

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***FUNCIONES OPUESTAS DE LAS QUINASAS ABL EN
POLARIZACIÓN NEURONAL***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Biotecnología y Proteínas Recombiantes y Memoria para
optar al Título de Bioquímico por:**

***ESTEBAN ALONSO RETAMALES
VENEGAS***

**Director de Tesis: Dra. Alejandra Alvarez-Rojas
Co-Director de Tesis: Dr. Christian Gonzalez-Billault**

Santiago-CHILE

Agosto 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

ESTEBAN ALONSO RETAMALES VENEGAS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

_____ 11 DE AGOSTO DEL 2020 _____

Director de Tesis:

Dra. Alejandra Alvarez Rojas _____

Co-director de Tesis:

Dr.Christian Gonzalez-Billault _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Hernán Lara _____

Dra. M.Antonieta Valenzuela _____

Dr. Patricio Olguin _____

Financiamiento

FONDECYT 1161065 *C-ABL IS A KEY CELLULAR AND SYNAPTIC HOMEOSTASIS REGULATOR. ITS DYSREGULATION IS INVOLVED IN EARLY ALZHEIMER DISEASE PATHOLOGY* Profesor responsable
Alejandra Alvarez Rojas.

**AFB 170005 CENRO DE ENVEJECIMIENTO Y REGENARACIÓN,
PONTIFICA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE.**

Asistencia a congresos.

Abl1 and Abl2 kinases, opposite functions in neuron polarization? Retamales Esteban A, González-Billault Christian, Álvarez Alejandra R, EMBO: Emerging concepts of the neuronal cytoskeleton V, Villarrica, Chile. April 14-18, 2019.

Índice general

Abreviaturas	5
Resumen	6-7
Introducción	8-16
Hipótesis y Objetivos	17
Materiales	18-23
• Reactivos	18-19
• Anticuerpos	20
Métodos	21-24
• Cultivo primario de neuronas hipocámpales	21
• Inmunofluorescencia	22
• Tratamientos	22
• Trasfecciones	22
• Western Blot	23
• Pull-Down de proteínas de fusión GST	24
• Análisis estadístico	24
Resultados	25-42
• Niveles de las quinasas Abl en neuronas durante las etapas clave de polarización neuronal	25
• Localización de las quinasas Abl	26
• Neuronas en ausencia de Abl-1 (Abl1-KO) presentan un retraso en la adquisición de polaridad neuronal.	29
• Abl1 promueve la polarización neuronal mientras que Abl2 la inhibe	31
• Abl2 inhibe la polarización neuronal	36
• Regulación de la actividad de Rac1 por las quinasas Abl	38
• La quinasa Abl1 activa a Rac1 en el axón	40
Discusión	43-48
Conclusiones	49
Referencias	50-55

Índice de figuras

Esquema 1: Polarización neuronal <i>in vitro</i>	9
Esquema 2 <i>Western Blot</i> de Abl1 del modelo Abl1-KO	22
Figura 1: Aumento de los niveles y actividad de Abl1 en neuronas polarizadas Tau1+ 25	
Figura 2: Localización de las quinasas Abl1 y Abl2 es diferencial	26
Figura 3: Localización diferencial de las formas activas de Abl1 y Abl2 durante la polarización neuronal	28
Figura 4: Neuronas Abl1-KO presentan un retraso en la adquisición de polaridad neuronal	30
Figura 5: Neuronas nulas de Abl1 presentan conos de crecimiento más grandes y más oblicuos	31
Figura 6: Modulación de la actividad de las quinasas Abl1 y Abl2 genera una perturbación en la polarización neuronal.	32
Figura 7: Inhibición de Abl2 en neuronas en ausencia de Abl1 promueve la polarización neuronal	33
Figura 8: Activación de Abl2 en neuronas Abl1-KO disminuye el porcentaje de polarización neuronal	35
Figura 9: Silenciamiento de Abl2 promueve la polarización neuronal	36
Figura 10: Sobreexpresión de Abl2 inhibe la polarización neuronal	37
Figura 11: La actividad de las quinasas Abl regula la actividad de Cofilina	38
Figura 12: Inhibición o activación de las quinasas Abl promueven o inhiben la actividad de Rac1, respectivamente.	39
Figura 13: La actividad indirecta de Rac disminuye en el axón de neuronas Abl1-KO	41

Abreviaturas

Abl1: *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog I*

Abl1-KO: Genotipo nulo para Abl1.

Abl2: *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog II*

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

Cdc42: ciclo de división celular 42.

CNS: Sistema nervioso central

D.I.V: *días in vitro*

DPH: 5-(1,3-diaril-1H-pirazol-4-yl) hidantoin, 5-[3-(4-fluorofenil)-1-fenil-1H-pirazol-4-il]-2,4-imidazolidinediona.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GNF2: 3-[6-[[4-(Trifluorometoxi) fenil]amino]-4-pirimidinil]benzamida

KO: *Knock-out*

MAP2: proteína asociada a microtúbulos 2

Rac1: Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada a Ras

RhoA: Miembro A de la familia de genes con homología Ras.

WAVE: Proteína homóloga a la proteína del síndrome *Wiscott-Aldrich* [WASP] de la familia de verprolina.

WT: *wyld type*

Resumen: Funciones opuestas de las quinasas Abl en polarización neuronal

En las neuronas la segregación de los compartimentos axonal y dendrítico es clave para el flujo vectorial de información. Por lo cual, el fenómeno de polarización neuronal es esencial para el desarrollo y el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Este proceso ocurre durante el desarrollo embrionario cuando se rompe la simetría celular; y una neurita inicia un crecimiento más rápido en relación a las otras dando origen al axón y a las dendritas, respectivamente. Una variedad de señales extracelulares y vías de señalización intracelulares han sido descritas participan en este proceso. La familia de quinasas Abl (oncogenes de leucemia murina de Abelson): Abl1 y Abl2 regulan distintos procesos durante el desarrollo del cerebro, como guía axonal y morfogénesis dendrítica; funciones que requieren la reorganización del citoesqueleto de actina y de microtúbulos. La hipótesis formulada “Abl-1 promueve la polarización neuronal a través de la activación de Rac1; mientras que Abl-2 inhibe la adquisición de polaridad”, cuyo objetivo y estrategia es comprobar que el modelo de neuronas nulas de Abl1 presenta una disminución del porcentaje de neuronas polarizadas y de la actividad de Rac1, y comprobar que la inhibición farmacológica y genética de Abl2 genera un aumento en el porcentaje de neuronas polarizadas.

En este trabajo se observó que, en neuronas, Abl1 y Abl2 presentan una distribución diferencial y que los niveles y actividad de Abl1 aumentan a medida que las neuronas se polarizan. Se ha observado que neuronas hipocámpales nulas para Abl1 muestran un retardo en la adquisición del fenotipo polarizado y defectos en sus conos de crecimiento. Sorprendentemente, el tratamiento de neuronas nulas de Abl1 con inhibidores específicos de las quinasas Abl, generan un fenotipo opuesto, es decir, aumenta la polarización neuronal, sugiriendo que Abl2 estaría inhibiendo la polarización neuronal. En forma consistente, el silenciar mediante shRNA o sobre expresar Abl2 genera un aumento o una disminución, respectivamente, en la polarización neuronal. Evaluando la actividad indirecta de Rac, vemos que la ausencia de Abl1 genera una disminución de la actividad de la señalización río abajo seguida por fosforilación de Cofilina en Ser 4. Así mismo en neuronas tratadas con GNF2 los niveles de Rac1 activo es mayor que en neuronas control, que se correlaciona con el efecto de estos fármacos en la polarización neuronal.

En conclusión, nuestros resultados muestran que las quinasas Abl poseen un efecto opuesto en la polarización neuronal: Abl1 promueve y Abl2 inhibe la polarización neuronal. Estas quinasas Abl modulan la actividad de Rac1 durante el proceso.

Abstract: Opposite functions of Abl kinases on neuronal polarization

Segregation of neuronal compartments: axonal and dendritic, is needed for the correct wiring, function and vector flow of information in the brain. Thus, neuronal polarization is an essential process for the development and proper functioning of the brain. This process occurs during embryonic development, when neuronal symmetry breaks due to the fast growth of a neurite in contraposition to the others, processes that give rise to an axon and dendrites, respectively. A wide variety of extracellular cues and intracellular signaling have been described as essential elements that can orchestrate this process.

The family of proteins Abl (Abelson murine leukemia oncogenes): Abl1 and Abl2 participate in distinct processes of neuron development like axonal guide, synaptic maturation, and dendritic morphogenesis. Functions that require the reorganization of cytoskeleton. In this work, we show that Abl1 and Abl2 have a differential distribution early in the developing neuron and that the levels and activity of Abl1 are higher in polarized neurons. It is documented that Abl1 regulates axonal growth in cortical neurons, but Abl1 role on neuron polarization has remained unclear. We show that Abl1 null hippocampal neurons present a delay in neuron polarization and have bigger and oblique growth cones. Surprisingly, these neurons when treated with Abl inhibitors, Imatinib or GNF2, present an opposite phenotype, i.e. a higher percentage of polarized neurons, as compared to control WT or K.O neurons, suggesting that Abl2 would inhibit neuron polarization. Effectively, we show that silencing or over-expressing Abl2 results in a rise or a decrease in the percentage of neuron polarization, respectively and modulates the length of minor neurites.

Evaluation of Rac indirect activity, by immunofluorescence, we show that in the absence of Abl1 neurons, the activity of Rac1 in the axon decreases. We also show that the levels of active Rac1, are augmented in GNF2, and diminished in DPH treated cortical neurons, activity that is correlated with the effect on neuron polarization with these same treatments.

In conclusion, we show that Abl kinases have opposite functions on neuron polarization: Abl1 promotes and Abl2 inhibits neuron polarization. And these Abl kinases modulate somehow the activity of Rac1 during this process.

Introducción

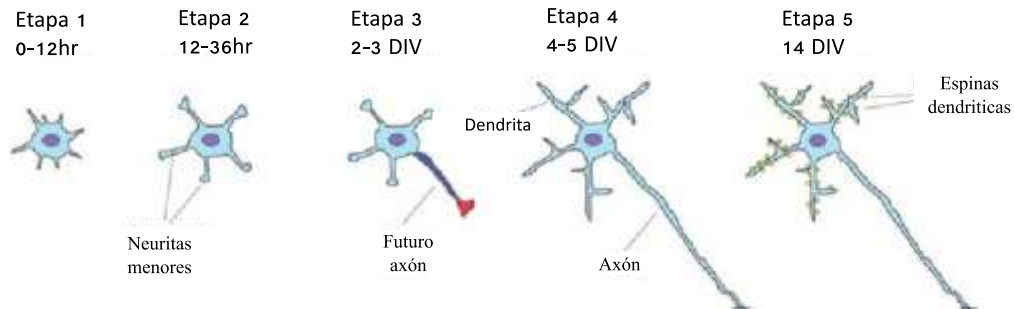
Las neuronas son células altamente polarizadas que forman parte de redes funcionales, basadas en las propiedades estructurales, morfológicas y moleculares de los axones y las dendritas. Ramón y Cajal con su ley de polarización dinámica (Ramón y Cajal, 1914, 1954) propuso a la neurona como la unidad básica del funcionamiento del cerebro donde, cada neurona tiene dominios específicos relacionados a la recepción y emisión de señales que permitirían el flujo vectorial de información entre las neuronas.

El estudio del proceso de polarización neuronal y la generación de axones es fundamental para el mejor entendimiento del desarrollo de las redes neuronales, así como en la búsqueda de estrategias que promuevan la repolarización de neuronas y la regeneración de axones luego de un daño al sistema nervioso central (CNS).

Polarización de neuronas *in vivo*

Los estudios *in vivo* del desarrollo del CNS, han mostrado que la polarización de neuronas piramidales del hipocampo y de la corteza se asocia a la migración neuronal. La polarización de neuronas piramidales corticales empieza cuando las neuronas inician su migración desde la zona germinal ventricular (VZ) hasta el margen de la pared cerebral para formar la capa primordial o preplato (PP), que se dividirá en zona marginal superficial (MZ) y la subplaca (SP) (Berry y Rogers, 1965; Rakic, 1972). En la corteza del ratón el proceso de migración y polarización neuronal ocurre entre los días embrionarios 11 y 18 (E11 y E18) (Lewis y cols., 2013). Las neuronas que inician su migración han salido recientemente del ciclo celular y adoptan una morfología bipolar (con dos neuritas en posición opuesta) con un proceso líder y un proceso de arrastre que se desarrollarán como dendritas y axones respectivamente (Calderón de Anda y cols., 2008). Luego los axones se extienden rápidamente a su destino final, guiados por señales extracelulares y para evolucionar a estructuras más complejas con la ramificación axonal y el establecimiento del dominio pre-sináptico. La especificación axonal *in vivo* depende de señales intracelulares intrínsecas y de señales extracelulares del ambiente las que se relacionan funcionalmente con el proceso de migración celular durante el desarrollo del CNS. Es posible recrear aspectos de este proceso en cultivos primarios de neuronas del hipocampo, lo que ha facilitado considerablemente su estudio.

Polarización *in vitro*



Esquema 1: Polarización neuronal *in vitro*: modelo de desarrollo neuronal de 5 etapas adaptado de Lalli y cols, 2012..

El estudio del proceso de adquisición de polaridad neuronal *in vitro* comenzó a finales de los años 70 con la descripción del proceso de polarización de neuronas en cultivos primarios derivados de hipocampo de embriones E18 (Banker y Cowan, 1977). *In vitro*, las neuronas hipocampales pasan por cambios morfológicos dramáticos durante la polarización, siguiendo una secuencia típica de eventos que pueden dividirse en 5 etapas, descritas por Dotti y Banker (Dotti y cols., 1988). En la etapa 1, definida desde que se adhieren las células al substrato, las neuronas forman una estructura rica en actina compuesta de un lamelipodio que se extiende alrededor del cuerpo celular y numerosos filopodios (Matila y Lappalainen, 2008). Luego de 6-18 horas, en la etapa 2, los lamelipodios crecen en distintas zonas de la periferia celular llevando a la protrusión de varias neuritas menores de 20 a 30 μm de longitud. Estas neuritas, poseen conos de crecimiento con gran movilidad, pero pasan por procesos de crecimiento y retracción intermitentes, lo que se traduce que en aproximadamente las 36 horas, se observa poco crecimiento neto y las neuronas mantienen una apariencia simétrica. En esta etapa todas las neuritas poseen la capacidad de convertirse en axones o dendritas. La etapa 3 comienza durante el segundo día de cultivo *in vitro* (2 DIV), cuando una de las neuritas empieza a extenderse más rápido que las demás, en forma continua, alcanzando una longitud de 2 a 3 veces mayor que las otras neuritas. Esta neurita se transformará en axón y las demás neuritas desarrollarán una identidad dendrítica. La transición de la etapa 2 a la etapa 3, que determina la pérdida de simetría de la neurona, es un sello crítico para la polarización neuronal. En la población neuronal en cultivo, estas transiciones no ocurren de manera

sincrónica, 50% de las neuronas alcanza la etapa 3 luego de 24 horas del sembrado y un 80% lo alcanza entre 36 y 48 horas. A los 3 o 4 días *in vitro* (DIV) las neuronas alcanzan la etapa 4, donde las neuritas remanentes adquieren las características morfológicas de dendritas, (más gruesas y cortas) y las proteínas dendríticas son segregadas consolidando la polarización molecular (Polleux y Snider, 2010). La etapa 5 se alcanza a los 14 DIV, cuando las dendritas se ramifican y forman espinas dendríticas para luego formar una extensa red neuronal con contactos sinápticos.

