargo, siguen existiendo muchas preguntas sobre los mecanismos que regulan la distribución espacial del Aparato de Golgi. Map6D1 es una proteína cuya expresión está altamente regulada en neuronas diferenciadas y contiene dos dominios funcionales importantes: un dominio amino terminal que puede interactuar con las membranas del Aparato de Golgi a través de la palmitoilación de residuos cisteína, y un dominio Mn que tiene la habilidad de interactuar con los microtúbulos. En neuronas en cultivo, Map6D1 se localiza en el Aparato de Golgi somático y en los GOPs de los compartimentos dendríticos. Nuestras observaciones sugieren que Map6D1 puede actuar como un regulador de la organización y posicionamiento del Aparato de Golgi en neuronas piramidales, un fenómeno que puede ser de gran importancia para generar y mantener la forma del árbol dendrítico y la polaridad neuronal.

En este trabajo nos proponemos a analizar la participación de MAP6d1 en la regulación de la organización, estructura y dinámica del Aparato de Golgi en neuronas en desarrollo en cultivo, y su influencia en la formación y mantenimiento de la polaridad neuronal.

INTRODUCCIÓN

Las neuronas son células altamente polarizadas que poseen la capacidad de desarrollar largos y ramificados axones, y múltiples dendritas típicamente más cortas y muy ramificadas. Estos dos tipos de procesos neuronales están divididos en subcompartimentos específicos. Esta llamativa asimetría y complejidad de las células neuronales es necesaria para recibir, procesar y transferir señales eléctricas con cada dominio, cumpliendo una función precisa en estos procesos. Existe considerable interés en dilucidar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la formación y mantenimiento de la polaridad neuronal (Bentley y Banker 2016; Schelski y Bradke 2017) ya que esta información es de fundamental importancia no sólo para entender el desarrollo y el normal funcionamiento del sistema nervioso, sino también la patogenia de enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple, entre otras (Passemar et al. 2017; Pellegrini et al. 2017; Penazzi et al. 2016). Para formar y mantener los distintos compartimentos neuronales deben existir numerosos mecanismos que regulen el transporte de proteínas y de membrana a cada subcompartimento específico, y que aseguren su correcta composición molecular (Hanus y Ehlers 2016; Lasiecka et al. 2008). La vía biosintética de secreción transporta membrana y nuevas proteínas de membrana desde el Retículo Endoplasmático (RE) vía el Aparato de Golgi (AG) y la red de *trans*-Golgi (TGN por *Trans*-Golgi-Network) a la membrana plasmática. En neuronas, el RE se encuentra disperso a través del citoplasma, incluido dentro del axón y las dendritas. Sin embargo, el AG neuronal no sólo se encuentra organizado en un arreglo pericentriolar, sino que también puede encontrarse en estructuras discretas, llamadas Golgi satélites, mini-Aparato de Golgi (mini-AG) o “Golgi outpost” (GOPs), dispersas en el árbol dendrítico y excluidas del axón (Hanus y Ehlers 2016). Estos elementos de Golgi dendrítico se encuentran separadas del AG somático, sin embargo comparten los mismos marcadores moleculares como TGN38, GM130, e inclusive enzimas residentes del AG como manosidasa II y galactosil transferasa (GalTase) (Horton y Ehlers 2004; Pierce y Jasin 2001; Valenzuela y Perez 2015). Por otra parte, estas estructuras también procesan proteínas de membrana y proteínas secretorias (Horton et al. 2005), y son importantes en el desarrollo dendrítico, ya que se los ha observado frecuentemente en dendritas con rápido crecimiento y en los puntos de ramificación dendríticos (“branching points”) (Jan y Jan 2010; Ye et al. 2007)

(Ilustración 1). En neuronas piramidales, los GOPs se encuentran selectivamente enriquecidos en la dendrita más larga o compleja en cultivo, principalmente en los puntos de ramificación dendríticos (Horton et al. 2005). Recientemente nuestro laboratorio ha publicado evidencias experimentales que sugieren que los GOPs destinados a las dendritas apicales son generados a partir del AG somático a través de una secuencia de eventos que involucra la generación de una extensión derivada del AG, la elongación de la misma que ingresa en la dendrita apical, su fisión, y la posterior condensación y transporte del GOP (Quassollo et al. 2015). También se ha demostrado que este proceso está regulado por una vía de señalización mediada por la activación de la GTPasa pequeña RhoA y la quinasa ROCK (Quassollo et al. 2015). Junto a otros laboratorios, también se ha observado que la inhibición de proteínas que regulan esta vía de señalización perjudica la normal salida y distribución polarizada de proteínas de membrana, que afectan severamente el crecimiento y el mantenimiento de la morfología del árbol dendrítico (Bisbal et al. 2008).



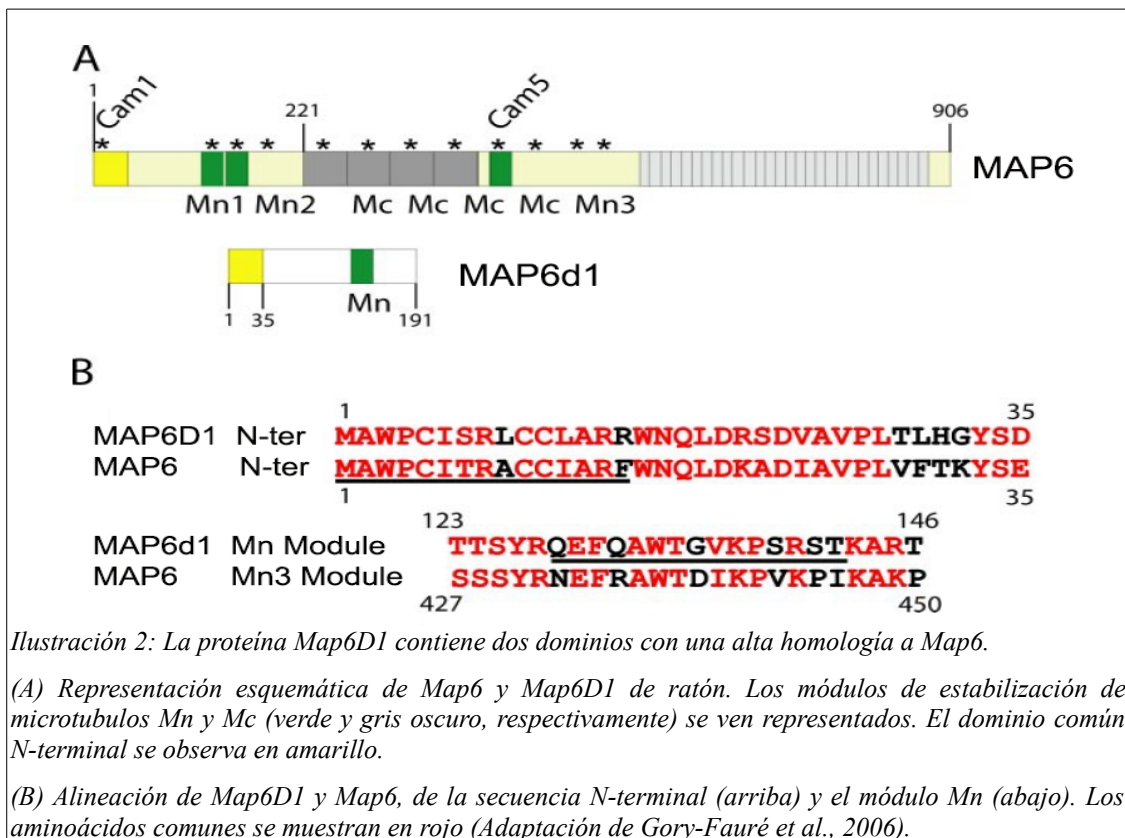
Asimismo, el AG ha sido implicado en diferentes aspectos de la polaridad neuronal. En la neurona naciente, la posición del AG y el centrosoma se correlacionan con el sitio donde se formará el futuro axón, es decir el polo basal de la neurona piramidal madura (de Anda et al. 2010). Más tarde, el AG somático se posiciona de forma polarizada, orientándose hacia la dendrita apical y opuesta al axón (Horton et al. 2005; Meseke et al. 2013). En este estadio, el

transporte secretorio de las vesículas que se fisioan del AG es predominantemente dirigido hacia la dendrita principal, sugiriendo que esta organización espacial de la vía secretoria es importante para la morfogénesis neuronal y el desarrollo asimétrico del árbol dendrítico (Förster 2014; Horton et al. 2005). En efecto, la inhibición de la salida de vesículas del Aparato de Golgi afecta severamente el crecimiento dendrítico y el mantenimiento de la morfología del árbol dendrítico, sin afectar el crecimiento axonal (Bisbal et al. 2008; Horton et al. 2005; Ye et al. 2007). Por otra parte, la desorganización de la estructura del AG durante el crecimiento asimétrico de las dendritas, a través de la sobreexpresión de la proteína GRASP65, que causa la vesiculización del AG pero que no afecta su función secretoria, produce neuronas con dendritas simétricas sin afectar su largo total (Horton et al. 2005). Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares que regulan el posicionamiento del AG y GOPs dentro de las neuronas son poco conocidos. En este sentido, recientes estudios han demostrado dos vías de señalización que influyen en la morfogénesis del AG y regulan la polaridad neuronal vía la proteína de la matriz del AG GM130. Matsuki et al (2010) y Meseke et al (2013) han demostrado que la fosforilación de GM130 por medio de una vía de señalización promueve la condensación del AG y el desarrollo del axón, mientras que una vía diferente provoca un efecto antagónico, resultando en una morfología del AG más extendida durante el desarrollo del árbol dendrítico. Estos resultados demuestran que el AG neuronal no sólo es importante para dirigir la expansión de membrana durante el crecimiento neuronal, sino que también cumple un rol fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad neuronal.

La localización, estructura y función del AG está íntimamente relacionada con la organización del citoesqueleto. Se puede afirmar que el citoesqueleto contribuye a mantener una organización estructural del Aparato de Golgi a través de dos eventos fundamentales: primero, los MTs y sus proteínas asociadas determinan la localización perinuclear del complejo de Golgi alrededor del centrosoma, la despolimerización de los MTs resulta en la fragmentación y dispersión del AG (Thyberg y Moskalewski 1999), mientras que el citoesqueleto de actina con sus proteínas asociadas establecen la continuidad y aspecto típico de las cisternas. El motor microtubular dineína citoplasmática media principalmente el movimiento de los cargos hacia el AG y el posicionamiento de esta organela (Kardon y Vale 2009; Yadav et al. 2012), y en *Drosophila* se observó que también es importante para la

localización de los GOPs en el árbol dendrítico (Arthur et al. 2015; Lin et al. 2015; Ye et al. 2007). Este motor se mueve a través de los microtúbulos hacia el extremo *menos* que se encuentra integrado al centrosoma. El movimiento centrípeto está regulado por una serie de factores cuya función precisa no se ha determinado (Kardon y Vale 2009). La estructura y el posicionamiento del AG son dinámicos y están altamente regulados en las células. Algunas líneas de evidencia también demuestran que en procesos neurodegenerativos, como la esclerosis lateral amiotrófica y Alzheimer, el AG se dispersa y fragmenta en un evento temprano y probablemente irreversible en estas enfermedades (Jaarsma y Hoogenraad 2015). También se ha observado que el fraccionamiento del AG es un evento “disparador” en procesos de apoptosis. Todas estas evidencias demuestran la importancia de la regulación en el posicionamiento y la morfología del AG (Gonatas et al. 2006). En procesos de polarización, la posición del AG es importante debido a que se organiza en el eje de la polaridad celular. En algunos tipos celulares, esto promueve la secreción directa de membrana hacia sitios especializados de la membrana plasmática, y por lo tanto es necesario para el mantenimiento de estructuras especializadas para diversos procesos como la cicatrización de heridas, la formación de sinapsis inmunológicas, la determinación del axón, y la formación y mantenimiento del árbol dendrítico (Etienne-Manneville y Hall 2001; Horton et al. 2005; Prigozhina y Waterman-Storer 2004; Rosso et al. 2004). La inhibición del complejo dineína, ya sea a través de la cadena pesada o a través de alguno de sus componentes asociados (cadenas intermedias, livianas, complejo dinactina), provoca que el AG se fragmente en pequeñas estructuras vesiculares, “*stacks*”, que se encuentran dispersos e inmóviles en el citoplasma, lo que sugiere que el continuo transporte de membrana dirigido por este motor microtubular, es esencial para la localización y posicionamiento subcelular del AG (Harada et al. 1998; Palmer et al. 2009; Yadav y Linstedt 2011). El Aparato de Golgi es sumamente dinámico, y su integridad depende de numerosas vías. De esta manera, se han propuesto una serie de criterios necesarios para identificar el complejo receptor de la dineína en el AG: (a) La inhibición o sobreexpresión debe bloquear la movilidad del AG. (b) La localización debe coincidir con la dineína en el AG. (c) Debería contener dos dominios, uno que interaccione directamente con un componente del complejo dineína y otro que medie su localización en el AG. (d) La interacción de dineína con el receptor, o la interacción del receptor con membrana debe ser altamente reguladas (Yadav y Linstedt 2011).

La proteína MAP6d1 (*MAP6 domain-containing protein 1*) es una proteína de 21-kDa que se expresa específicamente en cerebro (Gory-Fauré et al. 2006). Esta proteína contiene dos dominios con alta homología a la proteína de unión a microtúbulos MAP6 (*Microtubule Associated Protein 6*), una proteína que tiene la propiedad de estabilizar el citoesqueleto microtubular ante estímulos depolimerizantes como el tratamiento con la droga Nocodazol o la exposición al frío (Bosc et al. 2001; Bosc et al. 2003; Delphin et al. 2012) (Ilustración 2). Las proteínas MAP6 son importantes en funciones sinápticas; el ratón *knock-down* presenta anomalías en la plasticidad sináptica a largo y corto término, asociados con problemas comportamentales severos relacionados con enfermedades tales como la esquizofrenia (Andrieux et al. 2002; Deloulme et al. 2015).