In vitro el establecimiento de la morfología polarizada es un fenómeno intrínseco de auto-organización de las neuronas, en la cual la etapa clave de pérdida de la simetría neuronal requiere de dos fenómenos complementarios: i) la presencia de señales positivas que se retroalimentan y promueven la elongación selectiva y acelerada de una única neurita que se desarrolla como axón, y ii) la presencia señales negativas que previenen el crecimiento de las demás neuritas (Turing, 1990; Cheng y Poo, 2012). Se han identificado una variedad de moléculas señal extracelulares y vías de señalización que participan en la adquisición de polaridad neuronal *in vitro* e *in vivo*.

Señalización extracelular durante el proceso de polarización neuronal

Entre las señales extracelulares identificadas están: i) Netrina una señal de atracción difusible y su receptor DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) induce migración celular y la formación del axón en el cerebro en desarrollo (Adler y cols., 2006; Killeen y Sybingco, 2008), ii) Semaforina 3A y su receptor Plexina que inducen el crecimiento asimétrico de neuronas corticales, actuando como repelente para axones y señal de atracción para las dendritas apicales (Dent y cols., 2004), iii) Miembros de la familia de neurotrofinas, como BDNF y neurotrofina-3 (NT-3) y sus receptores Trks han sido descritos de inducir la especificación del axón (Huang y Reichardt, 2003, Nakamuta y cols., 2011). Estos resultados indican que la ruptura de la simetría es promovida por señales extracelulares y sus receptores capaces de integrar la información del entorno dentro de la célula.

Señalización intracelular durante el proceso de polarización neuronal

El hecho de que neuronas en cultivo polarizan en ausencia de señales como las recién descritas agregadas al medio con distribución asimétrica, es un indicativo de que este es un fenómeno intrínseco de auto-organización de la neurona y que esta puede iniciar

cambios moleculares internos que provocan la pérdida de la simetría de las neuronas. Además, refleja la preservación de un determinante de asimetría que se conserva después de la disociación de tejido para promover recrecimiento axonal en células sembradas en cultivo (Cáceres y cols., 2012).

Para inducir la especificación de un axón la neurona debe ejecutar algunos procesos. Primero en una neurita, un incremento de señales positivas promueve un proceso de retroalimentación que conduce a un aumento en la concentración de señales activadoras que promueven: i) la dinámica de actina, ii) la polimerización de microtúbulos y iii) la fusión de vesículas incrementado la membrana plasmática (Arimura y Kaibuchi, 2007). Esto induce la movilidad del cono de crecimiento, formado por citoesqueleto de actina y microtúbulos altamente dinámicos (Lowery y Vactor, 2009), produciendo la elongación selectiva y acelerada de esa única neurita que se desarrolla como axón. Las protrusiones de actina son los principales elementos que empujan el borde de la membrana hacia delante, el aumento del número de filamentos de actina y la disminución la tensión de la membrana por inserción de nueva membrana es por lo tanto crucial para el crecimiento del axón (Craig y cols., 2012).

Segundo proceso, el aumento de señales activadoras en la neurita genera señales inhibitoras del crecimiento de neuritas menores (Naoki y cols., 2011) donde recientemente se describió la participación de olas de calcio que viajan al soma, para generar mediante una cascada de señalización, la activación de Rho GTPasa RhoA (familia de genes con homología Ras, miembro A) en neuritas menores, que inhiben el crecimiento de las demás neuritas, consolidando la definición de polaridad neuronal (Takano T y cols., 2017). En este sentido, vemos que, para regular el crecimiento o la retracción de neuritas, se necesitan proteínas efectoras que ejecuten y modulen el citoesqueleto de manera rápida y localizada, ese rol lo cumplen las RhoGTPasas.

Rol de las Rho GTPasas en polarización neuronal.

Entre las señales intracelulares activadoras e inhibitoras se ha propuesto que la familia de las Rho GTPasas, tendrían un rol clave. Las Rho GTPasas son proteínas reguladoras maestras de la dinámica de citoesqueleto y de la membrana, y han sido involucradas en la regulación de la adquisición de polaridad neuronal y celular. Se han identificado más de 20 miembros, siendo RhoA, Cdc42 (ciclo de división celular 42) y Sustrato 1 de la

toxina botulínica C3 relacionada a Ras (Rac1) los miembros mejor caracterizados. En la mayoría de los contextos celulares Rac1 y Cdc42 promueven la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente, mientras que RhoA regula la formación y contracción de fibras de estrés (Nobes y Hall., 1995; Gonzalez-Billaut y cols., 2012). Así se ha relacionado la activación de Rac1 y Cdc42 a la elongación de neuritas, mientras que la activación de RhoA a la inhibición de la formación de neuritas.

La señalización de Rho GTPasas es dinámica y compleja, y depende de la localización y temporalidad de la señal, así como también de factores que regulan su expresión, su actividad, degradación y localización subcelular (Fusco y cols, 2016). Diferentes RhoGTPasas pueden presentar distinta localización subcelular y funcionar al mismo tiempo, y regulando diferentes fenómenos como el aumento de la dinámica de actina y protrusión del borde de la membrana, la polimerización de microtúbulos y el crecimiento de membrana. Más aún existe una conversación precisa entre las diferentes RhoGTPasas (Pertz y cols., 2008). Dentro de las señales que involucran el aumento de la dinámica de actina y la polimerización de microtúbulos que promueve el crecimiento axonal destaca la participación de Rac1.

Rac1 promueve la polarización neuronal

Rac1 es un regulador de la polimerización de actina durante la polarización neuronal (Tahirovic y cols, 2010). La expresión de Rac1 o su GEF Tiam1 promueve crecimiento neurítico e induce la formación de axones múltiples (Kunda y cols., 2001, Nishimura y cols., 2005). La supresión de Tiam1 inhibe el aumento en la dinámica de actina, un sello distintivo de los conos de crecimiento (Bradke y Dotti, 1999, Kunda y cols., 2001). La promoción de la dinámica de actina por Rac1 es necesaria para la polarización neuronal. La activación de Rac1 activa río abajo a WAVE (proteína homóloga a la proteína del síndrome *Wiscott-Aldrich* [WASP] de la familia de verprolina) (Tahirovic y cols, 2010) y a la proteína Arp2/3 (proteína relacionada a actina 2/3) que induce a la ramificación de los filamentos de actina y la generación de lamelipodios (Takenawa y Suetsugu, 2007). En *Drosophila* se ha encontrado que Abl (oncogen homólogo a la leucemia viral murina Abelson) regula de Rac durante la activación de neuronas fotoreceptoras (Kannan y cols., 2017). Rac1 también participa en polarización neuronal promoviendo la estabilidad de microtúbulos (Watabe-Uchida y cols., 2006), la activación de Rac1 por DOCK7 (una GEF de la familia DOCK) aumenta la estabilidad de microtúbulos mediante la

inactivación de Op18 (oncoproteína 18/ stamina) (Watabe-Uchida y cols, 2006) un promotor de catástrofes (Howell y cols., 1999).

Como se mencionaba anteriormente, durante la polarización neuronal es necesario la concurrencia de señales inhibitorias que actúen en forma opuesta a las señales activadoras, evitando en forma global el avance o crecimiento de los procesos menores mientras se extiende el axón. Se ha descrito la participación de la GTPasa RhoA en esta función crucial para la consolidación y especificación axonal (Takano y cols, 2017).

RhoA participa manteniendo un tono inhibitorio global.

Varias líneas de evidencia sugieren que RhoA (miembro de la familia de homólogo a Ras A) es un regulador negativo de la neuritogénesis, inhibiendo la formación y crecimiento del axón y dendritas (Da Silva y cols., 2003; Conde y cols., 2010). Los efectos de RhoA, que promueven la retracción neurítica, son mediados por la activación de la quinasa ROCK, la inactivación de la quinasa LIMK1, que fosforila e inactiva el factor de despolimerización de actina (ADF) y cofilina (Bernstein y Bamburg, 2010, Ng y Luo, 2004).

La expresión ectópica de RhoA constitutivamente activa (CA) inhibe el brote de neuritas en líneas celulares neuronales (Kozma y colgs., 1997) y la formación de procesos menores en neuronas hipocampales. Mientras la inactivación de RhoA/ROCK por agentes farmacológicos o expresión ectópica de dominantes negativos promueven la formación de neuritas, la elongación axonal e/o inducen la formación de neuronas multi-axón (Da Silva y cols., 2003, Sanchez y cols., 2008, Chuang y cols., 2005) asociado a la reducción en la polimerización de filamentos de actina (Da Silva y cols, 2003), consistente con que se necesita un incremento en la dinámica de actina para el inicio de la formación del axón. Se ha mostrado alta actividad de RhoA en los conos de crecimiento de los procesos menores comparado con los conos axonales (Gonzalez-Billaut y cols., 2012), y que RhoA es degradada en el cono de crecimiento axonal durante la polarización neuronal (Deglincerti y cols., 2015). Recientemente se describió que desde el axón naciente existe una señalización inhibitoria a larga distancia hacia los demás procesos menores, mediado por olas de calcio que llegan al soma, estas olas de Ca^{2+} , aumentan la actividad de RhoA en el soma, a través de la quinasa dependiente de calcio/calmodulina 1 (CAMKI). RhoA difunde a las neuritas menores, donde inhibe su crecimiento, contribuyendo a la definición de la polaridad neuronal (Takano y cols., 2017).

Aumentando la complejidad de la señalización de las GTPasas, p190RhoGAP y DLC1 (*Deleted in Live Cancer 1*), dos GAPs específicas para RhoA, generan fenotipos distintos en relación al crecimiento neurítico, al ser perturbada su expresión. *Knock-down* de p190RhoGAP lleva a una disminución del largo neurítico, mientras que para DLC1, lleva a un aumento del largo. Es posible que distintos *pools* de RhoA presentes en las neuritas, sean regulados diferencialmente (Fusco, Lefort y Smith, 2016). Interesantemente, se ha descrito que Abl2, un miembro de la familia de las quinasas Abl, es capaz de fosforilar y activar p190RhoGAP en neuronas hipocampales, promoviendo la inactivación de RhoA en dendritas (Skafianos y cols., 2007)

La familia de quinasas Abl: posibles reguladores de la polarización neuronal

La familia de las proteínas quinasas Abl una de las ramas mejor conservadas de proteínas tirosina quinasas. Cada proteína Abl contiene en su extremo amino terminal los dominios SH3, SH2 y SH1 (homólogos a los dominios 3, 2 y 1 de la tirosina quinasa Src respectivamente), en una organización modular que es común dentro de las tirosina-quininas no receptoras. El dominio SH1 contiene la actividad quinasa y los dominios SH2 y SH3 participan en la regulación de la actividad e interacción con sustratos. El carboxilo terminal de las quinasas Abl terminal presentan un dominio de unión a actina filamentosa, lo que hace a las quinasas Abl capaces de conectar la actividad de fosforilación con la reorganización de los filamentos de actina. En invertebrados el gen de Abl es único y posee algunas variaciones en su estructura dependiendo de la especie. En vertebrados dos parálogos, Abl1 y Abl2, han evolucionado para realizar funciones especializadas. Abl1 incluye una señal de localización nuclear que le confiere propiedades de respuesta frente al daño de DNA, mientras que Abl2 tiene funciones adicionales de unión a microtúbulos y a actina, que promueven sus funciones de remodelamiento del citoesqueleto (Colicelli, 2010).

Muchas evidencias muestran que Abl participa durante el desarrollo neuronal. El único gen de Abl en *Drosophila* es esencial para la viabilidad, y juega un rol central en desarrollo del sistema nervioso central (Colicelli, 2010). *d-Abl* regula el avance del cono de crecimiento organizando la actina intrínsecamente y su localización y ancho de masa (Clarke A y cols, 2020), actuando río abajo del receptor Robo (*Roundabout Homolog*), función que es antagónica a la de la tirosina-fosfatasa. Abl además se requiere en la morfogénesis dendrítica. Estas funciones del desarrollo involucran la fosforilación de los

sustratos Enabled, Abi (proteína interactora de Abl) y Cables y la reorganización de los filamentos de actina y microtúbulos (Colicelli, 2010).

Abl1 y Abl2 están altamente expresadas en las neuronas durante el desarrollo del cerebro de ratón. Abl1 ha sido localizada en las sinapsis y a los conos de crecimiento axonal (Zukerberg y cols., 2000). Abl2 es altamente expresada en el cerebro, donde se concentra en las sinapsis y procesos neuronales. Durante la embriogénesis, los niveles de Abl1 en el cerebro son cerca de 5 veces más abundante que Abl2. Mientras que en el día postnatal 21 (P21) Abl-2 es 8 veces más abundante que Abl-1, y 5 veces más abundante a las 6 semanas de edad. Esta expresión diferencial de Abl1 y Abl2 puede indicar roles diferentes durante el desarrollo cerebral (Moresco, 2006).

Las quinasas Abl actúan en el citoplasma coordinando el remodelamiento de actina en respuesta a estímulos. Estas funciones dependen tanto de la actividad quinasas como de la unión directa a los dominios de unión y polimerización de actina. Más aún, varios de los sustratos de las quinasas Abl son conocidos reguladores del citoesqueleto de actina (Colicelli, 2010) y responden a funciones celulares como adhesión celular/movilidad, guía axonal, formación de filopodia y sinapsis.

Dentro de estos procesos que se ha descrito regulados por las quinasas Abl destaca el de guía axonal, proceso que es crucial para especular su rol en la polarización neuronal y sus efectos en la modulación del citoesqueleto, donde en neuronas fotoreceptoras de *Drosophila*, se describió que la actividad de Abl, es estimulada por Disabled, donde Abl por un lado suprime a Enabled (un factor regulador de actina) y por el otro activa a Trio (una GEF de Rac), activando a Rac y al complejo WAVE y a Arp2/3, que promueve la extensión de redes de actina ramificada (Kannan y cols., 2017), similar a la vía Rac1-WAVE descrita en neuronas granulares de cerebelo en rata, que promueve la polarización neuronal (Tahirovic y colgs., 2010).