El dominio amino terminal de MAP6d1 tiene una alta homología con la proteína de unión a microtúbulos MAP6: contiene tres cisteínas con capacidad de ser palmitoiladas, lo cual permite su interacción con membrana. MAP6d1 posee un segundo dominio en el carboxilo terminal con alta homología con el módulo Mn3, presente en las proteínas MAP6,

que tiene la capacidad de interactuar y estabilizar microtúbulos (Bosc et al. 2001; Gory-Fauré et al. 2006). En neuronas de hipocampo en cultivo, la proteína MAP6d1 se localiza en el AG somático y en los GOPs en el compartimiento dendrítico (Gory-Fauré et al. 2006). Estudios de sobreexpresión en líneas celulares demostraron que la localización en el Aparato de Golgi es regulada por el dominio amino terminal a través de la palmitolación de las tres cisteínas (Gory-Fauré et al. 2014).

La proteína MAP6d1 interactúa con la proteína Tctex a través del dominio Mn (Brocard et al. 2017). Tctex es una cadena liviana de la dineína que interactúa con el cargo del motor microtubular (Tai et al. 1998). Se ha descrito, además, que Tctex es importante para la formación axonal, ya que modula la vía de señalización de las Rho GTPasas pequeñas de manera independiente de la unión al complejo dineína (Chuang et al. 2005; Conde et al. 2010). Tctex se localiza también en el Aparato de Golgi (Tai et al. 1998) y la disminución de los niveles de expresión de Tctex en células no polarizadas, fragmenta el Aparato de Golgi, lo que sugiere que esta proteína es importante para el posicionamiento del AG (Palmer et al. 2009).

Así, todas estas características y resultados proponen la siguiente hipótesis de trabajo:

La proteína MAP6d1 podría actuar como un importante regulador de la organización y posicionamiento del Aparato de Golgi en neuronas piramidales diferenciadas, un fenómeno que sería de importancia para generar y mantener el árbol dendrítico y, por lo tanto, la polaridad neuronal.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación de MAP6d1 en la regulación de la organización, estructura y dinámica del Aparato de Golgi en neuronas en desarrollo en cultivo, y su influencia en la formación y mantenimiento de la polaridad neuronal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el rol de la proteína MAP6d1 en la morfología y posicionamiento del Aparato de Golgi somático en neuronas de hipocampo.
2. Caracterizar el rol de la proteína MAP6d1 en la formación de los mini-Aparato de Golgi en dendritas de neuronas piramidales de hipocampo.
3. Evaluar la importancia de la proteína MAP6d1 en el mantenimiento de la polaridad neuronal, principalmente en la formación y morfología del árbol dendrítico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos neuronales: El cultivo primario de neuronas de hipocampo es la herramienta experimental de elección para estudios de crecimiento neurítico y desarrollo de polaridad morfológica (Bentley and Banker 2016). Así, en este sistema se ha estudiado con gran detalle la dinámica del crecimiento neurítico y los cambios ultraestructurales y bioquímicos que preceden y acompañan el desarrollo diferencial de axones y dendritas.

Los cultivos de neuronas piramidales de hipocampo fueron realizados a partir de embriones de 18 días de gestación (E18). Las ratas madres fueron sacrificadas, los embriones removidos de la cavidad abdominal y colocadas en una cápsula de Petri estéril. Luego, fueron decapitados y las cabezas colocadas en cápsulas estériles que contenían buffer HANK (ClNa 0,8 mg %, ClK 40mg %, Na₂HPO₄·2H₂O 6,21mg %, KH₂PO₄ 6 mg %). Posteriormente se procedió a disecar el hipocampo, procedimiento que se realizó bajo observación microscópica, mediante el empleo de instrumental quirúrgico para micro-disección.

El tejido nervioso así obtenido fue colectado en tubos estériles e incubados durante 15 minutos en una solución de tripsina 0,25%/HANK's a 37°C en un baño termostatzado. Luego, se extrajo la solución de tripsina y el tejido fue lavado 3 veces con HANK's. Finalmente, el tejido tripsinado fue disociado mecánicamente mediante el uso de una pipeta Pasteur de punta fina, y la suspensión celular, así obtenida, fue sembrada sobre vidrios de 12 milímetros de diámetro, previamente tratados con poli-L-lisina (1mg/ml en buffer borato pH 7,4) (Sigma Ch. co). Las células fueron sembradas en una densidad aproximada de 5000 a 15000 células por cm² y mantenidas en medio de cultivo (Dulbecco's modified Eagles médium DMEM) suplementado con 10% de suero de caballo (Gibco), Penicilina/Estreptomycin 100µg/ml, Glutamina 2mM y Piruvato 11 mg % por 2 horas.

Posteriormente, el medio fue remplazado por el medio de mantenimiento Neurobasal suplementado con B27 Penicilina/Estreptomycin 100µg/ml y Glutamina 2mM (Gibco). Todos los cultivos fueron mantenidos en un incubador húmedo a 37°C y con 5% de CO₂, durante 9-15 días. Estos tiempos celulares fueron escogidos porque es a los 9 días *in vitro* donde la proteína Map6D1 comienza a expresarse en experimentos neuronales (Gory-Fauré et al. 2006), mientras que a los 15 d.i.v tanto el Aparato de Golgi como la neurona piramidal de hipocampo se encuentran en un estado maduro (Horton et al. 2005).

Transfección de cultivos primarios: Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo fueron transfectados utilizando Lipofectamina LTX (low toxicity) (Invitrogen). Antes de la transfección, el medio de cultivo condicionado fue removido y recuperado. Las células fueron mantenidas en 1,5ml de medio OptiMEM (Gibco) por cápsulas de 35mm. Se preparó una mezcla con una concentración previamente definida de DNA más 250µl de la solución de OptiMEM/lipofectamina (4µl de lipofectamina y 250µl de OptiMEM por cada tratamiento). La solución fue incubada 20 minutos a temperatura ambiente antes de ser agregada a los cultivos celulares. Una vez adicionada la solución, los cultivos son colocados nuevamente en el incubador por un mínimo de 2 horas y, luego de ese tiempo, el medio de transfección es removido y reemplazado por el medio condicionado hasta el momento de la fijación.

Inmunofluorescencia: se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia de simple y doble marca para la detección cualitativa y semicuantitativa de las proteínas transfectadas, así también para la visualización de la morfología neuronal y el posicionamiento del Aparato de Golgi. Las células cultivadas sobre vidrios fueron fijadas con una solución de 4% (p/v) paraformaldehído - 4% (p/v) sacarosa en buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2; 0.1M) durante 20 minutos a 37°C.

Las células fijadas fueron lavadas con PBS a temperatura ambiente, y permeabilizadas con una solución de 0.2% Tritón-X100 en PBS durante 5 minutos. Luego fueron lavadas 3 veces con PBS. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados por 1 hora a temperatura ambiente con albúmina bovina al 5% en PBS. A continuación, se incubó con los anticuerpos primarios (diluidos en albúmina bovina al 1% en PBS) a temperatura ambiente por 1 a 3 horas. Por último, las células fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con PBS e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes. Después de ser lavados 3 veces por 5 minutos con PBS, los vidrios fueron montados sobre portaobjetos utilizando como medio de montaje Fluorsave (Calbiochem).

Microscopía y Procesamiento digital de imágenes: para examinar la morfología del Aparato de Golgi, tanto somático como dendrítico (GOPs), y la morfología del árbol dendrítico en neuronas que sobreexpresan distintas construcciones, se utilizó microscopía de

epifluorescencia y microscopía de fluorescencia confocal combinada con procesamiento digital de imágenes (Microscopio invertido Axiovert 200M Zeiss equipado con epifluorescencia, microscopio invertido Olympus IX81, equipado con un módulo de disco giratorio -DSU-) e iluminación de epifluorescencia (lámpara de Xenon 150W). Las imágenes fueron analizadas digitalmente a través del programa de procesamiento de imagen digital de dominio público ImageJ.

Plásmidos: Nuestro laboratorio cuenta con una batería de cDNAs, que nos permitió modificar los niveles de expresión y/o actividad de las proteínas de nuestro interés, así como también visualizar la arquitectura del Aparato de Golgi.

Utilizamos para la marcación del Aparato de Golgi un cDNA que codifica para la proteína Galactosil-transferasa 2 (GALT2), enzima residente de la porción TGN del Aparato de Golgi fusionada a la proteína roja fluorescente (mCherry). Además, se usaron para este trabajo cDNA recombinantes que codifican para:

- MAP6d1-WT-Myc, constructo que expresa la proteína MAP6d1 salvaje fusionado al “tag” Myc.
- MAP6d1-3G-Myc, constructo que expresa la proteína MAP6d1 fusionada con el “tag” Myc, con mutaciones puntuales en las 3 cisteínas que tienen la capacidad de ser palmitoladas, por 3 glicinas y, por lo tanto, es incapaz de interactuar con las membranas del AG.
- MAP6d1- Δ Mn3-Myc, constructo que expresa la proteína MAP6d1 fusionada con el “tag” Myc, la cual tiene delecionado el dominio Mn3, por lo tanto es incapaz de interactuar con microtúbulos.
- shANRi shLuciferasa-GFP (shLuc), una pequeña horquilla de ARN de interferencia contra una secuencia de la proteína luciferasa, utilizado como control en los experimentos y que expresa de manera independiente la proteína verde fluorescente GFP.
- shMAP6d1-GFP, plásmido que expresa un ARNi dirigido contra la proteína MAP6d1 y que expresa de forma independiente la proteína GFP para facilitar su observación.
- pYFP, plásmido que expresa la proteína amarilla fluorescente soluble y que nos permite visualizar el contorno celular utilizado para el estudio de la morfología del árbol dendrítico.

Anticuerpos: Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos:

1)- Anticuerpos primarios:

- Anticuerpo monoclonal anti-c-myc, un péptido sintético correspondiente a los residuos 408-439 de la proteína humana p62 c-myc (clon E10, Sigma, Missouri 63103, USA). Dilución 1: 2000.

2)- Anticuerpos secundarios:

- Anti-IgG de ratón conjugada con fluoresceína (Alexa Fluor® 586). Dilución 1:1000.

Análisis de la morfología y posicionamiento del AG: utilizando el programa de procesamiento digital de imágenes de dominio público ImageJ, se crearon figuras binarias de las fotografías tomadas de los cultivos neuronales. Usando las imágenes como referencia, se realizaron los cálculos necesarios con el software ImageJ, cuantificando los siguientes parámetros que miden los cambios morfológicos del Aparato de Golgi sometido a las distintas condiciones experimentales:

- Índice de compactación denominado “C”, donde $C = 4 \pi * [(sumatoria\ del\ área\ del\ Aparato\ de\ Golgi) / (sumatoria\ del\ perímetro\ del\ Aparato\ de\ Golgi)^2]$. Este coeficiente puede tomar un valor máximo de 1, momento en el que se presentará la máxima compactación (o circularidad), y a valores cada vez menores tendremos un Aparato de Golgi más laxo, es decir menos compacto (Bard et al. 2003).

- Área total del Aparato de Golgi en el soma neuronal.

- Número de fragmentos de AG dispersos en el soma neuronal.

En estas neuronas también estudiaremos la polarización del AG somático hacia la dendrita más larga, analizando la distribución radial del AG en el cuerpo celular. Para ello se ha generado un análisis de cuadrante, el cual consiste en dividir la neurona en estudio en 4 cuadrantes, siendo el cuadrante 1 o “Apical” (C1) el que contenga la dendrita de mayor tamaño y más desarrollada de la neurona. El resto de los cuadrantes se toman en sentido a las agujas del reloj, siendo el cuadrante 3 (C3) el opuesto al del “Apical” y los cuadrantes 2 y 4 (C2 y C4) los laterales. Una vez definidos los cuadrantes, se calculó el porcentaje total de Aparato de Golgi en la porción “Apical” mediante el uso del programa ImageJ, el cual midió la intensidad de la señal del fluoróforo unido al AG.

También se cuantificó el porcentaje de células que contienen el AG extendido hacia la

dendrita principal (“deployment”), y la cantidad que lo tengan o no fragmentado. La presencia de fragmentación del “deployment” se corresponde con la presencia de GOPs en la neurona. Además, se determinó el largo de dichas extensiones tomado desde el centro del soma neuronal hasta el punto más extremo del “deployment”.

Análisis de la complejidad del árbol dendrítico: En las imágenes binarias de las neuronas en cultivo obtenidas mediante el software ImageJ, se generaron círculos concéntricos ubicados a la misma distancia entre sí, manteniendo el centro de los mismos en el soma neuronal, utilizando el plugin “*Sholl Analysis*”, según el análisis de la complejidad dendrítica diseñado por Sholl en 1953. De esta manera se ha cuantificado el número de veces que los procesos dendríticos interseccionan con dichos círculos y así obtener una idea del crecimiento dendrítico a medida nos alejamos del soma. Estos experimentos nos permitirán determinar el efecto de la proteína MAP6d1 a través de su función en el AG, en el mantenimiento de la polaridad neuronal, y en el efecto en la asimetría y complejidad del árbol dendrítico en neuronas piramidales de hipocampo.

Análisis estadístico: El análisis se realizó mediante el programa GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad Software, Inc. Estados Unidos). Para las comparaciones de dos valores medios, se eligió la prueba *T de Student*. Se utilizó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA), y el test de Tukey como test a posteriori (post hoc) para la comparación de medias. Niveles de $p < 0.05$ se consideraron significativos. Los test estadísticos y los niveles de significancia utilizados se aclaran en los resultados de cada experimento.