En mamíferos también se ha descrito que Rac1 es un sustrato indirecto de Abl, mediado por la activación de SOS-1 (*Son of Sevenless 1*), un GEF de Rac1, lo cual también se observó de forma más específica para Abl-1 en fibroblastos (Sini y cols., 2004; Gerboth y cols., 2018). Algunos estudios en neuronas corticales de ratón, muestran a Abl1 como un regulador positivo del crecimiento axonal, a través de la activación de CDK5/P35 y el

adaptador Cables (Zukerberg y cols, 2000). También se ha descrito la fosforilación de JIP1 (*Interactor Proteico de JNK*), si bien, los autores no profundizaron en el mecanismo, se muestra que una forma constitutivamente activa (CA) de Abl1 aumenta considerablemente el largo axonal mientras un siRNA contra Abl1 disminuye el largo axonal. Por otra parte, si bien, Abl2 fosforila a JIP1, esta no participa en los cambios en el largo axonal (Dajas-Bailador y cols., 2008).

Los estudios del rol de Abl2 en el contexto del desarrollo neuronal temprano son mucho más escasos. Sin embargo, en células tumorales de glioma humano, se ha comprobado que Abl-2 inactiva RhoA mediante la fosforilación y consecuente activación de p190RhoGAP (Shimizu y cols., 2008), esta misma señalización ha sido descrita en fibroblastos (Peacock y Miller, 2007), dónde regula la dinámica de adhesión focal, contractibilidad de actomiosina y la migración celular. Los ratones Abl2^{-/-} tienen una actividad reducida de p190RhoGAP lo que lleva a un aumento de la señalización Rho en neuronas piramidales del hipocampo y afecta la arborización dendrítica y la maduración de las espinas dendríticas (Sfakianos y cols., 2007).

Recientes evidencias sugieren que la existencia de un tono inhibitorio asociado a RhoA que previene la transformación de neuritas menores en axones (Cáceres y cols., 2012; Takano y cols, 2017). En este contexto, es posible que en neuronas en estadios tempranos Abl2 pueda regular negativamente la actividad de RhoA, contribuyendo a la disminución del tono inhibitorio promoviendo el crecimiento de las neuritas menores.

Es posible que los miembros de la familia de proteínas Abl, Abl1 y Abl2, al promover río abajo la actividad de Rac1 y RhoA respectivamente, puedan cumplir un rol diferencial, durante la polarización neuronal.

Hipótesis

“Abl-1 promueve la polarización neuronal a través de la activación de Rac1; mientras que Abl-2 inhibe la adquisición de polaridad “

Objetivo general

Evaluar si la proteína Abl-1 activa Rac1 para promover la polarización neuronal, y si Abl-2 inhibe la polarización neuronal.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar el fenotipo de polarización neuronal en ausencia de Abl-1 siguiendo una curva temporal para comprobar que Abl-1 regula positivamente la polaridad neuronal.
- 2) Evaluar el fenotipo de polarización neuronal al modular la expresión de Abl-2 para comprobar que regula negativamente la polaridad neuronal.
- 3) Determinar actividad de Rac1, con ensayos de pérdida o ganancia de función de Abl, genética y farmacológicamente durante la polarización neuronal.

Materiales

- Abl2-eGFP pN1, CloneTech
- Abl2-a shRNA (mouse), TL513181, Origen
- Ácido acético glacial, Merck.
- Ácido clorhídrico fumante (HCl), Merck
- Activador: 5-(1,3-diaryl-1H-pyrazol-4-yl)hydantoin, 5-[3-(4-fluorophenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl]-2,4-imidazolidinedione **DPH** (SML0202), Sigma Aldrich.
- Agar LB: Agar 1.5% en medio LB.
- Albúmina de suero bovino (BSA), Winkler
- Ampicilina, Winkler
- Amortiguador Fosfato Salino (PBS): 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 0,88 mM), pH 7,4
- Amortiguador Tris Acetato EDTA (TAE): Tris 200mM, 10mM EDTA 10%, Ácido acético glacial 0.1%.
- Amortiguador Tris-Salino TBS 1X (Tris 19.8 mM, NaCl 150 mM), pH 7,4
- Arabinósido de Citosina (AraC), Sigma-Aldrich.
- Azul de Tripán, Gibco.
- Cloruro de potasio (KCl), Winkler.
- Cloruro de sodio (NaCl), Winkler.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma-Adrich.
- Dodecilsulfato Sódico (SDS), Winkler.
- eGFP, Origene.
- Etanol, Merck.
- GelRed, Biotium
- Glicerol, Winkler.
- Glicina, Merck.
- Hidrobromuro de poli-D-lisina, Sigma Aldrich.
- Hidróxido de sodio (NaOH), Winkler.
- Inhibidor: 3-[6-[[4-(Trifluoromethoxy)phenyl]amino]-4-pyrimidinyl]benzamide **GNF2** (G9420), Sigma Aldrich.
- Isopropanol, Merck.
- Kit de purificación de plásmido MIDI, QIAGEN

- L-Glutamina, Gibco.
- Lipofectamine 3000 kit, L3000-15, Invitrogen.
- Medio de Adhesión: DMEM, D-glucosa 19.4 mM, NaHCO₃ 26 mM.
- Medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), Gibco.
- Medio Luria Broth (LB): peptona 1%, extracto de levadura 5%, NaCl 0.5%, NaOH 1N 0.1%.
- Medio de montaje acuoso, Dako.
- Medio Neurobasal, Gibco.
- Paraformaldehído (PFA), SigmaAldrich.
- Partidores sentido y antisentido c-Abl^{fox/fox}, Invitrogen.
- Partidores sentido y antisentido CRE, Invitrogen.
- Penicilina- Estreptomicina (PS), Gibco.
- Polietilenglicol, Sigma Aldrich.
- Propilenglicol, Sigma Aldrich.
- Sacarosa, Merck.
- shCRAMBLE , Origen
- Solución amortiguadora de Lisis de colas: Tris-HCl 50 mM pH:8, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 1%, Proteinasa K (Thermo Scientific) 1%.
- Suero Fetal Bovino (SFB), Biowest.
- Suplemento B-27, Gibco.
- Tripsina-EDTA, Gibco.
- Tris, Winkler.
- Tritón X-100, Winkler.
- Solución de fijación: PBS 1X, Paraformaldehído PFA 4%, Sacarosa 4%.
- Solución de Bloqueo: BSA 3% en PBS 1X.

Anticuerpos.

Anticuerpos primarios:

- Anti β 3-Tubulina (β 3-Tub) hecho en ratón (sc-80016), Santa Cruz.
- Anti Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) hecho en ratón (sc32233), Santa Cruz
- Anti Proteína Asociada a Microtúbulos 2 (Map2) hecho en conejo (sc20172), Santa Cruz
- Anti Tau1, hecho en ratón (PC16C), Millipore.
- Anti Abl1 total (Abl1), hecho en ratón (A5844), Sigma-Aldrich.
- Anti Abl1 fosforilada en tirosina 412 (pAbl1) hecho en conejo (c5250), Sigma-Aldrich.
- Anti Abl2 (Abl2) hecho en ratón (sab5300522), Sigma-Aldrich.
- Anti Abl1/Abl2 fosforilada entre los residuos de tirosina 393/429, (pAbl1/2) hecho en conejo (sab4300273), Sigma-Aldrich.
- Anti Cofilina (Cofilina) hecho en ratón (ma5-17275), Thermo Fisher Scientific.
- Anti Cofilina fosforilada en Serina 3 (p-Cofilina) hecho en conejo (77G2), Cell Signaling.
- Anti Rac1 (Rac1) hecho en conejo (05-389), Millipore.

Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP):

- Anti IgG de ratón (31430), Thermo Scientific.
- Anti IgG de conejo (31460), Thermo Scientific.

Anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor:

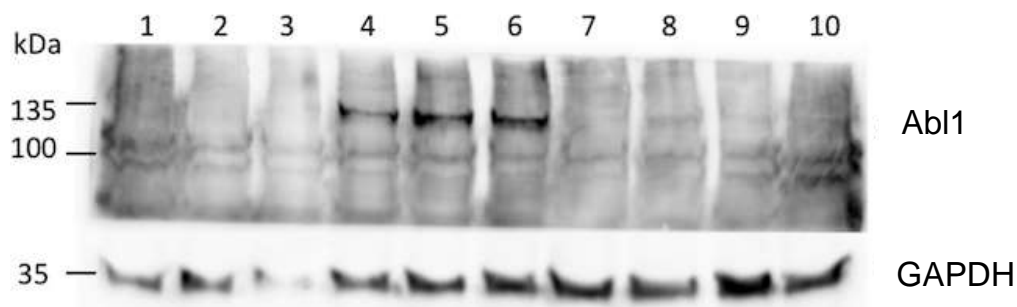
- Anti IgG de conejo 555
- Anti IgG de ratón 488
- Anti IgG de ratón 633 (a21052), Thermo Scientific.
- Anti IgG de ratón 555 (a21422), Thermo Scientific.

Métodos

Cultivo primario de neuronas:

Se trabajó con ratas Sprague-Dawley. Los cultivos de neuronas hipocampales o corticales fueron preparados de forma previamente descrita con algunas modificaciones (Alvarez y cols, 2004b; Kaech and Banker, 2006). Las ratonas preñadas de 18 días fueron adormecidas con un flujo de 5 L/min de CO₂, luego se extrajeron los embriones los cuales fueron mantenidos en una solución salina balanceada de Hank. Hipocampos y cortezas de ratas *Sprague Dawley* del día embrionario 18 (E18) fueron removidos, disectados sin meninges en PBS libre de Ca²⁺/Mg²⁺ 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 0,88 mM), pH 7,4) y lavados 2 veces con PBS para permitir que el tejido se asiente en la base de los tubos. Luego del segundo lavado, el tejido se incubó con tripsina al 1% durante 20 minutos a 37°C. Luego de 3 lavados con PBS, el tejido se disoció mecánicamente 3 veces con medio de adhesión (DMEM con suero de caballo al 10%, 100U/ml de penicilina y 100ug/ml de streptomycin), con pipetas en puntas p1000, pasando el tejido suavemente 10 veces por cada disociación y luego con puntas p200 repitiendo 2 veces la disociación mecánica. Las neuronas hipocampales disociadas fueron sembradas en coverlips previamente incubadas con poly-l-lisina y lavadas tres veces con H₂O, a una densidad de 5×10^3 para IF ó 3×10^4 en caso de transfecciones. Cultivos se mantuvieron a 37°C en 5% de CO₂ por 2-3 horas, luego se cambió a medio de crecimiento Neurobasal completo, 2 mM l-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomycin, y 3.5 µM Ara C para reducir la cantidad de células gliales.

Para el cultivo de neuronas hipocampales Abl1-KO se utilizaron embriones de ratones de una cruce de ratones transgénicos comerciales que expresan la recombinasa CRE asociado al promotor de Nestina *B6.Cg-Tg(nes-cre)^{1Kln}/J* (003771) y ratones de una colonia de ratones Abl1-KO *B6.129S4-Abl1^{tm1Ajk}/J* (024286) los cuales fueron donados por Koleske A el 2009, y son mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas FCB de la UC. Los embriones de esta cruce son los que son utilizados como material de cultivo de neuronas hipocampales y se prepara el cultivo igual que lo descrito anteriormente, pero manteniendo cada par de hipocampo por separado, los que deben ser genotipificados posteriormente por PCR y WB (figura 01). El manejo de animales fue siempre aprobado bajo los comités de ética explicitado en el proyecto FONDECYT 1161065.



Esquema 2: Western Blot de Abl1 del modelo Abl1-KO: Funcionamiento del modelo de Abl1-KO, utilizando corteza de los embriones (1-10) para comprobar la presencia y ausencia de la proteína Abl1 mediante Western Blot, Abl1 banda en 135 kDa, GAPDH 35 kDa.

Inmunofluorescencia:

Neuronas hipocampales fueron sembradas en coverlips previamente incubadas con poli-lisina en placas de 24 pocillos, a una densidad de 5×10^3 , para los estudios de polarización neuronal morfológicos, 3×10^4 - en caso de experimentos de transfección con DNA. Incubadas con medio Neurobasal completo. A los días 1, 2 y 3 *in vitro*, se lavaron los cubreobjetos con PBS 1X, se fijaron con paraformaldehído 4%, sacarosa 4% en PBS 1X, y se dejaron a 4°C durante la noche o 20' a temperatura ambiente, luego se lavaron 2 veces con PBS 1X, se procedió a permeabilizar con Tritón X-100 al 2% por 10 minutos, luego de lavar con PBS 1X, se procedió a incubar con solución de bloqueo: suero fetal bovino BSA al 3% en PBS 1X durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante la noche a 4°C, se lavaron 3 veces con PBS x 5 minutos y se incubaron con anticuerpos secundarios Alexa por 2 horas a temperatura ambiente, luego de lavar 3 veces con PBS 1X, se procedió a montar con solución de montaje Daco y luego se sacaron fotos en microscopía confocal usando el microscopio Confocal Zeiss xx o Confocal TimeLapse Nikon, y se analizaron las imágenes con el programa *Image J*.

Tratamientos:

Se moduló la activación o inhibición de las quinasas Abl con DPH o GNF2, respectivamente a una concentración de 5 μ M a neuronas corticales sembradas en placas de 100 mm para el caso de los experimentos de WB y Pull-Down y en placas de 24 para los experimentos de Inmunofluorescencia. A 18 horas luego de haber sido sembradas, se

dejaron posteriormente por 48 horas el caso de WB y 36 horas para IF. Como control se ocupó DMSO con la menor dilución v/v respectiva a los tratamientos.

Transfecciones:

Las neuronas hipocampales se sembraron a una densidad de 3×10^4 , 3 horas luego de sembradas en medio de adhesión se incubaron con la mezcla previamente incubada por 20 minutos de 1 μ l de Lipofectamina 3000 por pocillo (previamente incubada por 5 minutos con medio neurobasal tibio) y 1 μ l de P3000 más 0.5 μ g de DNA blanco por pocillo (shAbl2, shSCRAMBLE, eGFP, Abl2eGFP) también incubadas por 5 minutos con neurobasal tibio. Luego se agregaron 100 μ L de la mezcla a cada pocillo y se vertió gota por gota a las neuronas recién cambiadas a medio neurobasal completo con AraC precalentado, y se incubaron a 37°C por 2 días. Luego de fijadas las neuronas transfectadas se seleccionaron y analizaron por microscopía confocal.

Western Blot

Extracción de proteínas: neuronas hipocampales o corticales previamente lavadas en PBS 1X se le extrajeron proteínas a 4°C en Buffer de Lisis fresco (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Desoxicolato de sodio, 0.5%, NP-40 1%, SDS 0.1%, EDTA 2 mM. Suplementado con Floruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, Leupeptina 1 μ g/mL, O-Vanadato de sodio 1 mM, Floruro de Sodio 1 mM) con inhibidores de fosfatasa y proteasas, de forma mecánica con un raspador celular o “cepillo”, durante 5 a 10 minutos, por toda la superficie de las placas, luego se centrifugaron en tubos *eppendorf* de 1,5 mL a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se guarda el sobrenadante y luego se almacenaron a 20°C.