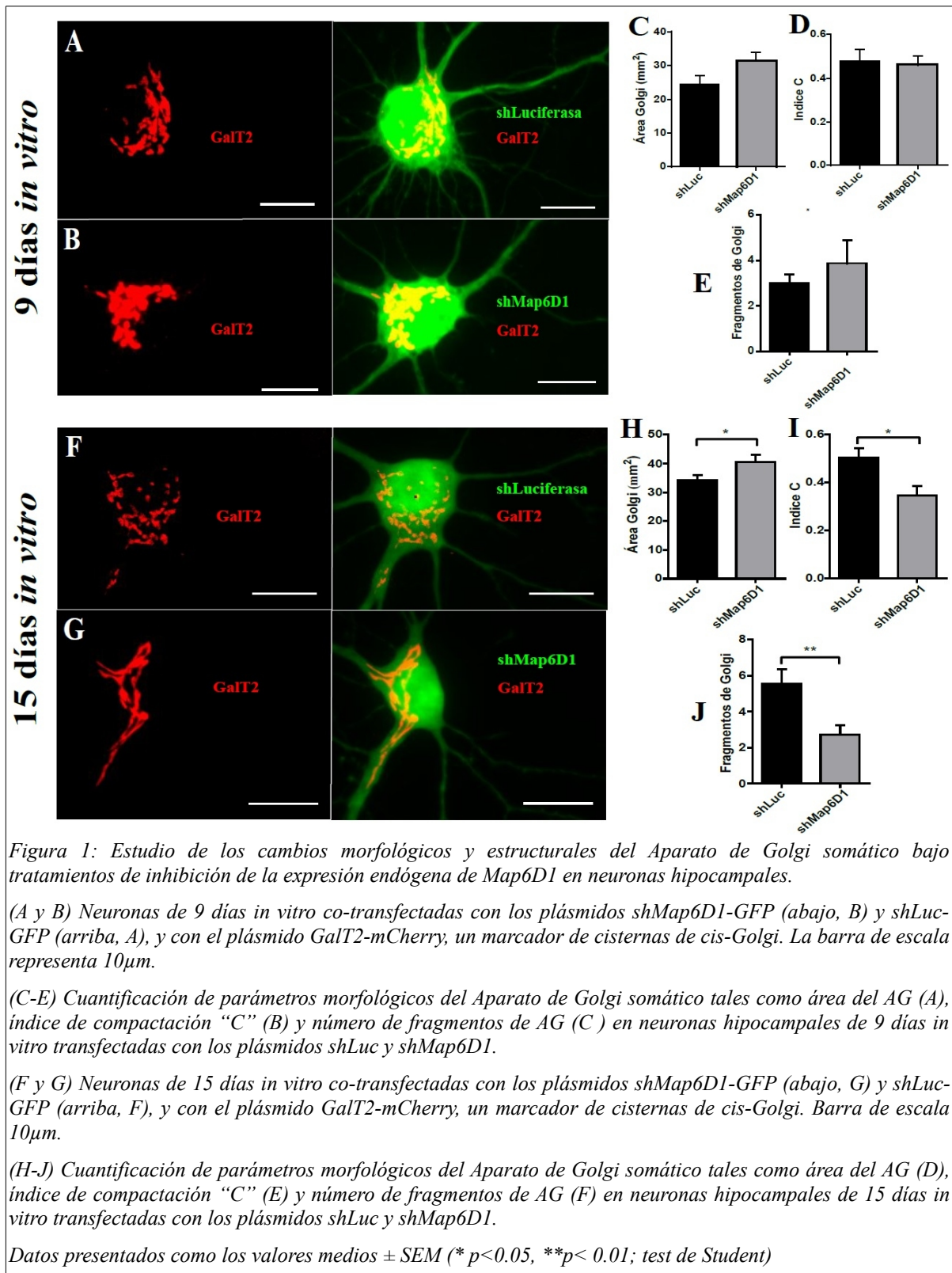
RESULTADOS

1) Map6D1 regula la morfología del Aparato de Golgi somático

En neuronas diferenciadas de hipocampo en cultivo, el Aparato de Golgi se encuentra distribuido de manera polarizada con el AG somático, que se extiende hacia la dendrita apical, y en pequeñas estructuras discretas distribuidas a lo largo de las dendritas, llamadas Golgi outpost o miniAG.

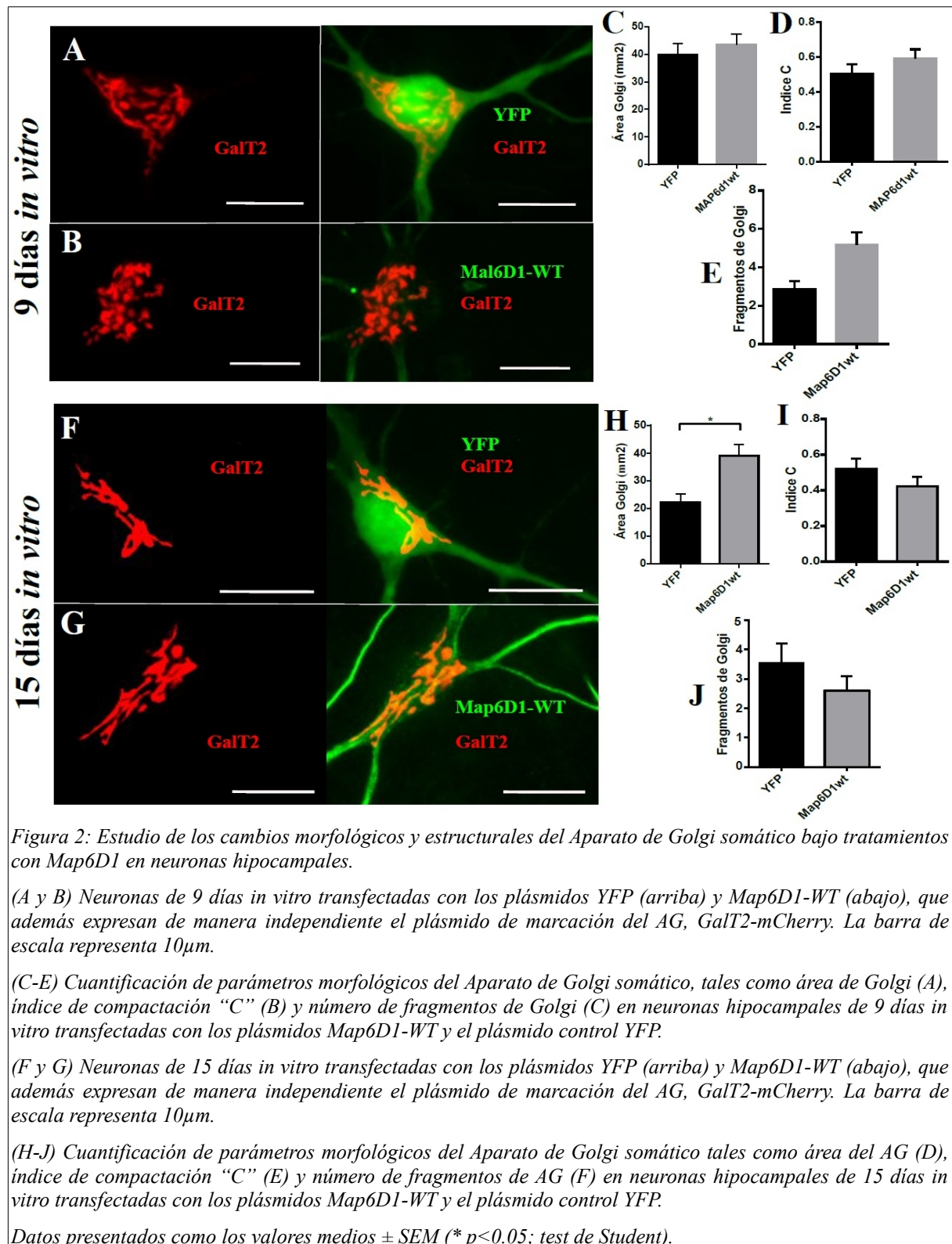
Con el objetivo de estudiar la participación de la proteína Map6D1 sobre la morfología y distribución del Aparato de Golgi neuronal, el primer conjunto de experimentos se centró en estudiar el efecto de la inhibición de la expresión de la proteína Map6D1 endógena en neuronas diferenciadas en cultivo. Para estos experimentos, se utilizó un plásmido generado y validado en nuestro laboratorio que expresa horquillas pequeñas de ARN de interferencia (shRNAi, del inglés *short harpin RNA interference*) dirigidos específicamente contra Map6D1. Este plásmido también expresa, independientemente, la proteína verde fluorescente GFP. De esta manera, se transfectaron neuronas de 8 y 14 días *in vitro* (d.i.v) con el plásmido shMap6D1, y con un segundo plásmido control que expresa un shARNi contra la proteína luciferasa (shLuc). Para observar el efecto del silenciamiento génico sobre Map6D1, las neuronas fueron fijadas 24hs posterior a la transfección.

Mediante el uso de microscopia confocal y el procesamiento digital de imágenes, exploramos en detalle distintos parámetros de la morfología del Aparato de Golgi, como el área total, el índice de compactación “C” (un parámetro que nos permite evaluar el grado de distensión del AG -ver materiales y métodos-), y los fragmentos que forman el AG somático . Los resultados observados indican que no hay diferencias significativas en los distintos parámetros morfológicos del AG en los cultivos de 9 d.i.v transfectadas con shMap6D1 y con shRNAi control (Figura 1 A-E). Sin embargo, las neuronas transfectadas a los 14 d.i.v con el plásmido shMap6D1 (Figura 1G) presentaron el área del AG más grande con cisternas alargadas, proyectando hacia la dendrita más desarrollada. Estas neuronas presentan diferencias significativas, tanto en el área del AG (Figura 1H), en el índice de compactación (Figura 1I), como en el número de fragmentos que conforman el AG (Figura 1J), comparados con las células transfectadas con los shARNi control (Figura 1F).



Los resultados observados en los experimentos de inhibición de la expresión de Map6D1, fueron complementados con experimentos de sobre-expresión. Para ello, co-transfectamos neuronas de 8 (Figura 2B) y 14 d.i.v (Figura 2G) con un plásmido que expresa la proteína Map6D1 salvaje fusionada al epítotope Myc, con el plásmido GalT2-mCherry. Los resultados obtenidos en los tratamientos de sobre-expresión presentaron diferencias significativas solo en el área del Aparato de Golgi en los cultivos neuronales de 15 d.i.v (Figura 2H), donde se observa que el área es casi el doble que en los casos control. En cambio, los resultados del índice de compactación (Figura 2I) y el número de fragmentos de Golgi (Figura 2J) no presentaron diferencias significativas. En los cultivos de 9 d.i.v, ninguno de los parámetros morfológicos difirió significativamente con los grupos controles (Figura 2 A-E).

El conjunto de estos resultados sugiere fuertemente que Map6D1 es una proteína importante en el mantenimiento del tamaño y de la morfología del AG somático, y que este efecto depende del estado de desarrollo de las neuronas piramidales de hipocampo.



2) Map6D1 regula la polarización del AG en neuronas de hipocampo en cultivo.

En una neurona piramidal madura de hipocampo polarizada *in vivo*, el Aparato de Golgi se posiciona en el lado apical de la neurona, cerca de la dendrita apical (Horton et al. 2005), y opuesto al lado basal, lugar donde nace el axón (de Anda et al. 2010; de Anda et al. 2005; Zmuda y Rivas 1998). Una dispersión del AG provoca la falta de asimetría dendrítica y una ausencia de los lados apical-basal de la neurona piramidal (Horton et al. 2005). En cultivo, la zona apical de la neurona se corresponde con la porción donde se encuentra la dendrita más larga y compleja de la célula (Horton et al. 2005).

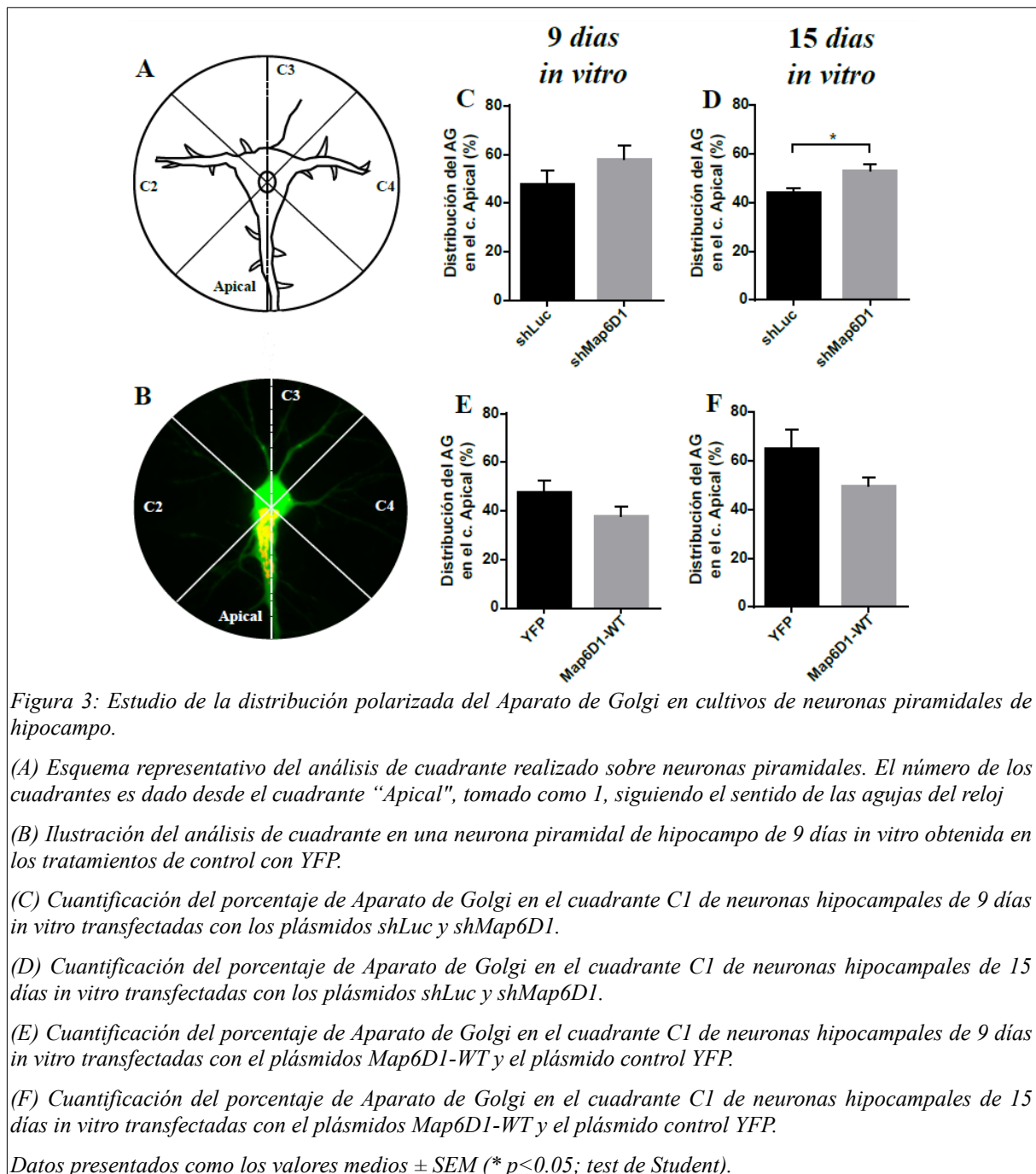
Teniendo en cuenta que una correcta diferenciación de los lados apical y basal de las neuronas piramidales son fundamentales para su correcto funcionamiento, el siguiente conjunto de experimentos se centró en analizar la participación de la proteína Map6D1 en la distribución espacial polarizada del AG en neuronas piramidales de hipocampo de 9 y 15 d.i.v. Para ello, se efectuó un análisis de cuadrante, teniendo en cuenta que el cuadrante 1 es aquel que corresponde a la porción donde estaría incluida la dendrita apical, es decir, la dendrita más larga y compleja en cultivo (Horton et al. 2005); mientras que el cuadrante 3 (C3) es el correspondiente al lado basal de la neurona, y los cuadrantes 2 y 4 (C2 y C4) los laterales (Figura 3 A y B) (ver materiales y métodos).

Como primer paso, se transfectaron neuronas piramidales de 8 y 14 días *in vitro* con los plásmidos shMap6D1 y shLuc. Seguidamente, los cultivos fueron fijados 24hs posterior a la transfección y observados con microscopia confocal para observar el efecto del silenciamiento génico sobre Map6D1.

Mediante técnicas de procesamiento digital, se analizó la distribución polarizada del Aparato de Golgi en el cuadrante de la dendrita apical. Al comparar el porcentaje de AG en el cuadrante de la dendrita de mayor tamaño entre tratamientos, los resultados no mostraron diferencias significativas en los cultivos de 9 días *in vitro* (Figura 3C), mientras que las diferencias entre shMap6D1 y shLuc sí fueron significativas en neuronas de 15 d.i.v (Figura 3D), dando un mayor porcentaje de AG en el cuadrante C1 de cultivos transfectados con shMap6D1 en contraste con los cultivos con shLuc.

Para complementar estos resultados, se transfectaron neuronas piramidales de hipocampo de 8 y 14 d.i.v. con el plásmido Map6D1 salvaje y el control YFP con el plásmido GalT2-mCherry.

El análisis de la distribución del AG dentro del cuadrante correspondiente a la dendrita principal mostró que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en los cultivos de 9 (Figura 3E) y 15 (Figura 3F) días *in vitro*. Sin embargo, se puede observar una clara tendencia a la disminución del porcentaje de AG en el cuadrante apical cuando se sobreexpresa Map6D1.



Estos resultados sugieren que Map6D1 es una proteína que cumple un rol importante en la determinación de la distribución polarizada del Aparato de Golgi neuronal, según el estado de desarrollo de las neuronas piramidales de hipocampo.

3) Map6D1 regula la extensión del AG somático en neuronas piramidales en cultivo.

El Aparato de Golgi es una organela altamente dinámica que posee unas estructuras tubulares salientes, dirigidas hacia la dendrita apical de la neurona en crecimiento (referidas o conocidas como “deployment”) (Figura 4) (Matsuki et al. 2010). Esta estructura del AG parece ser importante en el transporte de vesículas y proteínas hacia la dendrita apical dentro de la neurona.

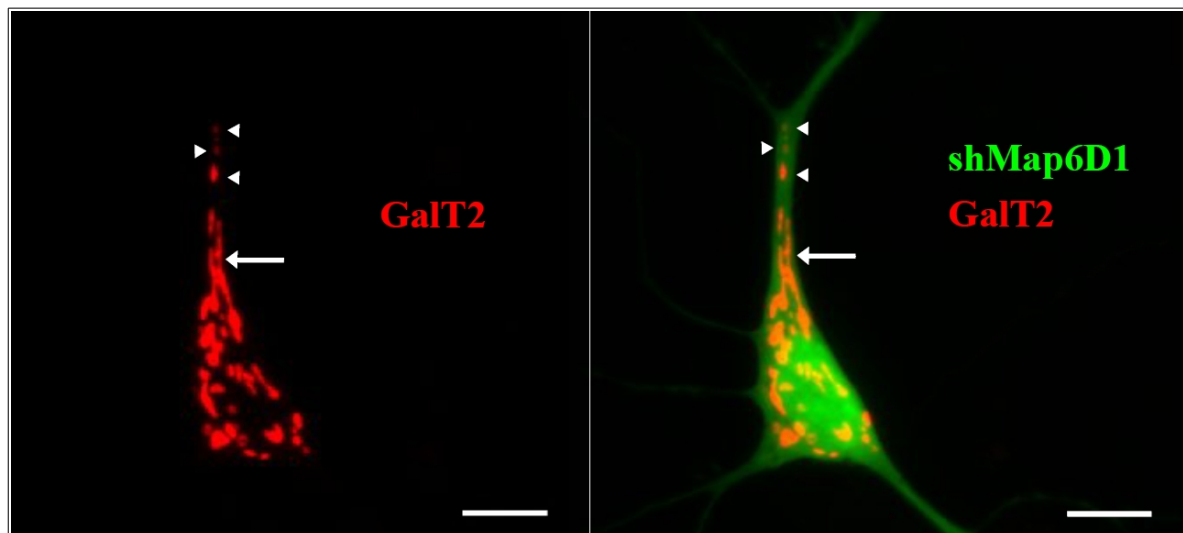


Figura 4: El Aparato de Golgi posee extensiones tubulares hacia la dendrita mas compleja de la neurona. Ejemplo de una neurona piramidal de 9 días *in vitro* transflectada con *shMap6D1* y *GalT2*. La flecha muestra la extensión del AG (“deployment”) hacia la dendrita principal, mientras que las puntas de flecha indican la fragmentación del mismo y la presencia de GOPs. La barra de escala representa 5 μ m.

El siguiente conjunto de experimentos se centró en identificar los cambios posicionales y morfológicos de estas extensiones tubulares o “deployments” del AG, inhibiendo la expresión endógena de Map6D1 en cultivos neuronales diferenciados. Para ello, se transflectaron neuronas piramidales de 8 y 14 días *in vitro* con los plásmidos *shMap6D1* y *shLuc*. Para observar el efecto del silenciamiento génico sobre Map6D1, las neuronas fueron fijadas 24hs posterior a la transfección.

Con microscopía confocal y el procesamiento digital de imágenes, se realizó un estudio

cuantitativo de la presencia/ausencia de las extensiones (Figura 5, A y B), y un análisis cuantitativo de longitud de deployment en las neuronas (Figura 5, C y D) tomado desde el centro del soma hasta el punto mas extremo de la extensión del AG.

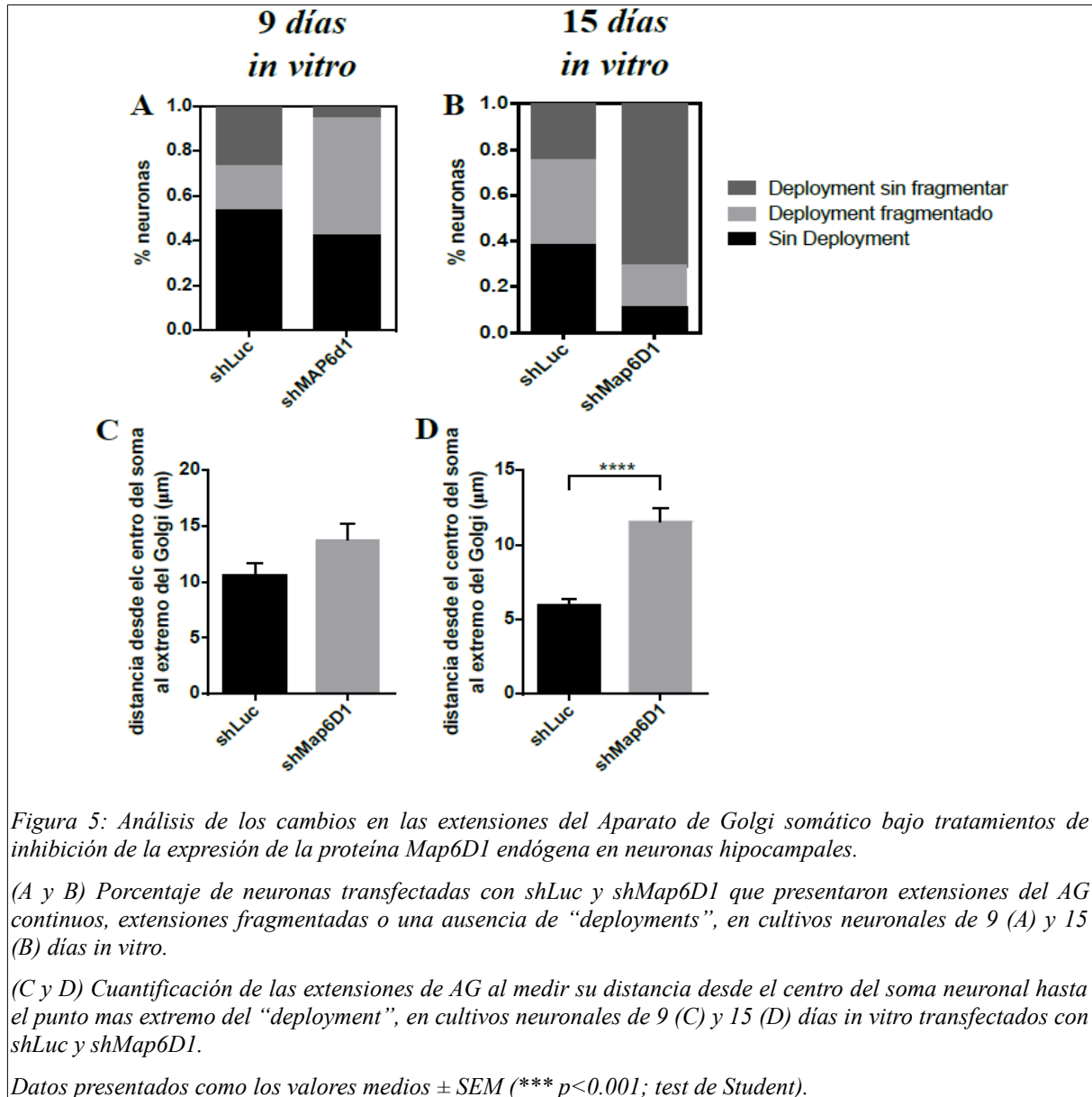


Figura 5: Análisis de los cambios en las extensiones del Aparato de Golgi somático bajo tratamientos de inhibición de la expresión de la proteína Map6D1 endógena en neuronas hipocampales.

(A y B) Porcentaje de neuronas transfectadas con shLuc y shMap6D1 que presentaron extensiones del AG continuas, extensiones fragmentadas o una ausencia de “deployments”, en cultivos neuronales de 9 (A) y 15 (B) días in vitro.

(C y D) Cuantificación de las extensiones de AG al medir su distancia desde el centro del soma neuronal hasta el punto mas extremo del “deployment”, en cultivos neuronales de 9 (C) y 15 (D) días in vitro transfectados con shLuc y shMap6D1.

Datos presentados como los valores medios \pm SEM (***) $p < 0.001$; test de Student).

Los resultados obtenidos en los cultivos de 9 días *in vitro* mostraron que, aunque no existen grandes diferencias en el porcentaje de células con extensiones presentes entre el tratamiento control shLuc ($47\% \pm 0,1\%$) y el tratamiento con shMap6D1 ($58\% \pm 0,2\%$), si se observó una gran variabilidad en el porcentaje de deployments fragmentados entre los tratamientos ($20\% \pm 0,1\%$ y $53\% \pm 0,2\%$ respectivamente) (Figura 5A). En cambio, los cultivos neuronales de 15 d.i.v presentaron grandes diferencias en la presencia de extensiones

entre los tratamientos control (shLuc: $62\% \pm 0,2\%$ de células con extensiones presentes) y los tratamientos problema (shMap6D1: $89\% \pm 0,1\%$ de las neuronas con deployments), siendo que estos últimos además presentan un mayor porcentaje de deployments sin fragmentar (shMap6D1: $71\% \pm 0,1\%$ de las extensiones presentes no fragmentadas) en relación con los cultivos transfectados con shLuc (25% de los deployments presentes se encontraron sin fragmentar) (Figura 5B).

Asimismo, los datos indican que no hay diferencias significativas en la longitud de las extensiones presentes en los cultivos de 9 d.i.v transfectadas con shMap6D1 y con el shRNAi control (Figura 5C); sin embargo, las neuronas transfectadas a los 14 d.i.v con el plásmido shMap6D1 presentaron extensiones más largas comparadas con las células transfectadas con los shARNi control (Figura 5D).