Electroforesis en gel y Western Blot: Para realizar los estudios de Western-Blot se prepararon muestras de 50-60 μ g de proteínas, se denaturaron las proteínas de la muestra en seco a 95°C por 5 minutos. Se separaron las proteínas en geles de poliacrilamida (10 o 15%). La electroforesis se realizó a 90 V por 20 minutos y luego a 110 V por 120-140 minutos. Luego se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de PVDF (previamente activada con metanol), a 0.4 A por 1 hora en frío. Luego la membrana se bloqueó en BSA 3% en TBS-T (Tween 0.1% en TBS 1X), y se recortaron en función del peso molecular. Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios. Al día siguiente se lavó con TBS-T 3 veces por 5-10 minutos cada lavado, y luego fueron incubadas a temperatura ambiente contra los anticuerpos secundarios HRP correspondientes. Luego se lavó con TBS-T 3 veces por 5-10 minutos cada lavado. Finalmente, los anticuerpos se detectaron y visualizaron en el equipo G-Box por

quimioluminiscencia (Pierce ECL) revelando la presencia de proteínas. La abundancia relativa de cada proteína se cuantificó utilizando el software ImageJ (National Institute of Health), y se corrigieron por la abundancia relativa del control de carga: GAPDH o β -tubulina de cada muestra.

Pull Down de proteínas de fusión de Glutación Transferasa en Sefarosa (GST):

Se equilibró la resina de GST previamente inmovilizada (30 μ l por tubo) 3 veces lavando con 1 mL de amortiguador de captura (*Fishing*): se resuspendió, se agitó por inversión a 4°C por 5 minutos y se centrifugó por 3 minutos a 1300 rpm y se retiró el sobrenadante. Luego se agregó 1mg de proteína total a los tubos que contienen la resina, se aforó con agua a 1ml, se agitó por 70 minutos a 4°C y luego se centrifugaron a 1300 rpm, se descartó el sobrenadante con cuidado de no tomar la resina. Luego se lavó 3 veces con 1mL de amortiguador de Lavado agitando a 4°C por 5 minutos, centrifugando a 1300 rpm entre cada lavado y se descartó el sobrenadante con cuidado de no tomar la resina. Finalmente, el ultimo lavado se retiró con una p20 de punta larga para evitar tomar resina, se agregaron 20ul de buffer de carga 5X y 20 μ L de agua, se denaturaron las proteínas a 95°C por 5 minutos y se hizo *vortex* por 1 minuto aproximadamente. Estas muestras quedan listas para cuantificar por Western Blot.

Reactivos y Soluciones para Pull-Down:

- Amortiguador de captura (*Fishing*): 10% Glicerol, 1% Tritón X-100, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 25 mM NaF, Agua
- Amortiguador de Lavado: 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl, Agua
- Sefarosa-GST inmovilizado con el dominio de unión a Rac1-GTP de PAK, preparado en el laboratorio de Christian Gonzalez-Billault.

Análisis estadístico

Para la mayoría de los experimentos se asumió una distribución normal, y se utilizó el análisis *t-student* no pareado, para evaluar la hipótesis nula. Además, en estos análisis se utilizó la corrección de *Welch's* por ser muestras independientes y con diferentes variaciones, y así evaluar si la diferencia de los promedios es nula o es significativa.

Para el caso del experimento dónde evaluamos dos factores: genotipo y tratamiento, sobre el porcentaje de neuronas polarizadas (el efecto), se utilizó ANOVA de dos vías, para evaluar la interacción de esos 2 factores sobre la polarización neuronal, y se realizó un análisis múltiple de comparación de *Tukey's*. Sólo se realizaron test estadísticos para los experimentos con N=3

Resultados

Niveles de las quinasas Abl en neuronas durante las etapas clave de polarización neuronal

En primera instancia revisamos los niveles de las quinasas Abl1 y Abl2 en neuronas hipocampales durante los estadios 2 y 3 de la polarización neuronal. Para ello trabajamos con neuronas de 6 h en cultivo, donde la mayoría no ha extendido un claro axón, que refleja la etapa 2, y a las 40 h en cultivo, donde la mayoría de las neuronas ha empezado a formar el axón y, por lo tanto, presentan inmunoreactividad contra el epitopo Tau1, a lo que llamamos etapa 3, indicando que están neuronas ya han polarizado. En neuronas hipocampales en condiciones basales se observó la presencia de las proteínas Abl1 y Abl2. Además, se observó que los niveles de la quinasa Abl1 y su forma activa. Lo que se evidenció por su fosforilación en la tirosina 412, que aumenta en el estadio 3 con respecto al 2. La fosforilación en la tirosina 412 es clave pues indica una estimulación de la actividad quinasa en el sitio de autofosforilación, necesaria para su actividad *in vivo* (Brasher y colgs., 2000).

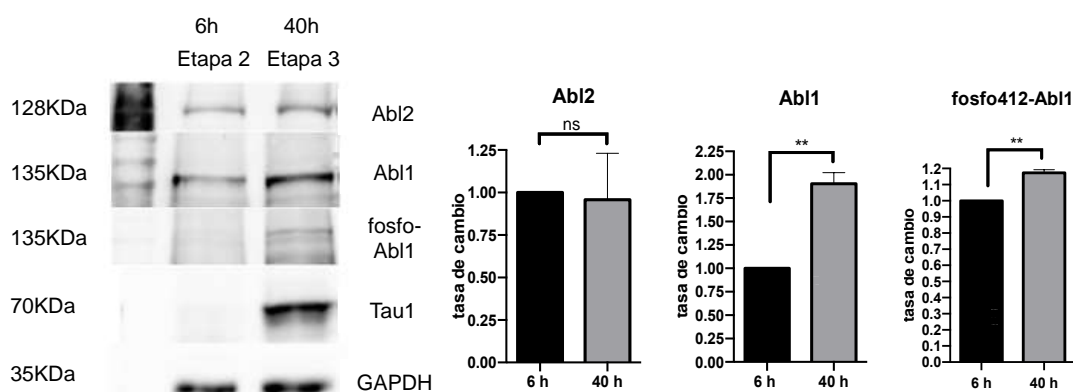


Figura 1: Aumento de los niveles y actividad de Abl1 en neuronas polarizadas Tau1+.

Abl1 total y activa está aumentada en la etapa 3 con respecto a la etapa 2 de desarrollo neuronal, mientras que Abl2 no muestra cambios significativos. Para Abl1 fosforilada (pAbl1) se normalizó por Abl1 total y GAPDH, mientras que para Abl1 solo por GAPDH. 60 μ g de proteínas corridas en gel del 10% acrilamida desnaturalante (SDS) de proteínas extraídas de neuronas hipocampales a las 6 h y a las 40 h después de sembradas en pocillos de 6, a una densidad de 1×10^6 neuronas/cm³. Los resultados cuantitativos son el promedio \pm SEM. Análisis de test pareado *t-test* y *ratio paired t-test*, N=3 **P < 0.01

Este primer experimento es importante porque indica que durante el período en donde se ha descrito que ocurre la transición entre una neurona no polarizada (sin la presencia de Tau1) a una neurona polarizada, los niveles de Abl1 activa aumentan, lo que podría

significar que se requiere la función de Abl1 durante la polarización neuronal. Por otro lado, se ve que los niveles de Abl2 se mantienen constantes entre la etapa 2 y la etapa 3 definidas para este experimento.

Localización de las quinasas Abl

Se evaluó la localización de Abl1 fosforilada en la tirosina 412 y de Abl2 en neuronas hipocampales que se encuentran en la etapa 2 y etapa 3 de desarrollo neuronal mediante inmunofluorescencia doble (figura 2). En este caso se definieron las etapas 2 y 3 morfológicamente, donde la neurona cuya neurita sea el doble en longitud a la segunda neurita, y su longitud supere los 50 μm se consideró polarizada o en etapa 3.

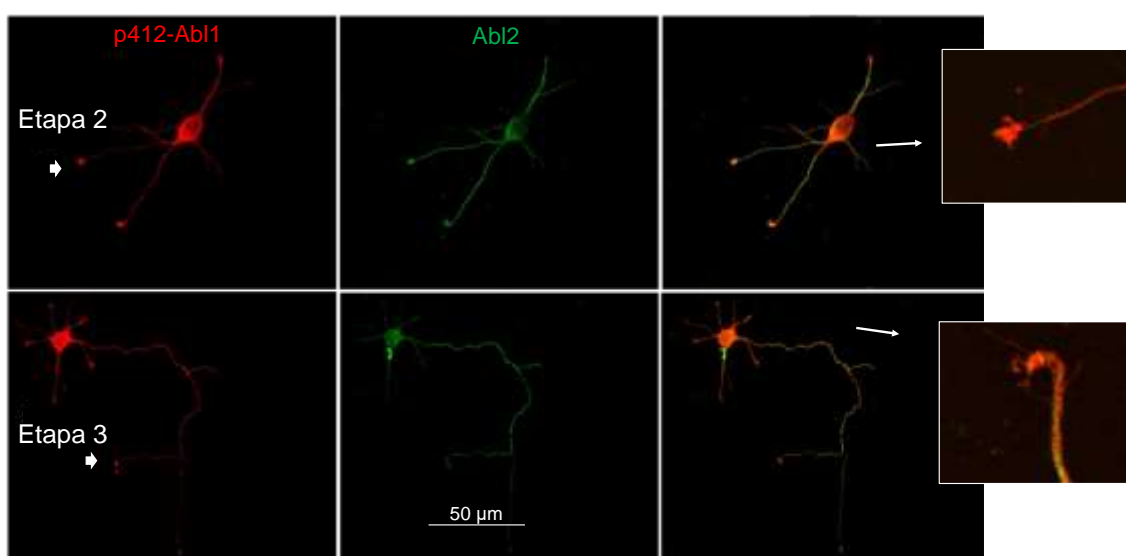


Figura 2: Localización de las quinasas Abl1 y Abl2 es diferencial: Imágenes representativas de neuronas hipocampales de 2DIV que están en etapa 2 o 3 de desarrollo neuronal. Lentes con inmersión de aceite 40x, Microscopio confocal Zeiss, Abl1 fosforilada en Tyr412 seguida como p412-Abl1 y en rojo, dilución de 1:200; Abl2 dilución 1:75 seguida en verde. Imágenes en zoom de los conos de crecimiento, lentes con inmersión de aceite 100x, Microscopio Confocal TimeLapse Nikon.

En neuronas en etapa 2 y 3 se observa que la señal para la quinasa Abl1 activa, seguida por el anticuerpo para la tirosina 412 de Abl1 fosforilada fosfo-Abl1 (en rojo); así como la señal de Abl2 está presente en el soma y a lo largo de las prolongaciones de la neurona. Sin embargo, aunque ambas señales están presentes con una distribución global similar ésta no es igual; la señal de fosfo-Abl1 presenta mayor intensidad en los conos de crecimiento del axón y de los procesos menores y en las protrusiones de tipo filopodia. La señal de fosfo-Abl1 en los conos de crecimiento parece ser mayor en etapas más tempranas, en neuronas en etapa 2, cuando la simetría aún no se quiebra. Abl2 también

está presente en el soma y neuritas en las etapas 2 y 3 pero no presenta una intensidad mayor en los conos de crecimiento y en etapa 3 se observa una mayor intensidad de señal a lo largo del axón respecto a las neuritas menores.

Abl2 no está presente en las prolongaciones tipo filopodia que rodean los conos de crecimiento (señalizado con flechas en Figura 2). En la figura 3 se compara la señal relativa de las formas activas de Abl1 y Abl2 seguidas por la fosforilación de la tyr212 y las tyr429 respectivamente. La señal para fosfo-Abl1 es claramente distinguible en neuronas etapa 2 y 3 concentrada en conos de crecimiento incluyendo la zona distal y el cono de crecimiento del axón. Sin embargo, la de fosfo-Abl2 es más débil y se puede observar en el soma y a lo largo de las neuritas menores y axón. A diferencia de su paróloga activa, pAbl2 no está presente o aumentada en los conos de crecimiento (Figura 3).

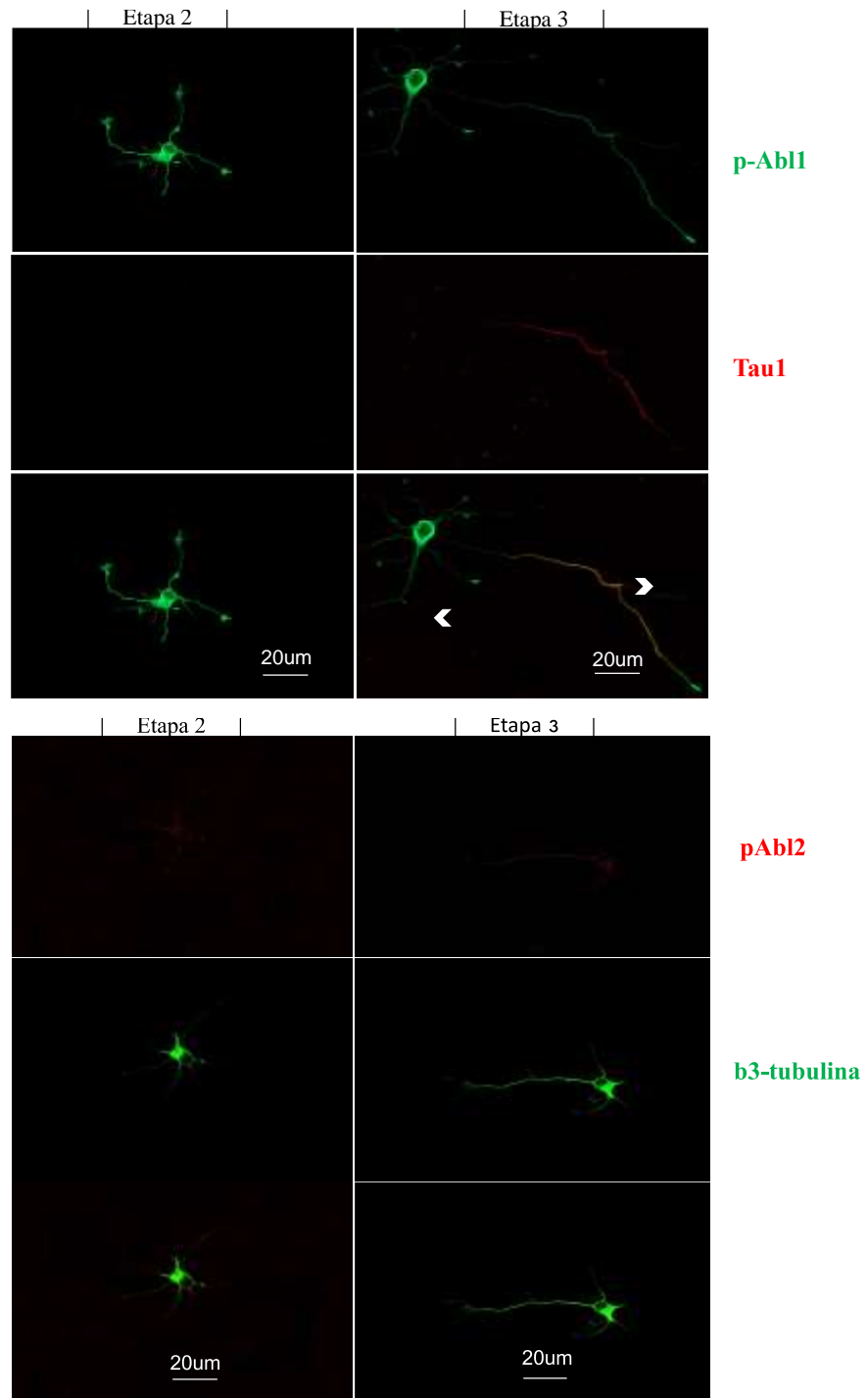


Figura 3: Localización diferencial de las formas activas de Abl1 y Abl2 durante la polarización neuronal: Imágenes representativas de neuronas hipocámpales en etapa 2 y 3. Lentes con inmersión de aceite 40x, Microscopio confocal Zeiss, Arriba: Inmunofluorescencia doble de Tau1 (ms) para marcar axón, dilución 1:300 (Milipore) en rojo; fosfoTyr412-Abl1(rb) dilución 1:200 (ThermoFisher) en verde; Abajo: Inmunofluorescencia doble en neuronas nulas de Abl1 para observar fosfo-Abl2 usando el anticuerpo para fosfo Tyr393/429 Abl1y2 dilución 1:100 (pAbl2) en rojo; anticuerpo para b3-tubulina dilución 1:500. Lentes con inmersión de aceite 40x, Microscopio confocal Zeiss.

Neuronas en ausencia de Abl-1 (Abl1-KO) presentan un retraso en la adquisición de polaridad neuronal.

Para evaluar si Abl1 regula la polarización neuronal comparamos morfológicamente neuronas hipocampales obtenidas de embriones *wild type* (WT) o embriones nulos para Abl1 (Abl1-KO). Las neuronas se sembraron a una densidad de 5×10^3 por cubreobjeto y se fijaron a los 1, 2 y 3 días *in vitro* y se inmunodetectó β 3-tubulina y actina mediante faloidina para revelar la morfología neuronal. A medida que el cultivo madura las neuronas se polarizan y a distintos días *in vitro* se encuentra distinta proporción de neuronas que han iniciado un axón. Así evaluamos la polaridad definiendo el índice de polaridad como el *número de neuronas con una neurita de longitud mayor que 50 μ m y que esta sea el doble de largo de la segunda neurita más larga.*

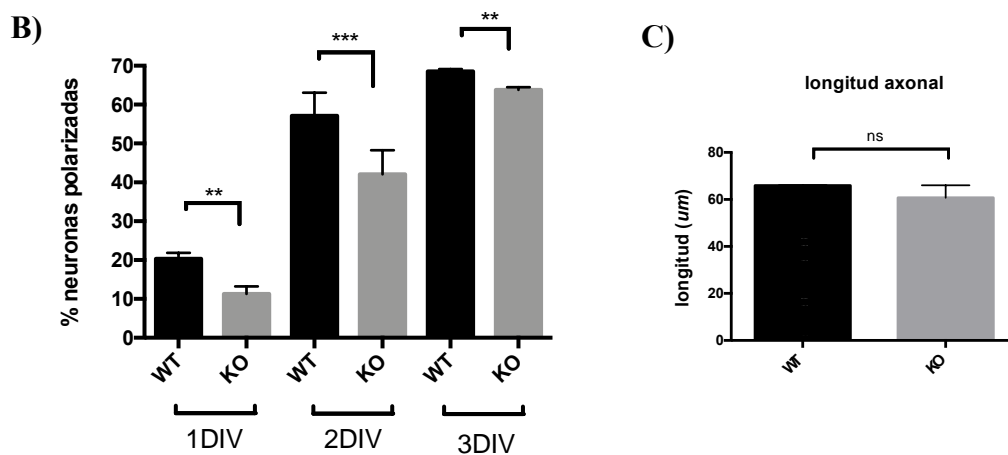
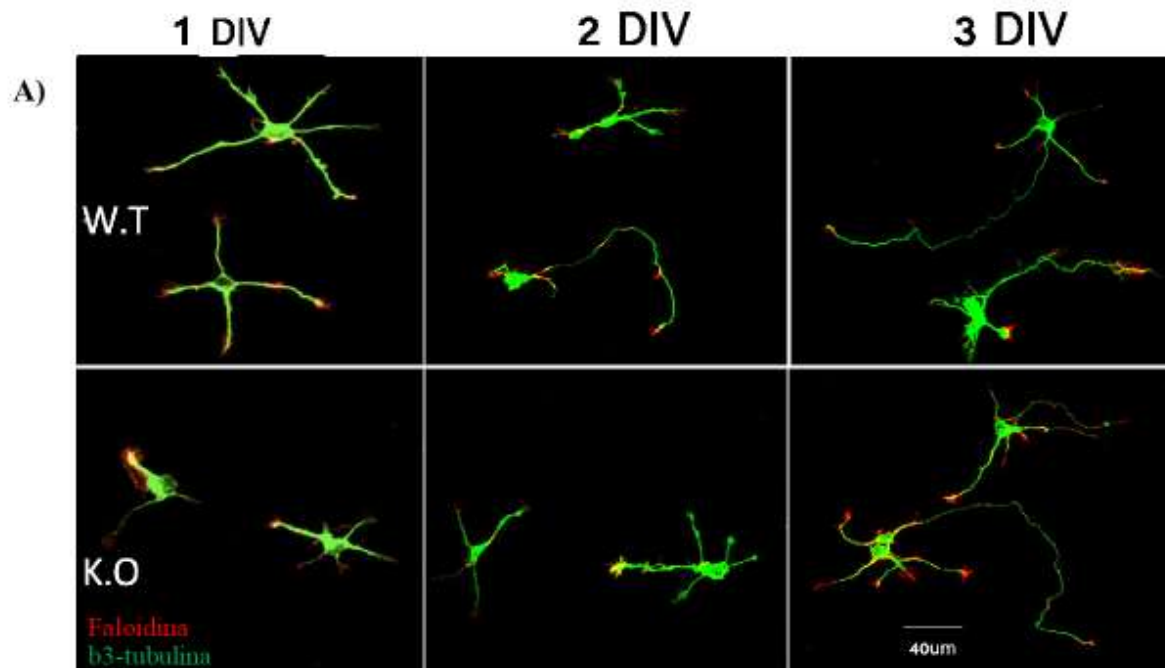


Figura 4: Neuronas Abl1-KO presentan un retraso en la adquisición de polaridad neuronal: A) Imágenes representativas de neuronas WT vs KO para Abl1, a los 1, 2 y 3 DIV, tomadas en microscopio confocal Zeiss, en lentes 40x. Inmunofluorescencia con anticuerpo primario para tubulina ($\beta 3$ -tubulina) en verde dilución 1:500 y para actina uso de tinción de faloidina en rojo 1:500 B) Cuantificación del porcentaje de neuronas que cumplen con el índice de polaridad a los 3 tiempos descritos *** $P < 0.001$ versus WT (student's t-test) Los resultados cuantitativos son el promedio \pm SEM de 60-80 neuronas analizadas por condición. C) Promedio del largo axonal de las neuronas de 2 DIV en neuronas WT vs KO.

En este análisis morfológico de polarización neuronal se observa que las neuronas Abl1-KO tienen un menor porcentaje de neuronas polarizadas en los 3 primeros días de cultivo, siendo el 2DIV el tiempo que presenta la diferencia más significativa entre fenotipos.

Dado que la estructura del cono de crecimiento y su dinámica es clave en la extensión de neuritas y del axón, se siguieron algunos parámetros morfológicos en neuronas WT y

neuronas nulas de Abl1. Las neuronas nulas de Abl1 presentan conos de crecimiento con una mayor área, son más grandes que las neuronas WT, también los microtúbulos que ingresan al cono de crecimiento se presentan menos ordenados, así, el ángulo de la señal de tubulina desde el cono de crecimiento con respecto al axón, es menos extendido, dando cuenta de una mayor desviación de los microtúbulos en las neuronas nulas de Abl1 vs las neuronas WT (figura 5).

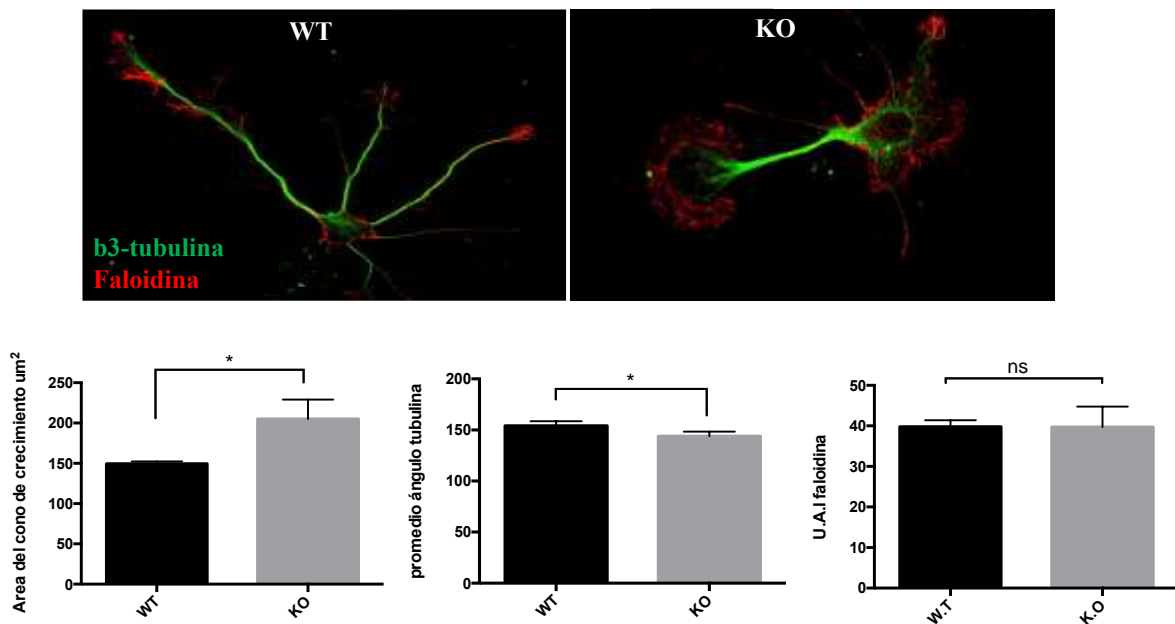


Figura 5: Neuronas nulas de Abl1 presentan conos de crecimiento más grandes y más oblicuos: Las neuronas de 2 DIV se tiñeron con anticuerpos para $\beta 3$ -tubulina en verde dilución 1:500 y faloidina en rojo dilución 1:500 para actina y se les midieron parámetros morfológicos a sus conos de crecimiento, tales como área, ángulo de tubulina e intensidad de faloidina. Microscopio confocal Zeiss, lentes con aceite de inmersión 60x. Los resultados cuantitativos son el promedio \pm SEM 28-30 neuronas analizadas por condición, con N=3. Análisis estadístico *t-student* con test paramétrico. * $p < 0,5$.

Abl1 promueve la polarización neuronal mientras que Abl2 la inhibe

Explorando el efecto de las quinasas Abl en la polarización neuronal con herramientas farmacológicas se procedió a utilizar el inhibidor específico de las quinasas Abl, GNF2 y el activador específico DPH, observándose en neuronas hipocampales de ratas WT que el tratamiento de GNF2 a las neuronas promueve la polarización neuronal, mientras que el tratamiento con el activador DPH inhibe la polarización neuronal (figura 6). Para analizar la polarización neuronal las neuronas se inmunomarcaron con Map2 marcador de dendritas y Tau como marcador axonal. Definiendo las neuronas polarizadas como las que son positivas para Tau1.

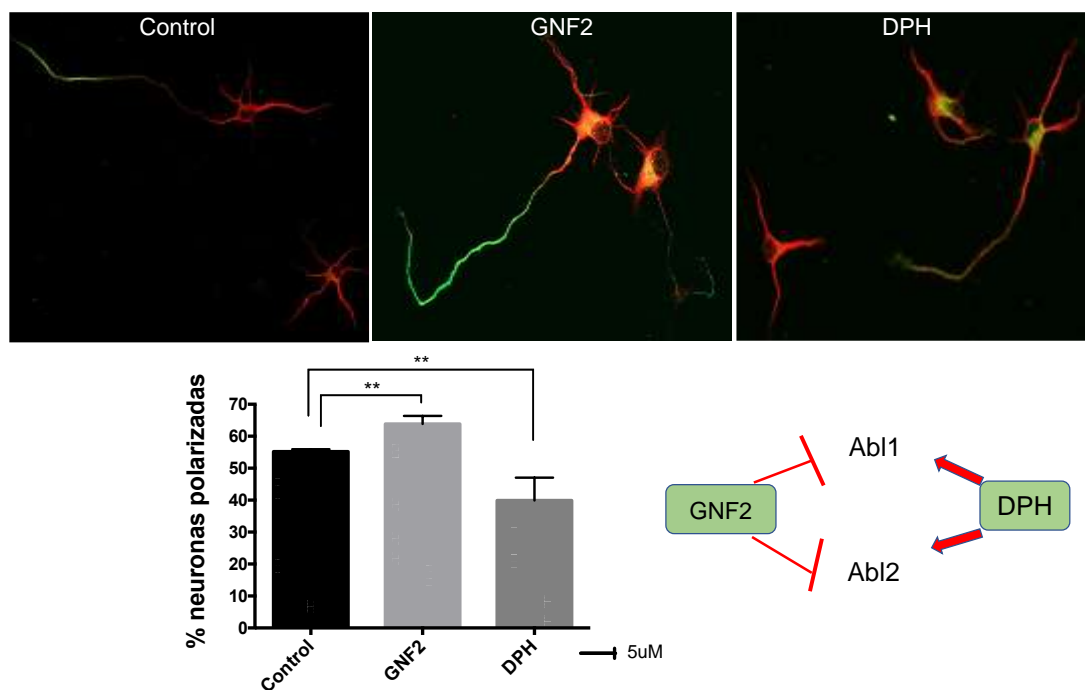


Figura 6: Modulación de la actividad de las quinasas Abl1 y Abl2 genera una perturbación en la polarización neuronal: Las neuronas hipocampales de ratas Sprague-Dawley fueron sembradas en cubres de 24 pocillos a una densidad de 5×10^3 y sometidas a tratamiento 16 h post sembrado con vehículo DMSO, inhibidor GNF2 $5 \mu\text{M}$, y activador DPH $5 \mu\text{M}$, y luego fijados a los 2 DIV (48 h post sembrado), se inmunodetectó Tau1 como marcador axonal a una dilución de anticuerpos 1:300 y Map2 como marcador dendrítico con anticuerpos a dilución 1:400. Los resultados cuantitativos son el promedio \pm SEM; Se analizó el porcentaje de neuronas polarizadas con la presencia de Tau1. Resultados cuantitativos son el promedio \pm SEM de 60-80 neuronas analizadas por condición, con un $N=3$ Test $**p < 0,05$ *t-student* no pareado.