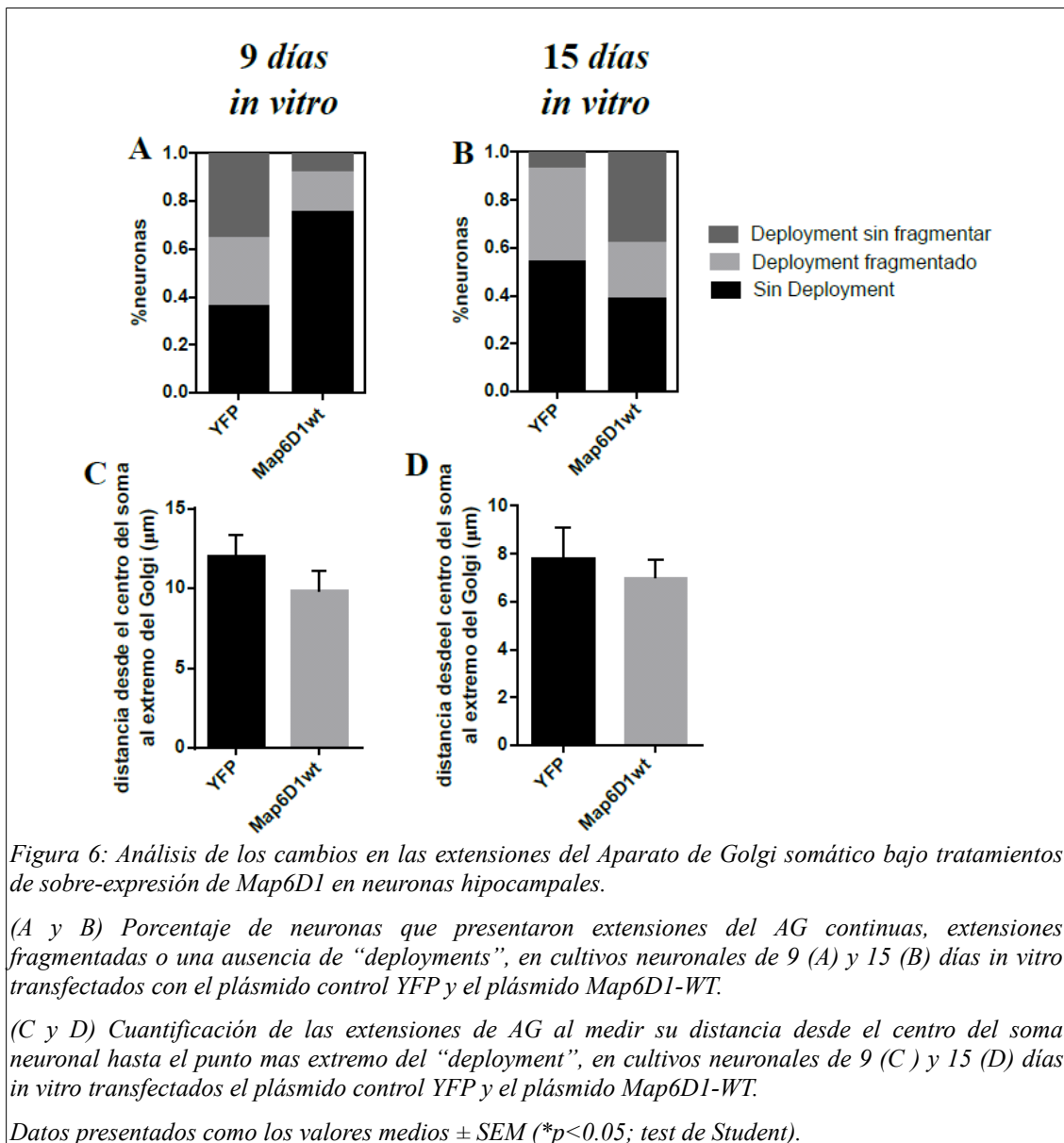
Una vez más, los resultados obtenidos de inhibición fueron complementados con estudios de sobre-expresión de Map6D1. Los cultivos neuronales de 8 y 14 días *in vitro* fueron transfectados con el plásmido Map6D1 salvaje y con el plásmido control YFP. 24hs luego de la transfección, los cultivos fueron fijados y analizados bajo microscopio confocal.

Los resultados observados muestran una disminución en la presencia de extensiones en cultivos de 9 d.i.v tratados con el plásmido *wild-type* de Map6D1 ($25\% \pm 0,1\%$ de las neuronas con deployments presentes) en relación al tratamiento control con YFP ($64\% \pm 0,1\%$ de neuronas con extensiones presentes) (Figura 6A). Además, la mayoría de los pocos deployments obtenidos en los cultivos transfectados con Map6D1-WT se encontraban fragmentados (Figura 6A). Estos resultados fueron contrarios a los obtenidos con los cultivos transfectados a los 14 d.i.v, donde hubo un aumento en la presencia de deployments en las neuronas tratadas con Map6D1-WT ($61\% \pm 0,1\%$ de las neuronas presentaban extensiones) en relación a los cultivos tratados con el plásmido control ($46\% \pm 0,1\%$ de las neuronas presentaban deployments) (Figura 6B). Asimismo, se obtuvieron un mayor porcentaje de deployments sin fragmentar en los tratamientos con Map6D1-WT ($38\% \pm 0,1\%$) que en los tratamientos con el control YFP ($8\% \pm 0,1\%$) (Figura 6B).

Por último, los resultados obtenidos en los análisis de sobre-expresión en la longitud de las extensiones no mostraron diferencias significativas entre tratamientos tanto a los 9 como a los 15 días *in vitro* (Figura 6, C y D).

En conjunto, estos experimentos sugieren un importante rol de Map6D1 en la

formación, mantenimiento y fragmentación de los “deployments” del AG. Además, los efectos de Map6D1 dependen del estado de desarrollo de las neuronas piramidales de hipocampo.



4) Map6D1 afecta la presencia de GOPs en neuronas en cultivo

En neuronas desarrolladas, el AG neuronal no sólo se encuentra organizado en un arreglo pericentriolar, sino que también puede encontrarse en estructuras discretas, llamadas Golgi satélites, mini-Aparato de Golgi (mini-AG) o “Golgi outpost” (GOPs), dispersas en el

árbol dendrítico y excluidas del axón (Hanus y Ehlers 2016). Estos GOPs son estructuras discretas que se encuentran separadas del AG somático y son importantes en el desarrollo dendrítico (Jan y Jan 2010). En neuronas piramidales, los GOPs se encuentran selectivamente enriquecidos en la dendrita más larga o compleja en cultivo (Horton et al. 2005).

Con el objetivo de estudiar la participación de la proteína Map6D1 en la formación de los mini-AG, el siguiente conjunto de experimentos se centró en estudiar el rol de la proteína, bajo tratamientos de inhibición de la expresión endógena de la misma. Para ello, se transfectaron neuronas hipocampales de 15 días *in vitro* con shARNi para Map6D1, y con el shARNi shLuc como grupo control.

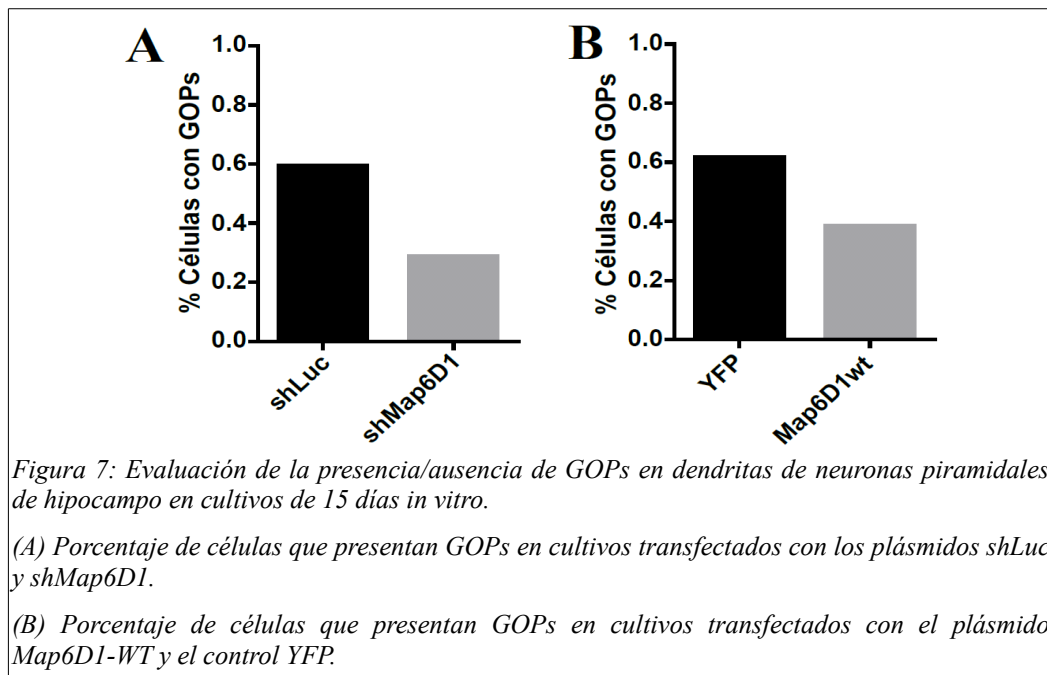
Mediante microscopía confocal y procesamiento de imágenes, se analizó el porcentaje de células que presentaban GOPs, teniendo en cuenta sólo aquellos fragmentos mayores o iguales a 1µm de diámetro.

Los resultados obtenidos muestran una diferencia en el porcentaje de neuronas que presentan Golgi outpost entre los tratamientos. El 60% de las neuronas transfectadas con shLuc positivas presentan GOPs, mientras que en las neuronas transfectadas con shMap6D1, solo un 29% de las células presenta GOPs (Figura 7A).

Una vez estudiado el efecto de la inhibición endógena de Map6D1 sobre la presencia de los Golgi outpost, el siguiente paso fue analizar los cambios al tratar cultivos con el plásmido de sobre-expresión de Map6D1. Para ello, se transfectaron cultivos de neuronas de 14 días *in vitro* con el plásmido de Map6D1, que aumenta su expresión endógena, y con el plásmido control YFP.

Los resultados obtenidos mostraron una alta similitud con los resultados de inhibición. En los cultivos de 15 d.i.v se encontraron diferencias entre tratamientos. El 62% de las neuronas transfectadas con el plásmido control YFP presentaron GOPs, mientras que el 39% de las neuronas tratadas con Map6D1-WT contienen Golgi outpost en el compartimento dendrítico (Figura 7B).

Los datos obtenidos sugieren que Map6D1 está implicado en la generación/mantenimiento de GOPs en el árbol dendrítico, afectando su presencia en neuronas piramidales de hipocampo en cultivo.



5) Map6D1 regula la morfología del compartimento dendrítico.

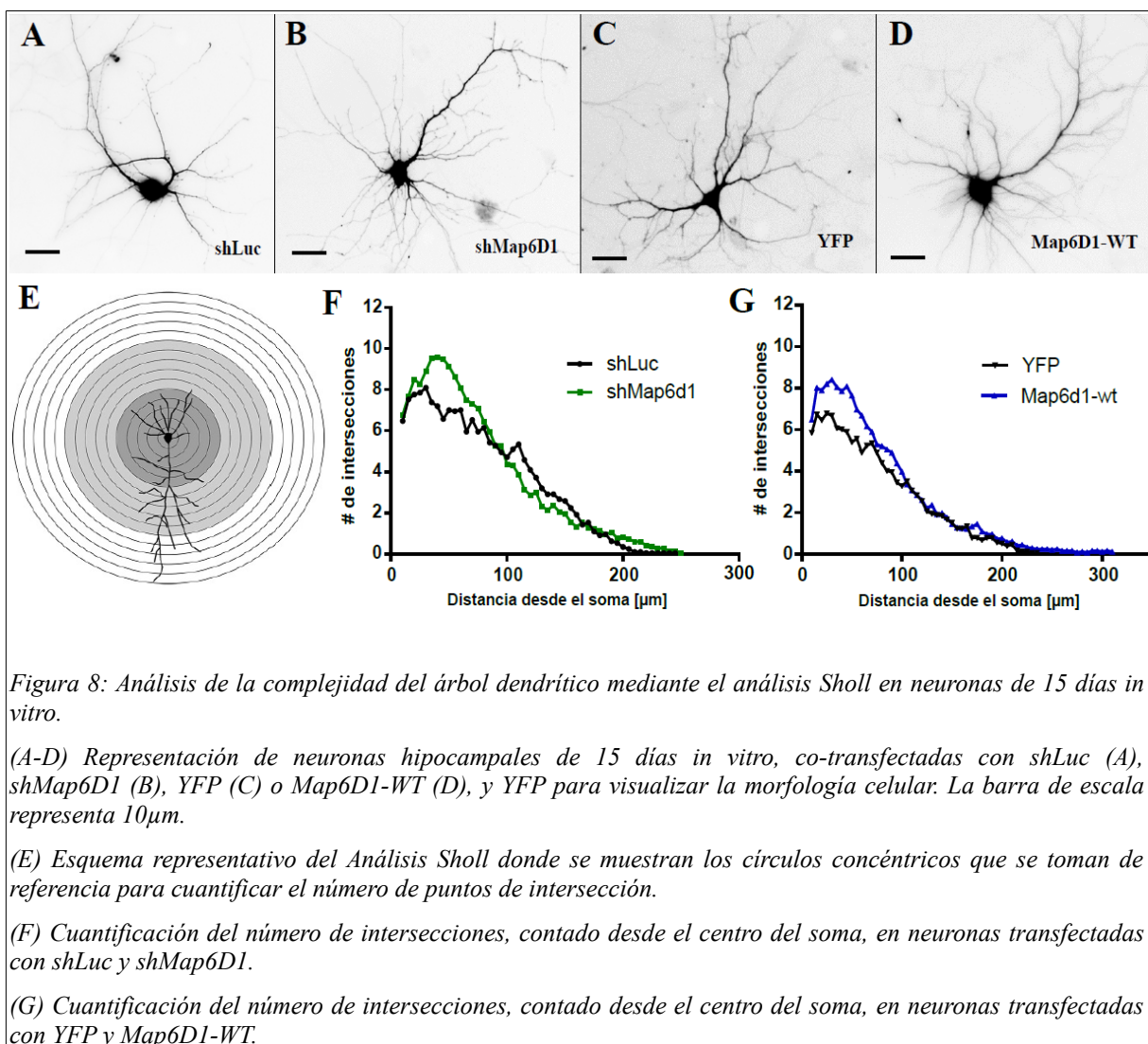
Para mantener la correcta estructura neuronal se necesita, entre otros factores, un correcto tráfico de vesículas, proteínas y neurotransmisores desde el Aparato de Golgi. Una inhibición en la salida de vesículas desde el AG afecta severamente el crecimiento dendrítico y el mantenimiento de la morfología del árbol dendrítico, sin afectar el crecimiento axonal (Bisbal et al. 2008; Horton et al. 2005; Ye et al. 2007).