Dado que los resultados anteriores con el genotipo Abl1-KO sugieren que Abl1 promueve la polarización neuronal y los experimentos farmacológicos con el inhibidor y activador específico de las quinasas Abl, GNF2 y DPH respectivamente, sugieren que en conjunto las quinasas Abl inhiben la polarización neuronal, llevó a formular que las quinasas Abl1 y Abl2 tendrían roles diferenciales en la polarización neuronal. Para disectar el rol de la quinasa Abl1 y Abl2 se analizó la polarización neuronal en neuronas nulas para Abl1 (Abl1-KO) las cuales tienen Abl2, pero tratadas con los inhibidores Imatinib o GNF2 para inhibir específicamente a Abl2 o DPH para activar específicamente a Abl2. Se utilizaron neuronas de 2 DIV, día en el cual se observan mayores diferencias entre el genotipo Abl1-KO y el WT. Para analizar la polarización neuronal las neuronas se inmunomarcaron con Map2 marcador de dendritas y Tau como marcador axonal.

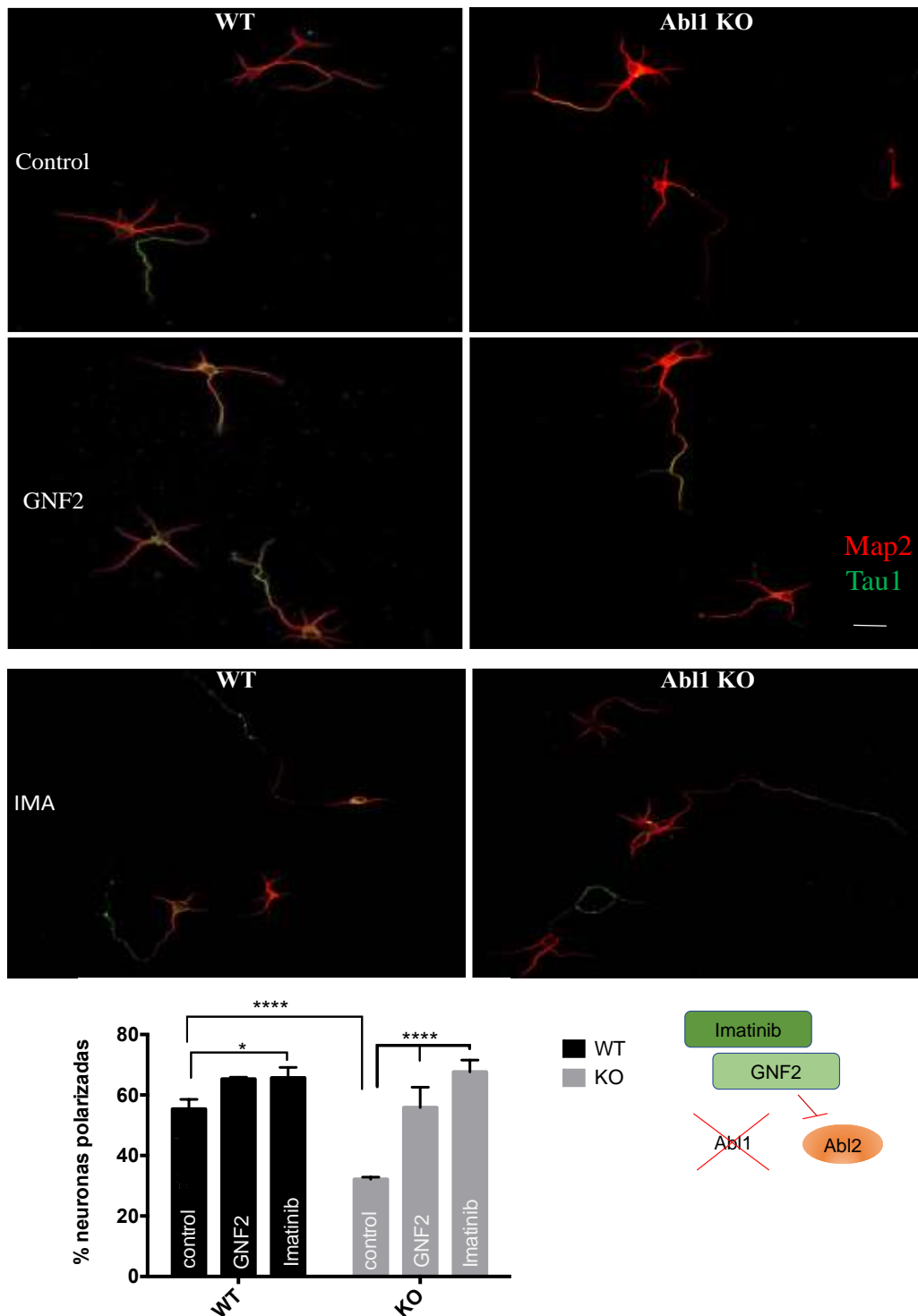


Figura 7: Inhibición de Abl2 en neuronas en ausencia de Abl1 promueve la polarización neuronal: Tratamiento de neuronas hipocampales con inhibidores de Abl 16 h post sembradas (GNF2 e Imatinib 5 μ M cada uno) a una densidad de 5×10^3 fijadas a los 2 DIV e inmunomarcadas con anticuerpos Map2 dilución 1:400 y anticuerpo Tau1 dilución 1:300. A) Imágenes representativas de neuronas tratadas y teñidas para Map2 (rojo) y Tau1 (verde) B) Porcentaje de neuronas con polarización en ambos genotipos y con diferentes tratamientos **** $P < 0,0001$ se condujo un ANOVA de dos vías con post-test de Tukey's. Hay una significativa interacción entre el genotipo y el tratamiento sobre la polarización neuronal $p = 0,0003$. Los resultados cuantitativos son el promedio \pm SEM de 80-100 neuronas analizadas por condición.

Neuronas hipocampales Abl1-KO de 2 DIV exhiben una disminución en el porcentaje de neuronas polarizadas versus neuronas WT. En neuronas WT se produce un aumento en porcentaje de neuronas polarizadas y en neuronas Abl1-KO el tratamiento con inhibidores de Abl (inhibiendo Abl2) produce un aumento de la polarización neuronal.

En esta línea, se realizó el mismo experimento, pero ahora se ocupó un activador de las quinasas Abl: DPH, como era de esperar, se observa el efecto contrario (figura 8), tanto para las neuronas W.T como para las neuronas Abl1-KO, el tratamiento genera una disminución en el porcentaje de neuronas polarizadas. Sugiriendo que las quinasas Abl1 y Abl2 poseen roles diferenciales durante la polarización neuronal.

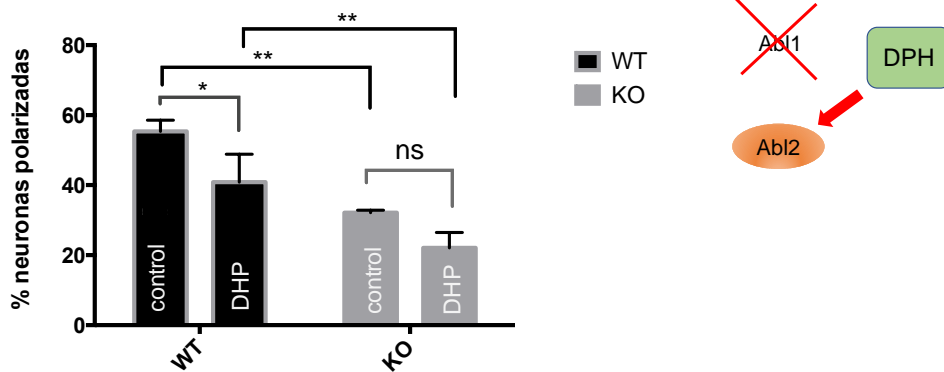
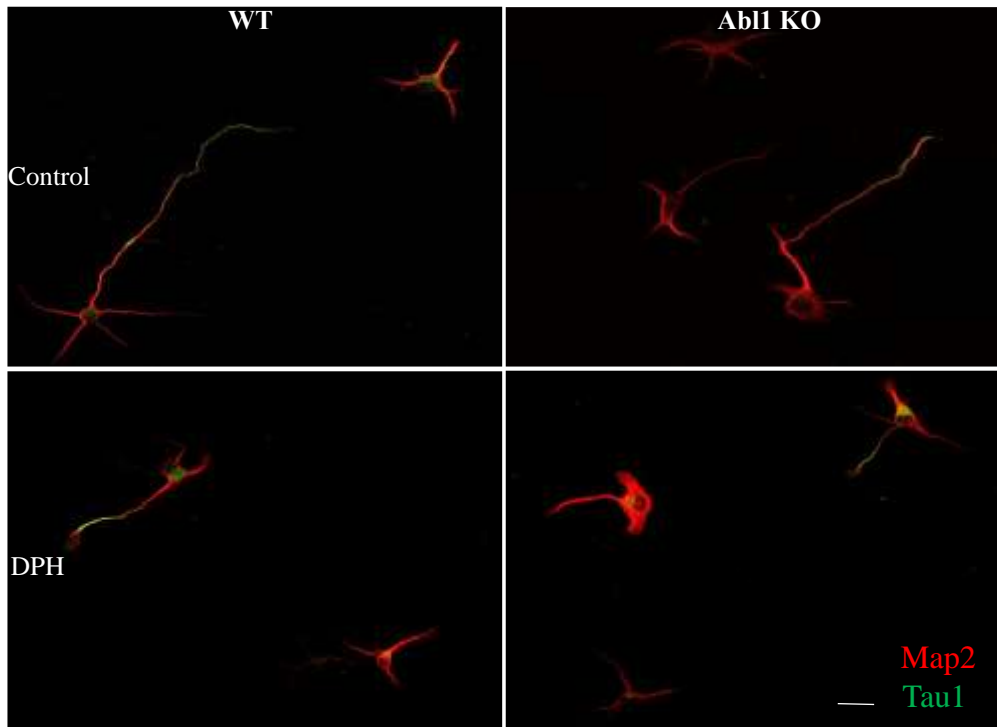


Figura 8: Activación de Abl2 en neuronas Abl1-KO disminuye el porcentaje de polarización neuronal: Las neuronas hipocámpales Abl1-KO de 2 DIV exhiben una disminución en el porcentaje de neuronas polarizadas versus las neuronas WT después del tratamiento con el activador de Abl (DPH 5 μ M) 16 horas post sembradas en pocillos de 24 a una densidad de 5×10^3 y fijadas a los 2 DIV se inmunomarcó con anticuerpos anti-Map2 dilución 1:400 y anti-Tau1 a dilución 1:300. Imágenes representativas de neuronas control y tratadas con DPH, teñidas para Map2 (rojo) y Tau1 (verde). Porcentaje de neuronas que poseen polaridad en ambos genotipos $**P < 0,05$ se condujo un ANOVA de dos vías con post-test de Tukey's. Resultados cuantitativos son el promedio \pm SEM de 90-100 neuronas analizadas por condición

Las neuronas hipocámpales Abl1-KO de 2 DIV exhiben una disminución en el porcentaje de neuronas polarizadas versus las neuronas WT después del tratamiento con el activador de Abl DPH. En neuronas Abl1-KO se profundiza esta disminución de polarización neuronal vs neuronas WT.

Estos resultados indican que Abl1 y Abl2 estarían contribuyendo diferencialmente al proceso de polarización neuronal, al modular la actividad de Abl2 en neuronas nulas de Abl1, se obtiene un efecto opuesto al genético, en el cuál la ausencia de Abl1 genera una disminución en el porcentaje de neuronas polarizadas, y cuando en este mismo contexto genético se inhibe la actividad de Abl2, el porcentaje de neuronas polarizadas aumenta, o si en el caso contrario, se activa Abl2, el porcentaje de neuronas polarizadas disminuye.

Abl2 inhibe la polarización neuronal

Para comprobar que Abl2 tiene un efecto opuesto a Abl1, se realizaron experimentos de pérdida o ganancia de función. Para ello se hicieron co-transfecciones a neuronas hipocampales de 16 h post sembradas con DNA *short hairpin* contra Abl2 vs *scramble*-eGFP, y se evaluaron las neuronas transfectadas a los 3DIV (figura 9). Los resultados mostraron que la disminución de los niveles de transcritos para Abl2 genera un aumento en el porcentaje de polarización neuronal comparado con la situación control. Para ver el efecto de la sobre-expresión de Abl2 en la polarización neuronal se recurrió a la misma técnica experimental utilizando un vector de Abl2 y EGFP (figura 10), transfectando eGFP como control y cotransfectando eGFP + Abl2-eGFP en el tratamiento.

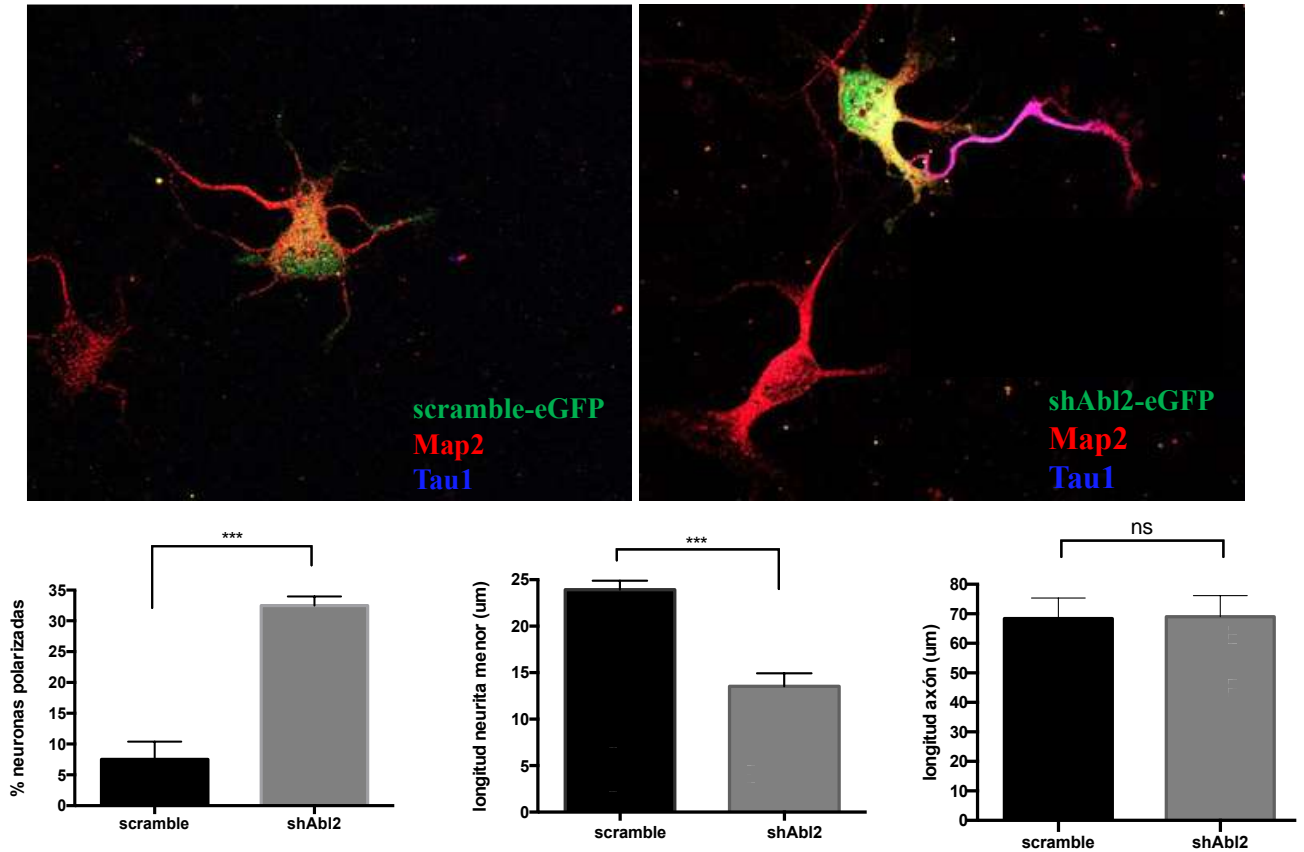


Figura 9: Silenciamiento de Abl2 promueve la polarización neuronal: Imágenes representativas de neuronas hipocamapales de 3DIV co-transfectadas con shSCRAMBLE +eGFP (control) versus shAbl2+eGFP usando lipofectamina 3000, 16 h después de sembradas a una densidad de 3×10^4 en pocillos de 24 fijadas a los 3DIV e inmunomarcadas para Map2 (rojo) con anticuerpos a dilución 1:400 y para Tau1 (azul) con anticuerpos a dilución 1:300. Los gráficos representan el porcentaje de neuronas transfectadas que están polarizadas en ambos tratamientos. Los resultados representan el promedio \pm SEM de la longitud del axón y de las neuritas menores correspondiente entre 15-25 neuronas analizadas por condición, con un N=3. ***P< 0,005 versus control (*Student's t-test*).

Lo interesante de este experimento fue la observación de que la longitud de las neuritas menores disminuye en las neuronas silenciadas para Abl2, y no hay cambios en la longitud del axón, lo que sugiere un posible rol de Abl2 regulando la actividad de Rho.

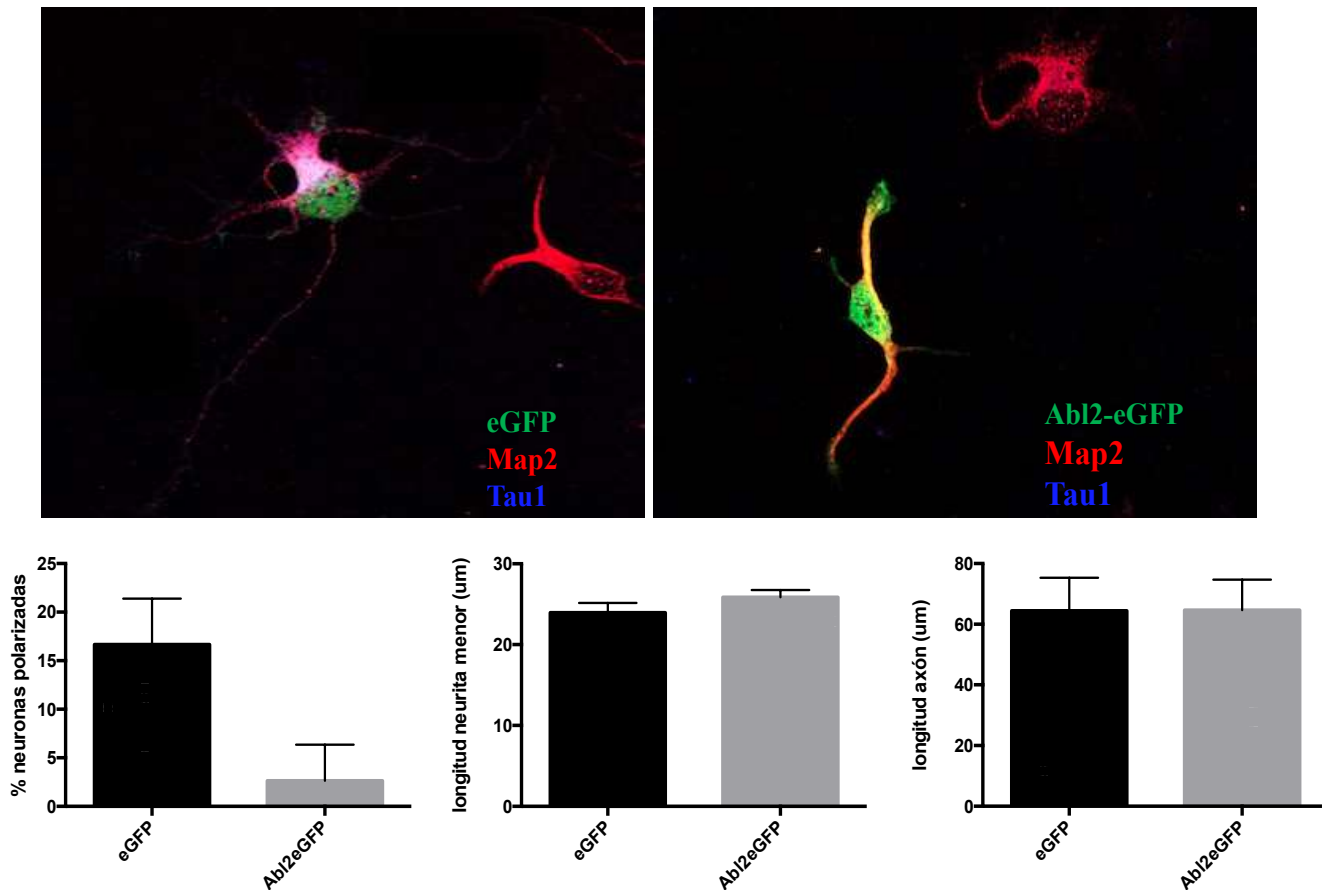


Figura 10: Sobreexpresión de Abl2 inhibe la polarización neuronal: Imágenes representativas de neuronas hipocámpicas de 3DIV co-transfectadas con EGFP (control) versus Abl2eGFP + EGFP 16 h después de sembradas a una densidad de 3×10^4 y fijadas a los 3 DIV, inmuno marcadas para Map2 con anticuerpos diluidos 1:400 y anticuerpos para Tau1 diluidos 1:300. Los gráficos representan el porcentaje de neuronas transfectadas que están polarizadas en ambos tratamientos, longitud del axón y de las neuritas menores. Los resultados representan el promedio \pm SEM de 15-25 neuronas fueron analizadas por condición, con un N=2

La sobreexpresión de Abl2 lleva a una significativa disminución de los niveles de neuronas polarizadas. Estos resultados, sumados a los anteriores, indican que la quinasa Abl2, a diferencia de Abl1 estaría inhibiendo el proceso de polarización neuronal, mientras que Abl1 estaría promoviendo la polarización neuronal.

Regulación de la actividad de Rac1 por las quinasas Abl

Para determinar la contribución general de las quinasas Abl a la actividad de Rac, procedimos a evaluar los niveles de cofilina fosforilada en serina 3. Cofilina es un potente regulador de los filamentos de actina, su habilidad de unión y despolimerización se ve abolida por la fosforilación de LIMK1 en Ser3, la cual depende de Rac1. Fosfo-Ser3 Cofilina es un marcador que sirve como herramienta para evaluar la actividad general de

Rac. En neuronas corticales sembradas a una densidad de 1×10^7 en pocillos de 100 mm, 16 h después de sembradas, fueron tratadas con el inhibidor específico GNF2 o el activador DPH, y fueron extraídas sus proteínas a los 3 DIV, y se procedió a hacer un *Western Blot* (figura 11).

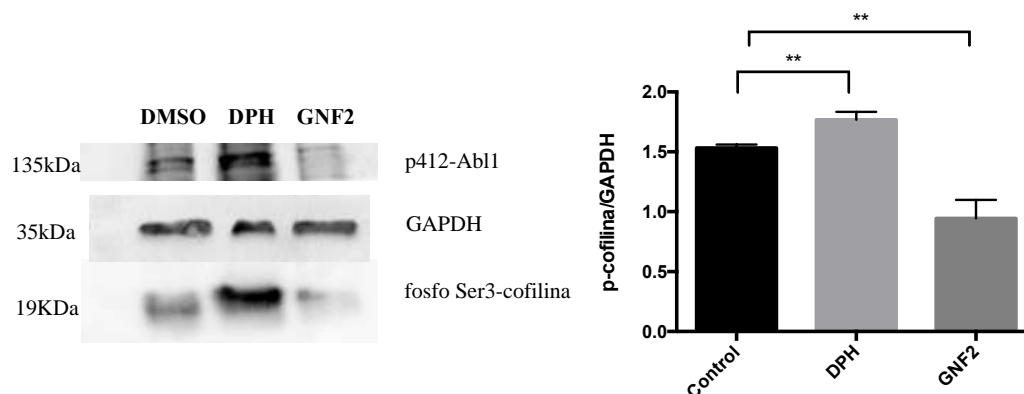


Figura 11: La actividad de las quinasas Abl regula la actividad de Cofilina: Las neuronas corticales de 1DIV sometidas a tratamiento de 48 horas con vehículo DMSO (control), inhibidor (GNF2) o activador (DPH) de las quinasas Abl, disminuye y aumenta respectivamente la fosforilación de Cofilina en Ser3 con respecto a GAPDH en neuronas corticales de 3DIV. En el gel de acrilamida al 15% se adicionaron 57 μ g de proteínas. Los resultados representan el promedio \pm SEM. El análisis estadístico consistió en el de test pareado t-test entre control y tratamiento, con un N=3 $**P < 0,01$

En neuronas corticales se evidencia que la actividad asociada a Rac1 disminuye cuando se inhibe la actividad de las quinasas Abl y aumenta cuando se activan farmacológicamente comparado al control. Como se observa donde en el tratamiento con GNF2, se observa una disminución casi a la mitad del estado de fosforilación de cofilina (figura 11).

Para evaluar la actividad directa de Rac1 se procedió a hacer un experimento de *Pull-Down* bajo estos mismos tratamientos, utilizando una matriz de sefarosa-GST asociada al motivo de PAK (sustrato de Rac) que se une a Rac1-GTP, el estado activo de Rac1. Es decir, todo el pool de Rac1 activo presente en la muestra se une a la matriz. Luego se compara mediante la cantidad de Rac1 en cada tratamiento, corriendo una electroforesis en un gel en condiciones desnaturantes y visualizando el resultado por *Western Blot* (figura 12).

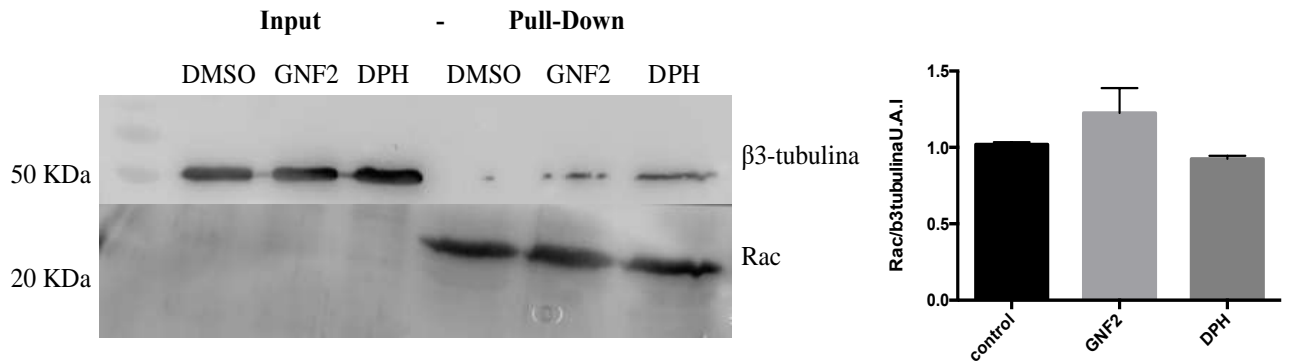


Figura 12: Inhibición o activación de las quinasas Abl promueven o inhiben la actividad de Rac1, respectivamente: *Pull-Down* (PD) para Rac1 de proteínas de fusión GST. A las neuronas corticales de 1DIV tratadas con inhibidor (GNF2) y activador (DPH) de las quinasas Abl, se les extrajo las proteínas a los 3DIV. Porciones de 800 μ g de proteínas se procesaron mediante *Pull-Down* y luego se cargaron en un gel de acrilamida al 15% para visualizar la cantidad de Rac1 presente en cada tratamiento. Se utilizaron 20 μ g de input para usar como control de carga de PD. Los anticuerpos contra β 3-tubulina se usaron a una dilución 1:5000 y los para Rac1 a una dilución 1:2000. Los resultados representan el promedio \pm SEM, con un N=2.

Se observa la tendencia de que, inhibición de las quinasas Abl genera un aumento en la actividad de Rac1, lo que apunta a que los resultados anteriores de IF, la polarización neuronal alcanzada con este tratamiento (figura 6) es coherente con la actividad de Rac1 activa que se observa en este experimento. Vemos como la aplicación de GNF2, por ejemplo, a neuronas corticales en desarrollo afecta la actividad de Rac1 y la aumenta alrededor de un 20%, lo que podría explicar que este mismo tratamiento (GNF2) produce una mayor polarización neuronal (figura 6).

La quinasa Abl1 activa a Rac1 en el axón

La fosforilación de Cofilina en Ser3 es un marcador que sirve como herramienta para evaluar la actividad general de Rac1. En neuronas hipocampales de 2 DIV, se siguió este marcador con experimentos de doble inmunofluorescencia para tener una referencia localizada de la actividad de Rac1 en neuronas WT y Abl1-KO, y así ver la contribución de la quinasa Abl1 sobre la actividad general de Rac1 de manera localizada, en los distintos compartimentos de la neurona. Evaluamos el soma, el axón, y el cono de

crecimiento (Figura 13).