Con el objetivo de estudiar la participación de Map6D1 en la formación del árbol dendrítico, el siguiente grupo de experimentos consistió en co-transfectar neuronas piramidales de hipocampo de 14 días *in vitro* con el shARNi de Map6D1 (shMap6D1) (Figura 8B) o con el shARNi control (shLuc) (Figura 8A), y la proteína YFP para soluble para visualizar la morfología neuronal. Esta edad de cultivo fue seleccionada al no encontrarse diferencias en los parámetros morfológicos del Aparato de Golgi en cultivos de 9 d.i.v. Una vez analizados los resultados, éstos se complementaron con trabajos de sobre-expresión de la proteína. En éste caso, neuronas hipocampales de 14 d.i.v fueron transfectadas con el plásmido wild-type de Map6D1 (Figura 8D) y con el plásmido control YFP (Figura 8C).

Las células fueron fijadas 24hs posterior a la transfección y observadas por medio de microscopía confocal. Para poder estudiar la morfología y complejidad del árbol dendrítico se

realizó el análisis de Sholl, que consiste en cuantificar el número de veces que las dendritas atraviesan una serie de círculos concéntricos separados por la misma distancia y cuyo centro se encuentra en el centro del soma (Figura 8E).

Los resultados obtenidos muestran un aumento de la complejidad dendrítica tanto durante la inhibición de la expresión endógena de Map6D1 (Figura 8 A y B) como durante la sobre-expresión endógena de Map6D1 (Figura 8 C y D) dado por el aumento de intersecciones durante los primeros 100 μm de distancia desde el soma, en comparación con sus grupos control (shLuc y YDP respectivamente) (Figura 8 F y G).



Los resultados sugieren que Map6D1 afecta la arborización dendrítica, afectando el número de ramificaciones presentes en neuronas piramidales de hipocampo en cultivo.

6) Map6D1 influye en el Aparato de Golgi a través de sus dominios amino y carboxilo terminal.

El dominio amino terminal de Map6D1 contiene tres cisteínas con la capacidad de ser palmitoiladas, lo cual permite su interacción con membranas. A su vez, Map6D1 presenta en el extremo carboxilo terminal un módulo Mn (ver introducción), que tiene la capacidad de interaccionar y estabilizar microtúbulos (Bosc et al. 2001; Gory-Fauré et al. 2006). Éstos dominios podrían estar implicados en la regulación e interacción de Map6D1 con el Aparato de Golgi.

Por lo tanto, el próximo grupo de experimentos se centró en encontrar cambios en los parámetros morfológicos del AG, presencia de extensiones y forma de los mismos, en neuronas piramidales de hipocampo transfectadas con mutantes que inhiben la actividad de estos dominios de Map6D1. Para estos experimentos utilizamos neuronas de 14 días *in vitro*, debido a que es el estadio donde observamos mayor influencia de Map6D1 sobre la morfología del AG. Así, transfectamos neuronas con los plásmidos Map6D1-3G y Map6D1- Δ Mn (ver materiales y métodos) (Figura 9 A y B). Los datos obtenidos se los comparó con los cultivos transfectados con YFP y Map6D1 (Figura 2G). Una vez pasadas 24hs luego de la transfección, los cultivos fueron fijados y observados con microscopio confocal.

Mediante el procesamiento digital de imágenes exploramos los distintos parámetros de la morfología del Aparato de Golgi como el área total, el índice de compactación “C”, y los fragmentos que forman el AG somático (Figura 9 C-E). Los cultivos que sobre-expresan Map6D1-3G presentan el AG fragmentado y distribuido dentro el cuerpo celular (Figura 9A). Esto puede observarse en las diferencias significativas obtenidas número de fragmentos y en el índice C del AG (Figura 9 D y E). Por otro lado, nuestros resultados muestran que la expresión de Map6D1- Δ Mn promueve AG mas extensos (Figura 9B) que se ven reflejados en un incremento del doble del AG en comparación con las neuronas control (Figura 9G).

Los datos obtenidos sugieren que la correcta morfología del AG se ve directamente influenciada por los dominios amino y carboxilo terminal de Map6D1, en neuronas piramidales de hipocampo en cultivo.

El siguiente paso consistió en detectar el efecto de la expresión de las variantes mutantes de Map6D1 en la polaridad del AG. El análisis de cuadrante (ver materiales y métodos) (Figura 3 A y B) reveló que las neuronas que expresan Map6D1-3G presentaron una

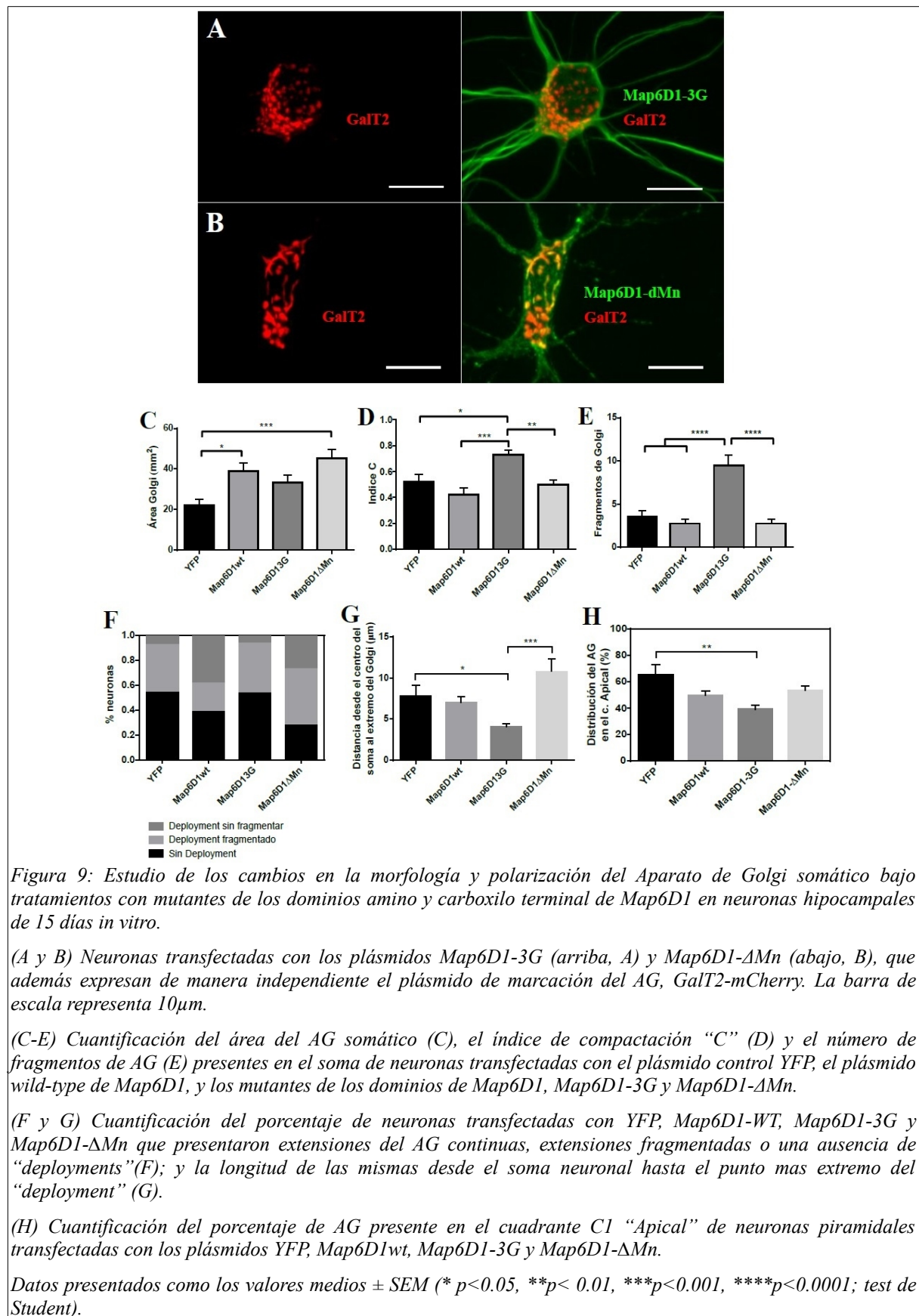
disminución en el porcentaje de AG presente en el cuadrante C1 “Apical” comparado con los cultivos control (YFP) (Figura 9H). Por otro lado, en las neuronas que expresan Map6D1- Δ Mn no se observaron diferencias con las neuronas control (Figura 9H).

Finalmente, realizamos el análisis de la morfología de las extensiones (o “deployments”) del AG hacia la dendrita mas grande en neuronas transfectadas con las mutantes Map6D1-3G y Map6D1- Δ Mn .

Estos experimentos demostraron que el porcentaje de neuronas con deployments fue similar entre tratamientos transfectados con YFP y Map6D1-3G ($46\% \pm 0,1\%$ y $47\% \pm 0,1\%$ respectivamente). Además, las cultivos que expresan Map6D1- Δ Mn poseen un mayor número de neuronas con extensiones ($73\% \pm 0,09\%$) en relación al resto de los tratamientos, con la particularidad que la mayor parte de estas extensiones están fragmentadas ($63\% \pm 0,09\%$ del total) (Figura 9F).

En cuanto a la longitud de las prolongaciones de AG, los cultivos tratados con Map6D1-3G presentaron las extensiones de menor longitud, lo que fue significativamente diferente con las neuronas transfectadas con el plásmido control YFP y con las neuronas transfectadas con Map6D1- Δ Mn (Figura 9G).

Los datos presentados indican que Map6D1 influye en la morfología y polarización del AG mediante sus dominios de unión a membranas y de unión a microtúbulos, en cultivos neuronales de 15 días *in vitro*.



DISCUSIÓN

Las neuronas son células que presentan una extrema polarización formando los dominios axonal y somatodendrítico, los cuales poseen funciones sumamente diferentes dado por su morfología característica, la composición del citoesqueleto, la distribución de organelas membranosas y proteínas asociadas a membranas de cada uno (Bradke y Dotti 2000; Craig y Banker 1994; Neukirchen y Bradke 2011). El correcto tráfico de vesículas por parte del AG provee tanto la masa lipídica como las proteínas de membrana específicas requeridas para la elongación de las neuritas en los conos de crecimiento (Bentley y Banker 2016; Quiroga et al. 2016), mientras que los microtúbulos forman la “columna vertebral” de los procesos axonales y dendríticos, y el sustrato por el cual organelas y vesículas se mueven en dirección anterógrada o retrógrada dentro de la célula (Conde y Cáceres 2009; Dent y Baas 2014; Hoogenraad y Bradke 2009; Schelski y Bradke 2017). Cualquier interrupción en el transporte vesicular o en la nucleación de microtúbulos durante el desarrollo neuronal conlleva a un riesgo en el crecimiento de las neuritas, una retracción de las mismas, y/o la muerte celular (Bentley y Banker 2016; Chevalier-Larsen y Holzbaur 2006).

En cultivos neuronales, el Aparato de Golgi sufre una serie de transformaciones a medida que la neurona se diferencia. Estos cambios comienzan a las pocas horas *in vitro*, donde el AG se organiza espacialmente en una zona donde una de las neuritas menores crece y se diferencia en el axón (de Anda et al. 2010; de Anda et al. 2005; Zmuda y Rivas 1998). En estos estadios, el AG se presenta como una pequeña estructura perinuclear con una morfología compacta. A los 4 d.i.v comienza a aparecer una diferenciación de los procesos menores, momento en el cual el AG se reposiciona en la zona opuesta al nacimiento del axón, lugar donde nace la dendrita apical o la dendrita de mayor tamaño (Horton et al. 2005). Durante los días subsiguientes, el AG sufre un aumento de tamaño (unas 10 veces mas) hasta los 12 d.i.v, momento en el que se lo considera como un AG maduro (Horton y Ehlers 2003). En este momento, el Aparato de Golgi presenta una extensión de sus cisternas hacia la dendrita apical, conocida como “deployment” (Matsuki et al. 2010; Meseke et al. 2013). A su vez, el AG neuronal maduro presenta una serie de estructuras en sus dendritas llamadas Golgi outpost o GOPs (Horton y Ehlers 2003; Ye et al. 2007), las cuales pueden ser formadas a partir de las fragmentaciones de las extensiones del AG (Quassollo et al. 2015) y se organizan

principalmente en los puntos de ramificación dendríticos (Horton et al. 2005).

El presente trabajo aporta nuevas evidencias del comportamiento del Aparato de Golgi en neuronas en diferentes estadios de desarrollo. Nuestros resultados en neuronas piramidales en cultivos de 9 y 15 días *in vitro* muestran como el AG continua un proceso de maduración, que se evidencia en un aumento y una profundización en su distribución polarizada hacia la dendrita principal, acompañado de un aumento del tamaño, en la presencia de deployments hacia la dendrita apical, de la fragmentación de estas extensiones, y de un aumento en la presencia de GOPs, a medida que aumenta la edad del cultivo. Todos estos cambios se correlacionan con la marcada polarización y morfología típica del árbol dendrítico, los cuales estarían explicados en parte por las modificaciones sufridas por el AG durante el desarrollo de las neuronas en cultivo (Horton et al. 2005).

Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) son proteínas que interaccionan y estabilizan los microtúbulos, jugando en las neuronas un rol importante en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad axonal y dendrítica (Tortosa et al. 2017). Un miembro de la familia de las MAPs es la proteína Map6 (también conocida como STOP -*Stable Tubule Only Peptides*-), la cual, además de tener la capacidad de otorgar resistencia a drogas despolimerizantes de microtúbulos, es la única con el potencial de concederles resistencia al frío (Bosc et al. 2003; Delphin et al. 2012; Gory-Fauré et al. 2014). Existen 2 isoformas de Map6 que se expresan en tejido cerebral, Map6-E (E-STOP) y Map6-N (N-STOP), las cuales son codificadas por el mismo gen y diferenciadas por splicing alternativo (Bosc et al. 2003). Otra proteína relacionada a las proteínas Map6 y que se expresa exclusivamente en tejido cerebral en estadios postnatales es la proteína Map6D1 (*MAP6 domain-containing protein 1*, o SL21) (Gory-Fauré et al. 2006, 2014). Map6D1 presenta un dominio N-terminal con el 83% de homología con la región N-terminal de las proteínas Map6 neuronales, incluyendo el sitio de unión a calmodulina; y un segundo dominio con el 71% de homología al módulo Mn de estabilización de microtúbulos de Map6-E y -N (Bosc et al. 2001, 2003). Asimismo, Map6D1 co-localiza con el AG somático y dendrítico a través de su dominio N-terminal, compuesto por 3 cisteínas con la capacidad de palmitoilarse y así unirse a membranas del Aparato de Golgi (Gory-Fauré et al. 2006).

Nuestro trabajo aporta nuevas y detalladas evidencias de la función de la proteína Map6D1 sobre la morfología y dinámica del AG, y su efecto sobre el árbol dendrítico y la

polaridad neuronal. En nuestros resultados no hemos observado grandes cambios en el AG tanto al inhibir como al sobre-expresar la expresión endógena de Map6D1 en cultivos de 9 d.i.v. Efectivamente, Map6D1 se expresa en cultivos neuronales a partir de los 9 d.i.v (Gory-Fauré et al. 2006). En estos momentos, el AG está comenzando su crecimiento, generando extensiones con dirección hacia la dendrita apical, y empiezan a aparecer Golgi outpost en los puntos de ramificación dendríticos (Horton et al. 2005). El hecho de no observar efectos sobre la organización del AG en estos estadios del desarrollo neuronal puede deberse probablemente a que la expresión temporal de Map6D1 todavía no es suficiente para generar un control sobre la estructura del AG, o porque existen otros efectores aguas abajo y/o aguas arriba que regulan la organización y polarización de esta organela durante estos estadios. Por ejemplo, GM130 es una proteína que cambia su actividad dependiendo su estado de fosforilación. Vías de señalización antagónicas determinan que la fosforilación de GM130 durante los primeros días en cultivo promueve la compactación del Aparato de Golgi y, por lo tanto, regula la formación del compartimiento axonal; o el estado no fosforilado de GM130 en neuronas desarrolladas promueve AG mas extendidos, permitiendo un correcto desarrollo dendrítico (Matsuki et al. 2010; Meseke et al. 2013). En cambio, una proteína que regula la estructura del Aparato de Golgi de forma dependiente del desarrollo es la ubiquitin ligasa Cul7^{Fbxw8}, la cual juega un rol importante en la morfología del AG y co-localiza con esta organela en estadios tempranos, expresándose en cultivos neuronales entre los 1-9 d.i.v y disminuyendo su expresión a medida que la neurona madura (Litterman et al. 2011). Experimentos de *knockdown* para Cul7^{Fbxw8} presentaran un AG disperso, una reducción del numero de dendritas primarias, del numero de ramificaciones de segundo y tercer orden, un encogimiento del largo dendrítico y una disminución de la presencia de GOPs, todo en cultivos de 5 a 10 d.i.v, lo que sugiere que esta proteína es un regulador de la estructura del AG neuronal durante los estadios tempranos del desarrollo (Litterman et al. 2011).

En los ensayos con cultivos de 15 d.i.v, la organización espacial del AG se ve afectada de diferente forma dependiendo si se inhibe o sobre-expresa Map6D1. Durante los experimentos de *up-regulation*, el mayor cambio observado es un aumento en el área del AG y en la presencia de extensiones del Aparato de Golgi en las dendritas, mientras que en el resto de los parámetros observados no se encontraron diferencias significativas con los controles (Figura 1 A y B). En cambio, en los experimentos con *down-regulation*, el AG

exhibe un área total mayor, con un aumento en su laxitud (menor compactación de las cisternas) y una menor fragmentación que en las neuronas control (Figura 1 F y G). A su vez, estas neuronas presentan un mayor número de células con “deployments” (la gran mayoría sin fragmentar), un aumento notorio en el largo de los mismos y, por consiguiente, una mayor polarización del AG hacia la dendrita principal. Al mismo tiempo, esta tendencia a la extensión del AG y a la disminución de su vesicularización tiene relación con un menor porcentaje de neuronas con GOPs. El conjunto de estos resultados sugieren que la inhibición de la expresión de Map6D1 inhibe la capacidad de fisión del AG provocando que este se extienda, disminuyendo así la formación de GOPs. Resultados recientes de nuestro laboratorio demostraron que el proceso de fisión de las extensiones del AG para la formación de GOPs esta regulado por la vía de señalización RhoA-Rock que involucra los efectores aguas abajo LIMK/PKD/Dinamina (Quassollo et al. 2015). Una posibilidad es que Map6D1 participa de alguna forma en la señalización mediada por RhoA en la morfología del AG y, por lo tanto, la ausencia de Map6D1 promueve la inhibición de la fisión de cisternas del AG. Futuros experimentos del laboratorio estarán destinados a explorar si Map6D1 está involucrado en esta vía.

Modificaciones en la estructura y polaridad del AG afectan enormemente al correcto tráfico de vesículas necesarias para el crecimiento del árbol dendrítico y el correcto mantenimiento polarizado de las neuronas (Ye et al. 2007). Por ejemplo, una desorganización espacial del AG por el agregado de belfedina A (BFA) provoca una inhibición en el tráfico de vesículas desde el Aparato de Golgi hacia las dendritas inhibiendo la formación del árbol dendrítico y la polarización neuronal (Horton et al. 2005). En cambio, si se sobre-expresa la proteína GRASP65, una proteína estructural de las cisternas del AG, se induce la vesicularización y dispersión del AG sin afectar su funcionalidad, lo que provoca la formación de un árbol dendrítico simétrico y la pérdida de la polarización neuronal (Horton et al. 2005). Map6D1 cumple un importante rol en el mantenimiento de la morfología y polarización neuronal, ya que nuestros experimentos demuestran una marcada alteración en la estructura del árbol dendrítico al inhibir la expresión de Map6D1, que provoca una extensión del mismo y un aumento en la complejidad del árbol dendrítico (antes de los primeros 100 μ m desde el centro del soma) (Figuras 8). Sin embargo, a pesar que en estas condiciones se observan AG menos compactos, con una mayor polarización hacia la dendrita apical, con un aumento del

área y con extensiones más largas de sus cisternas hacia el compartimento dendrítico; estos resultados sugieren que la inhibición de Map6D1 no altera la salida de vesículas o cargos desde el AG, sino que, por el contrario, probablemente promueva o aumente la salida de vesículas de transporte. Esto sugiere, a su vez, que la regulación de la maquinaria de fisión de vesículas, el transporte de las mismas, y la fisión de las cisternas del AG para la formación de GOPs, se encuentra regulado diferencialmente. Futuros experimentos del laboratorio estarán dirigidos a estudiar el tráfico polarizado y la regulación de la salida de vesículas de transporte hacia el compartimento dendrítico. Posiblemente, el mantenimiento de los parámetros estructurales del Aparato de Golgi mencionados en los puntos anteriores sean la principal causa por la que Map6D1 está involucrada en la correcta formación del árbol dendrítico y, por consiguiente, en la polaridad neuronal.

A pesar de ser una proteína de la familia de las MAP con capacidad de unión y estabilización a microtúbulos, Map6D1 interacciona con el AG a través de tres residuos cisteínas capaces de palmitoilarse y de esa forma mediar la unión de Map6D1 con membranas de esta organela (Gory-Fauré et al. 2006). Nuestro trabajo demuestra que esta interacción es importante para la normal morfología somática del Aparato de Golgi. De esta forma, una mutación en el dominio amino-terminal de Map6D1 provoca un marcado aumento de la fragmentación del AG que se acompaña con una disminución del área total del AG y un incremento en la compactación del mismo (Figura 9 A, C-H). Estos resultados son similares a los Aparato de Golgi observados al agregar drogas estabilizantes a microtúbulos tales como el paclitaxel (taxol) en neuronas (Thyberg y Moskalewski 1999), que provoca una fragmentación del AG, distribución que se correlaciona con la observada en la Figura 9A de los AG en neuronas que expresan Map6D1-3G. Además, la distribución subcelular de la proteína Map6D1-3G ectópica no co-localiza con el AG y muestra una marcada distribución en los MTs (Figura 9A). Estos resultados sugieren que la falta de asociación entre Map6D1 y las membranas provocaría que la proteína ejerza una mayor estabilización de microtúbulos, provocando la fragmentación del AG.

Por otro lado, cuando se transfectan neuronas con el mutante que tiene deletado el módulo Mn3 de Map6D1, responsable de la unión y estabilización de microtúbulos, observamos un AG de mayor área que no presenta fragmentación (Figura 9B, C-H). Aún más, los cultivos neuronales transfectados con Map6D1- Δ Mn exhiben un Aparato de Golgi con

extensiones de gran longitud (Figura 9G). Estos datos indicarían que al mutar el sitio de unión a MTs de Map6D1 se estaría privando la capacidad de esta proteína de anclar al AG en la región perinuclear de la neurona, generando que la organela se extienda por el soma y la dendrita apical (Figura 9). Otra hipótesis es que al estar deletado el sitio Mn3, Map6D1 pierde el sitio de unión con Tctex1, que podría ser potencial intermediario entre el AG y los MTs a través de Map6d1. Recientemente se ha demostrado por inmunoprecipitación que el dominio C-terminal de Map6D1, a través del dominio Mn3, interacciona con Tctex1 (Brocard et al. 2017). Tctex1 es una cadena liviana de la dineína citoplasmática (King et al. 1996), utilizada para el transporte de diferentes cargos (Tai et al. 1999), que co-localiza con el Aparato de Golgi manteniendo su estructura (Tai et al. 1998). Si Map6D1 pierde su capacidad de unión a Tctex, y éste es uno de los responsables de mantener la correcta morfología del AG, es probable que Map6D1 este influyendo en el mantenimiento de la estructura del Aparato de Golgi por medio de Tctex y no por una unión directa con los microtúbulos.

Para finalizar, la Ilustración 3 esquematiza de manera sencilla las diferentes hipótesis por la cual Map6D1 podría regular la morfología y posicionamiento del AG, mediando la interacción entre el Aparato de Golgi y los microtúbulos.

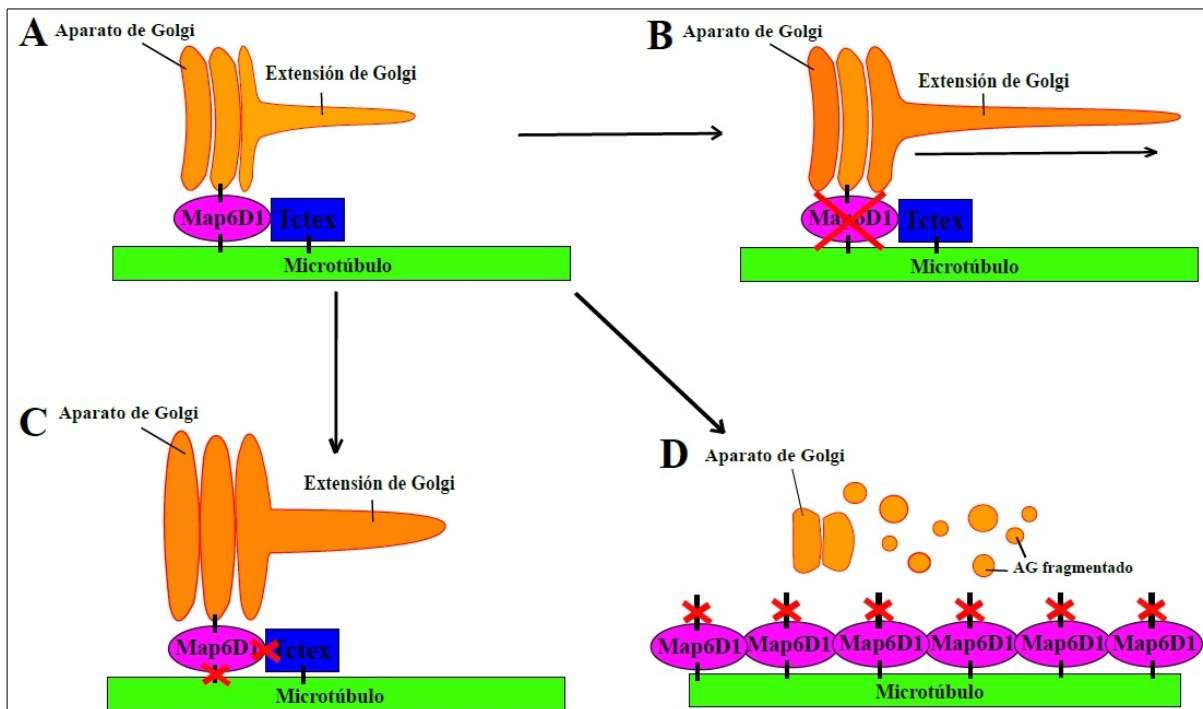


Ilustración 3: La morfología y polaridad del Aparato de Golgi se ve influenciada por Map6D1

(A) Esquema representativo de la unión de Map6D1 con el Aparato de Golgi y el motor celular Tctex, dando una correcta morfología polarizada del AG.

(B) Esquema representativo del efecto de la inhibición de la producción endógena de Map6D1, dando como resultado un AG extendido, polarizado y más extenso.

(C) Esquema representativo del efecto de la inhibición del dominio de unión a microtúbulos de Map6D1, dando como resultado un AG laxo y extenso.

(D) Esquema representativo del efecto de la inhibición del dominio de unión a membranas de Map6D1, dando como resultado un AG fragmentado y compactado.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren un novedoso e importante rol de Map6d1 en cultivos de neuronas diferenciadas. Se ha demostrado que MAP6d1 regula la morfología y posicionamiento del Aparato de Golgi somático, además de la formación y organización de estructuras polarizadas del AG como las extensiones o “deployments” hacia la dendrita apical, y los mini-Golgi o GOPs. Los resultados revelan que la actividad normal de MAP6d1 es importante para la regularización del correcto crecimiento y mantenimiento de los compartimientos dendríticos y, por lo tanto, la polaridad neuronal, actuando probablemente como una proteína adaptadora entre la membrana del Aparato de Golgi y los microtúbulos del citoesqueleto.

Este trabajo deja una base concreta para futuros estudios sobre la polaridad neuronal y la importancia del Aparato de Golgi en la diferenciación neuronal.

BIBLIOGRAFÍA

- De Anda, Froylan Calderon et al. 2005. "Centrosome Localization Determines Neuronal Polarity." *Nature* 436.
- de Anda, Froylan Calderon, Konstantinos Meletis, Xuecai Ge, Demien Rei, and Li-Huei Tsai. 2010. "Centrosome Motility Is Essential for Initial Axon Formation in the Neocortex." *Journal of Neuroscience* 30(31):10391–10406.
- Andrieux, Annie et al. 2002. "The Suppression of Brain Cold-Stable Microtubules in Mice Induces Synaptic Defects Associated with Neuroleptic-Sensitive Behavioral Disorders." *Genes and Development* 16:2350–2364.
- Arthur, Ashley L., Sihui Z. Yang, Allison M. Abellana, and Jill Wildonger. 2015. "Dendrite Arborization Requires the Dynein Cofactor NudE." *Journal of Cell Science* 128:2191–2201.
- Bard, Frédérique et al. 2003. "Epitope and Isotype Specificities of Antibodies to B-Amyloid Peptide for Protection against Alzheimer's Disease-like Neuropathology." *Neuroscience*.
- Bentley, Marvin and Gary A. Banker. 2016. "The Cellular Mechanisms That Maintain Neuronal Polarity." *Nature Reviews Neuroscience* 12.
- Bisbal, Mariano et al. 2008. "Protein Kinase D Regulates Trafficking of Dendritic Membrane Proteins in Developing Neurons." *Journal of Neuroscience* 28(37):9297–9308.
- Bosc, Christophe et al. 2001. "Identification of Novel Bifunctional Calmodulin-Binding and Microtubule-Stabilizing Motifs in STOP Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 276(33):30904–30913.
- Bosc, Christophe, Annie Andrieux, and Didier Job. 2003. "STOP Proteins." *Cell Structure and Function* 24:393–99.
- Bradke, Frank and Carlos G. Dotti. 2000. "Establishment of Neuronal Polarity: Lessons from Cultured Hippocampal Neurons." *Current Opinion in Neurobiology* 574–81.
- Brocard, Jacques et al. 2017. "MAP6 Interacts with Tctex1 and Cav2.2/N-Type Calcium Channels to Regulate Calcium Signalling in Neurons." *European Journal of Neuroscience*.
- Chevalier-Larsen, Erica and Erika L. F. Holzbaur. 2006. "Axonal Transport and Neurodegenerative Disease." *Biochimica et Biophysica* 1762:1094–1108.
- Chuang, Jen-Zen et al. 2005. "The Dynein Light Chain Tctex-1 Has a Dynein-Independent Role in Actin Remodeling during Neurite Outgrowth." *Developmental Cell* 9:75–86.
- Conde, Cecilia et al. 2010. "Evidence for the Involvement of Lfc and Tctex-1 in Axon Formation." *Journal of Neuroscience* 30(19):6793– 6800.
- Conde, Cecilia and Alfredo Cáceres. 2009. "Microtubule Assembly, Organization and Dynamics in Axons and Dendrites." *Nature Reviews Neuroscience* 10:319–32.

- Craig, Ann Marie and Gary Banker. 1994. "Neuronal Polarity." *Annual Review of Neuroscience* 17(March 1994):267–310.
- Deloulme, Jean Christophe et al. 2015. "Microtubule-Associated Protein 6 Mediates Neuronal Connectivity through Semaphorin 3E-Dependent Signalling for Axonal Growth." *Nature Communications* 16.
- Delphin, Christian et al. 2012. "MAP6-F Is a Temperature Sensor That Directly Binds to and Protects Microtubules from Cold-Induced Depolymerization." *Journal of Biological Chemistry* 287(42):35127–35138.
- Dent, Erik W. and Peter W. Baas. 2014. "Microtubules in Neurons as Information Carriers." *Journal of Neurochemistry* 129(2):235–39.
- Etienne-Manneville, Sandrine and Alan Hall. 2001. "Integrin-Mediated Activation of Cdc42 Controls Cell Polarity in Migrating Astrocytes through PKC ζ ." *Cell* 106:489–98.
- Förster, Eckart. 2014. "Reelin, Neuronal Polarity and Process Orientation of Cortical Neurons." *Neuroscience* 269:102–11.
- Gonatas, Nicholas K., Anna Stieber, and Jacqueline O. Gonatas. 2006. "Fragmentation of the Golgi Apparatus in Neurodegenerative Diseases and Cell Death." *Journal of the Neurological Sciences* 246(1–2):21–30.
- Gory-Fauré, Sylvie et al. 2014. "Non-Microtubular Localizations of Microtubule-Associated Protein 6 (MAP6)." *PLoS ONE* 24.
- Gory-Fauré, Sylvie et al. 2006. "STOP-like Protein 21 Is a Novel Member of the STOP Family, Revealing a Golgi Localization of STOP Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 281(38):28387–28396.
- Hanus, Cyril and Michael D. Ehlers. 2016. "Specialization of Biosynthetic Membrane Trafficking for Neuronal Form and Function." *Current Opinion in Neurobiology* 39:8–16.
- Harada, A. et al. 1998. "Golgi Vesiculation and Lysosome Dispersion in Cells Lacking Cytoplasmic Dynein." *The Journal of Cell Biology* 141(1):51–59.
- Hoogenraad, Casper C. and Frank Bradke. 2009. "Control of Neuronal Polarity and Plasticity - a Renaissance for Microtubules?" *Trends in Cell Biology* 19(12):669–76.
- Horton, April C. et al. 2005. "Polarized Secretory Trafficking Directs Cargo for Asymmetric Dendrite Growth and Morphogenesis." *Neuron* 48:757–771.
- Horton, April C. and Michael D. Ehlers. 2003. "Dual Modes of Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Transport in Dendrites Revealed by Live-Cell Imaging." *The Journal of Neuroscience* 23(15):6188–99.
- Horton, April C. and Michael D. Ehlers. 2004. "Secretory Trafficking in Neuronal Dendrites." *Nature Cell Biology* 6(7):585–91.
- Jaarsma, Dick and Casper C. Hoogenraad. 2015. "Cytoplasmic Dynein and Its Regulatory Proteins in

- Golgi Pathology in Nervous System Disorders.” *Frontiers in Neuroscience*.
- Jan, Yuh Nung and Lily Yeh Jan. 2010. “Branching out: Mechanisms of Dendritic Arborization.” *Nature Reviews Neuroscience*.
- Kardon, Julia R. and Ronald D. Vale. 2009. “Regulators of the Cytoplasmic Dynein Motor.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10:854–65.
- King, Stephen M. et al. 1996. “Brain Cytoplasmic and Flagellar Outer Arm Dyneins Share a Highly Conserved M(r) 8,000 Light Chain.” *Journal of Biological Chemistry* 271(32):19358–66.
- Lasiecka, Zofia M., Chan Choo Yap, Max Vakulenko, and Bettina Winckler. 2008. “Compartmentalizing the Neuronal Plasma Membrane: From Axon Initial Segments to Synapses.” *International Review of Cell and Molecular Biology*.
- Lin, Chin-Hsien et al. 2015. “Lrrk Regulates the Dynamic Profile of Dendritic Golgi Outposts through the Golgin Lava Lamp.” *The Journal of Cell Biology*.
- Litterman, Nadia et al. 2011. “An OBSL1-CUI7Fbxw8 Ubiquitin Ligase Signaling Mechanism Regulates Golgi Morphology and Dendrite Patterning.” *PLoS Biology* 9(5):17–19.
- Matsuki, Tohru et al. 2010. “Reelin and Stk25 Have Opposing Roles in Neuronal Polarization and Dendritic Golgi Deployment.” *Cell* 143:826–836.
- Meseke, Maurice, Georg Rosenberger, and Eckart Förster. 2013. “Reelin and the Cdc42/Rac1 Guanine Nucleotide Exchange Factor APIX/Arhgef6 Promote Dendritic Golgi Translocation in Hippocampal Neurons.” *European Journal of Neuroscience* 37:1404–1412.
- Neukirchen, Dorothee and Frank Bradke. 2011. “Neuronal Polarization and the Cytoskeleton.” *Seminars in Cell and Developmental Biology* 22:825–33.
- Palmer, Krysten J., Helen Hughes, and David J. Stephens. 2009. “Specificity of Cytoplasmic Dynein Subunits in Discrete Membrane-Trafficking Steps.” *Molecular Biology of the Cell* 20(4):2885–99.
- Passemard, Sandrine et al. 2017. “Golgi Trafficking Defects in Postnatal Microcephaly: The Evidence for ‘Golgiopathies.’” *Progress in Neurobiology* 18.
- Pellegrini, Laura, Andrea Wetzels, Simone Grannó, George Heaton, and Kirsten Harvey. 2017. “Back to the Tubule: Microtubule Dynamics in Parkinson’s Disease.” *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Penazzi, Lorène, Lidia Bakota, and Roland Brandt. 2016. “Microtubule Dynamics in Neuronal Development, Plasticity, and Neurodegeneration.” *International Review of Cell and Molecular Biology* 321:89–169.
- Pierce, Andrew J. and Maria Jasin. 2001. “NHEJ Deficiency and Disease.” *Molecular Cell* 1160–61.
- Prigozhina, Natalie L. and Clare M. Waterman-Storer. 2004. “Protein Kinase D-Mediated Anterograde Membrane Trafficking Is Required for Fibroblast Motility.” *Current Biology* 14:88–98.

- Quassollo, Gonzalo et al. 2015. "A RhoA Signaling Pathway Regulates Dendritic Golgi Outpost Formation." *Current Biology* 25:971–82.
- Quiroga, Santiago, Mariano Bisbal, and Alfredo Cáceres. 2016. "Regulation of Plasma Membrane Expansion during Axon Formation." *Developmental Neurobiology* 1–43.
- Rosso, Silvana et al. 2004. "LIMK1 Regulates Golgi Dynamics, Traffic of Golgi-Derived Vesicles, and Process Extension in Primary Cultured Neurons." *Molecular Biology of the Cell* 15:3433–49.
- Schelski, Max and Frank Bradke. 2017. "Neuronal Polarization: From Spatiotemporal Signaling to Cytoskeletal Dynamics." *Molecular and Cellular Neuroscience*.
- Tai, Andrew W., Jen-Zen Chuang, and Ching-Hwa Sung. 1998. "Localization of Tctex-1, a Cytoplasmic Dynein Light Chain, to the Golgi Apparatus and Evidence for Dynein Complex Heterogeneity." *Journal of Biological Chemistry* 273(31):19639–19649.
- Tai, Andrew W., Jen Zen Chuang, Christian Bode, Uwe Wolfrum, and Ching Hwa Sung. 1999. "Rhodopsin's Carboxy-Terminal Cytoplasmic Tail Acts as a Membrane Receptor for Cytoplasmic Dynein by Binding to the Dynein Light Chain Tctex-1." *Cell* 97(7):877–87.
- Thyberg, Johan and Stanislaw Moskalewski. 1999. "Role of Microtubules in the Organization of the Golgi Complex." *Experimental Cell Research* 246:263–79.
- Tortosa, Elena et al. 2017. "Dynamic Palmitoylation Targets MAP6 to the Axon to Promote Microtubule Stabilization during Neuronal Polarization." *Neuron* 94:809–25.
- Valenzuela, José I. and Franck Perez. 2015. "Diversifying the Secretory Routes in Neurons." *Frontiers in Neuroscience*.
- Yadav, Smita and Adam D. Linstedt. 2011. "Golgi Positioning." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Yadav, Smita, Manojkumar A. Puthenveedu, and Adam D. Linstedt. 2012. "Golgin160 Recruits the Dynein Motor to Position the Golgi Apparatus." *Developmental Cell* 23:153–65.
- Ye, Bing et al. 2007. "Growing Dendrites and Axons Differ in Their Reliance on the Secretory Pathway." *Cell* 130:717–29.
- Zmuda, Jonathan F. and Rodolfo J. Rivas. 1998. "The Golgi Apparatus and the Centrosome Are Localized to the Sites of Newly Emerging Axons in Cerebellar Granule Neurons in Vitro." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 41:18–38.

AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer al Instituto de Investigaciones Mercedes y Martín Ferreyra, a la Universidad Nacional de Córdoba, y a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales por cada minuto de enseñanza y aprendizaje. La clase de profesional que llegue a ser, será en gran parte por estas Instituciones.

Le doy gracias a mi director, Mariano, por su infinita paciencia y dirección. No creo haber podido terminar esta etapa de mi vida con otra persona que no sea él.

A mis compañeros de laboratorio, por siempre haberme apoyado y aconsejado sin importar que tan simples o complicadas fuesen las preguntas.

A mi familia de la facultad que son mucho mas que amigos, por hacerme sentir parte de algo hermoso. Son lo mejor que me pasó en estos 6 años.

Y finalmente, le quiero dedicar este trabajo a mi familia, quienes siempre me apoyaron en este loco sueño. Cada uno de ustedes me incentivó a seguir mi pasión y a nunca bajar los brazos por aquello que amo. Les debo todo lo que soy.