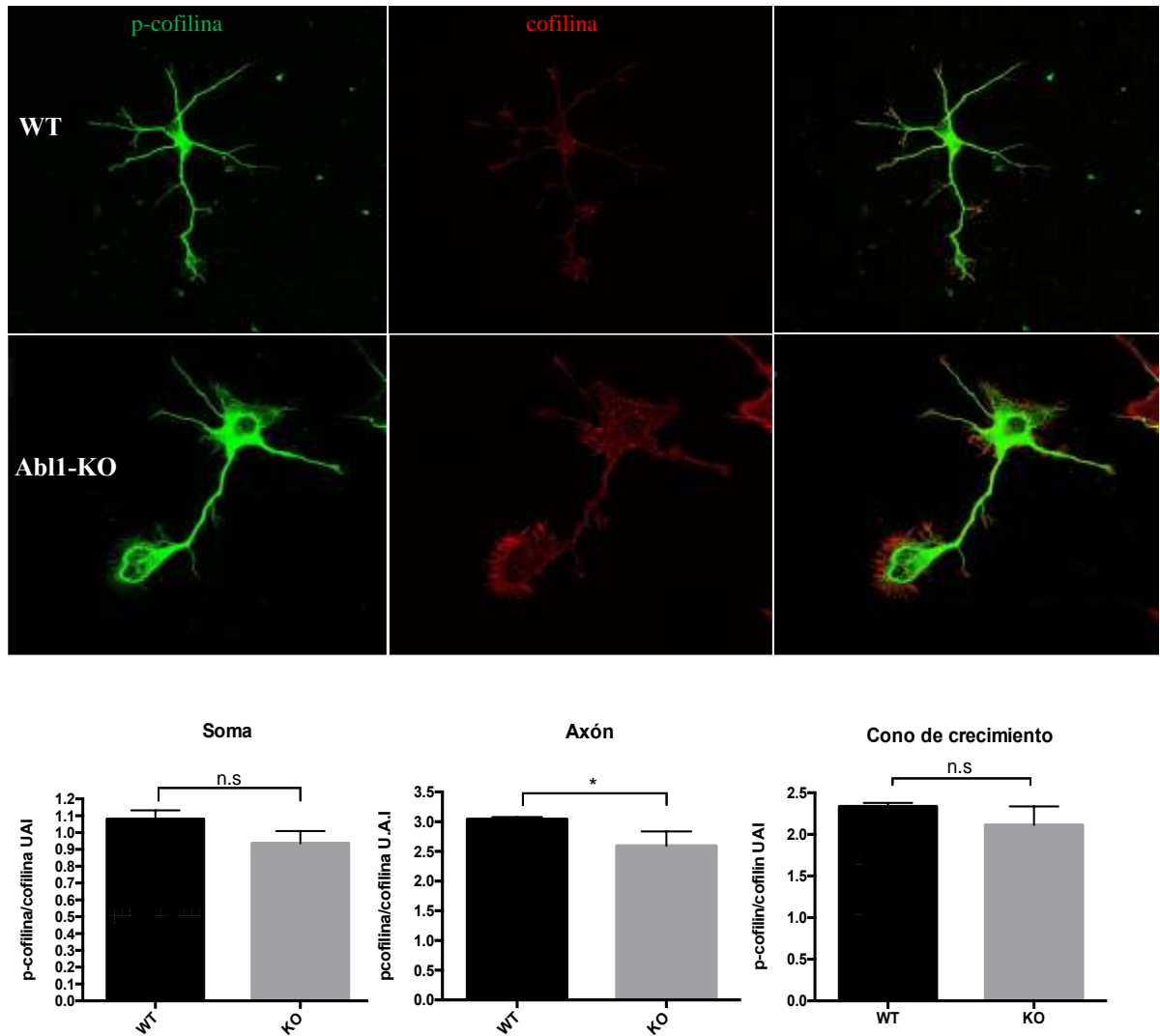


Figura 13: La actividad indirecta de Rac1 disminuye en el axón de neuronas Abl1-KO. Imágenes representativas de neuronas WT y Abl1-KO. Las neuronas hipocampales se sembraron a una densidad de 1×10^4 y se fijaron a las 2 DIV. Se realizó una doble inmunofluorescencia marcando fosfo Ser3-Cofilina 1:100 y cofilina 1:500, Microscopio Confocal Time-Lapse lentes de inmersión en aceite 100x. Los resultados representan el promedio \pm SEM de 14-16 neuronas analizadas por condición, con un N=3. Se efectuó un análisis localizado de unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia U.A.I para fosfoSer3-cofilina versus cofilina total en el soma, axón y cono de crecimiento utilizando el programa ImageJ. *P < 0,05 versus control (Student's t-test).

Se observa que en neuronas Abl1-KO la actividad indirecta de Rac1 asociada a la fosforilación de cofilina en Ser3 indica que, en los axones de estas neuronas, disminuye levemente, pero de manera significativa la actividad de Rac1, no así en sus conos de crecimiento ni en el soma, lo que sugiere que Abl1 podría contribuir a la polarización neuronal promoviendo vías de señalización que decanten en la activación de Rac1 en el axón.

Discusión

La familia de proteínas Abl, que en mamíferos incluye las quinasas no receptoras Abl1 y Abl2, ha sido descrita que participa en procesos de maduración y ramificado dendrítico (Lin y cols, 2013), migración neuronal (WD Bradleys y cols, 2009), además de jugar un papel en el proceso de guía axonal (Kannan y cols, 2017). Abl1 fue estudiada como una proteína importante para el proceso de desarrollo en neuronas corticales, al mediar la fosforilación de JIP-1 que lleva a un crecimiento axonal, observaron que este efecto de crecimiento depende de Abl1 y no de Abl2 (Dajas-Bailador F y cols, 2008), sin embargo, no se estudió si Abl1 regula la polarización neuronal como tal.

En este trabajo se observó que la ausencia de Abl1 en neuronas hipocampales lleva a una disminución en el proceso de polarización neuronal al 2 DIV siguiendo el marcador axonal Tau1 (figuras 7, 8 y 9), y en el transcurso de los 3 primeros días in vitro (figura 4) siguiendo parámetros morfológicos. Se observó además que la ausencia de Abl1 no repercute en el largo axonal promedio al 2 DIV, lo que indica que de alguna forma Abl1 estaría contribuyendo a la polarización neuronal independiente de la elongación axonal en este tiempo, sin embargo, es posible que al 3 DIV se observen diferencias significativas en cuanto a longitud axonal.

Además, se observó que durante el transcurso de la etapa 2 a la etapa 3 de desarrollo neuronal aumentaba la cantidad de Abl1 y también la actividad de la misma (figura 1) en neuronas hipocampales, lo que en conjunto sugiere que Abl1 es necesaria para la temporalidad de la polarización neuronal, y en consecuencia, para una adecuada adquisición de polaridad en neuronas hipocampales. En este mismo experimento se vió que los niveles de Abl2 no cambiaban entre etapa 2 y 3 de desarrollo neuronal, sin embargo, no tenemos la herramienta para evaluar si su actividad aumenta o disminuye durante la transición de la etapa 2 a etapa 3, es decir, durante la polarización neuronal. El uso de un anticuerpo específico para Abl2 fosforilado hubiese sido de gran ayuda para este objetivo.

También se observó que la localización de las quinasas Abl en neuronas hipocampales poseían señales que están presentes con una distribución global similar, pero ésta no es igual. La señal de fosfo-Abl1 presentó mayor intensidad en los conos de crecimiento del axón y de los procesos menores y en las protrusiones de tipo filopodia a lo largo de las

neuritas y también en el axón. Mientras que Abl2 no estaba presente en las prolongaciones tipo filopodia que rodean los conos de crecimiento, y su señal de Abl2 fosforilada es menos intensa, con presencia distinguible en el cuerpo neuronal y también en las neuritas (figuras 2 y 3). Esto sugiere que las quinasas Abl podrían estar regulando vías de señalización localizadas, Abl1 en el cono de crecimiento y o a lo largo de las neuritas y en las prolongaciones tipo filopodia, asociadas al citoesqueleto de actina, mientras que Abl2 estaría regulando vías de señalización generales del citoesqueleto de actina y microtúbulos, en las neuritas cercanas al soma.

Cabe destacar que aquí se ha reportado por primera vez la presencia de Abl2 en neuronas en estadios tempranos de desarrollo neuronal, asunto que no había sido reportado anteriormente, en los cuales sólo se ha descrito su participación y presencia en neuronas maduras, con sinapsis funcionales (Skafianos y cols, 2013). La observación de que los conos de crecimiento de las neuronas nulas para Abl1, poseen una mayor área, y sean más oblicuos (figura 5), es concordante con la localización observada en esta estructura (figura 2) y los estudios en *Drosophila* que señalan a Abl como un señalizador clave como guía de crecimiento axonal (Gallo y cols, 1999). También indica a Abl como regulador de la masa de actina que entra en el axón, regulando la distribución y organización de la actina del cono de crecimiento procesos que se acoplan a la velocidad del cono de crecimiento (Clarke y cols, 2020). Los experimentos actuales apuntan a que la ausencia de Abl1 genera un desbalance en la estructura y función del cono de crecimiento durante la polarización neuronal, produciendo una reorganización en la estructura, incluso posiblemente de los microtúbulos que deben ingresar a esta zona (figura 5). Esto es correlativo con su fuerte presencia en los conos de crecimiento y en las protrusiones tipo filopodia, dónde podría estar regulando fenómenos importantes como adhesión y procesamiento de señales extracelulares (Bradley y cols, 2009). En este sentido sería interesante realizar experimentos in vivo de neuronas con su axón en crecimiento para evaluar su velocidad o sus pausas mediante microscopía Time Lapse y así evaluar mejor la dinámica.

Sorprendentemente, al modular la actividad de Abl2 en neuronas nulas de Abl1, se encontró que cuando se inhibe su actividad, el porcentaje de neuronas polarizadas aumenta, mientras que cuando se activa Abl2, el porcentaje de neuronas polarizadas disminuye, lo que sugiere que Abl2 estaría inhibiendo la polarización neuronal, al

contrario de Abl1, cuya ausencia disminuye la polarización neuronal. Para confirmar esta observación, se moduló genéticamente la expresión de Abl2 en neuronas hipocampales. Al silenciarla con experimentos de transferencia genética los niveles de neuronas polarizadas aumentan y cuando se sobre-expresó, por el contrario, el porcentaje de polarización disminuyó confirmando que Abl2 inhibe la polarización neuronal. Estas dos estrategias, farmacológica y genética combinada, o genético demuestra que los parálogos de la familia de quinasas Abl en mamíferos, durante la polarización neuronal estarían desempeñando funciones opuestas, o cuyo efecto al evaluar el porcentaje de polarización neuronal es opuesto. Las vías de señalización intracelular descritas hasta la fecha que inhiben el proceso de polarización neuronal son escasas, y la participación de Abl2 significaría un nuevo aporte para entender la regulación de la polarización neuronal.

Lo interesante, en este sentido, es que la inhibición de ambas quinasas en neuronas WT promovió la polarización neuronal, mientras que su activación la disminuyó, lo que indica que este efecto general se debe en mayor parte a la modulación de Abl2 que la de Abl1. Es decir, la modulación de Abl2 en este proceso sería más significativo o crítico que la modulación de Abl1. Sin embargo, el efecto de las drogas en la actividad de Abl1 y Abl2 puede ser desigual y eso genera una mayor heterogeneidad. Sería ideal poder realizar experimentos con el modelo Abl2-KO y así comparar en paralelo los efectos que producen estas quinasas en polarización neuronal, dinámica de actina y cono de crecimiento, entre otras.

En esa línea, este trabajo podría encender un interés relacionado a Abl2 para aquellos laboratorios interesados en entender aquellos elementos que regulan la polarización neuronal y la dendritogénesis, pues Abl2 podría actuar como un elemento repulsivo, donde puede jugar un rol en el desarrollo de circuitos y en la regulación del crecimiento de neuritas menores, futuras dendritas.

Por otro lado, los resultados con respecto a la actividad indirecta de Rac en neuronas nulas de Abl1, apunta a que la actividad de Rac en el axón disminuye, cuando Abl1 está ausente (figura 13). Lo que es coherente con que Abl1 promueve la polarización neuronal (Tahirovic y cols, 2010) y con los estudios de Abl en *Drosophila* (Kannan y cols, 2017). Sin embargo, sería erróneo señalar que solo Rac es responsable del fenotipo nulo de Abl1, porque su ausencia genera un cambio en el programa genético en neuronas hipocampales

(resultados no publicados) que involucra cambios de expresión en los niveles de varios elementos reguladores del citoesqueleto. Por lo tanto, el análisis de las neuronas Abl1-KO debe estar sujeta no solo a cambios en la señalización sino también a cambios a nivel de expresión génica.

La activación o inhibición de las quinasas Abl1 y Abl2 con tratamientos farmacológicos en neuronas corticales generó un aumento o una disminución, respectivamente, del estado de fosforilación de Cofilina en Ser3 (figura 11), que podría estar relacionado a la modulación de la actividad de Rac1. Estos resultados están incompletos, pues no incluyen la cofilina total presente en los tratamientos, es decir no son resultados concluyentes, no se correlacionan con el fenotipo de polarización alcanzado con estos mismos tratamientos en neuronas hipocámpales (figuras 6 y 7).

Sin embargo, los fenotipos observados de polarización neuronal son coherentes con el efecto de Abl1 en la actividad indirecta de Rac detectado por inmunofluorescencia en el axón (figura 13), en neuronas nulas de Abl1, donde disminuyó la actividad de Rac en el eje axonal y con el experimento de Pull-Down donde hubo una tendencia al aumento de la actividad de Rac1 en neuronas tratadas con GNF2 y una disminución en neuronas tratadas con DPH (figura 12), que se correlaciona con el efecto fenotípico observado en el porcentaje de neuronas polarizadas con estos mismos tratamientos a neuronas WT.

En suma, no se pudo comprobar cómo Abl1 regula Rac1 durante la polarización neuronal. Además, también queda por explorar la contribución de Abl2 a la actividad de Rac. Se espera que estas quinasas tengan un efecto diferencial entre ellas con respecto a la regulación de las GTPasas, pues como se ha evaluado anteriormente, poseen un efecto opuesto en la polarización neuronal. Es sugerente observar que Abl2 regula el largo de las neuritas menores (figura 9), fenómeno asociado al tono inhibitorio ejercido por RhoA (Takano y cols, 2017). Así, mismo es probable que ejerza modulación indirecta de la actividad de Rac, pues se ha visto que Abl2 en neuronas disminuye la actividad de RhoA mediante la fosforilación y activación de p190RhoGAP (Sfakianos y col, 2007). Un desbalance en la actividad de Rho, puede llevar a un efecto opuesto y recíproco en la actividad de Rac (Sander y cols, 1999). Más aún, la complejidad de los factores intercambiadores de guanina (GEFs) y las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) que regulan el estado de las distintas RhoGTPasas, como RhoA hace más difícil estudiar y

dilucidar el posible rol de las quinasas Abl, en contextos celulares de morfogénesis (Fusco y cols, 2016).

Sería óptimo utilizar herramientas de sensores moleculares para manipular y monitorear la señalización molecular asociada a las quinasas Abl, como FRET's específicos para RhoA, Rac1 e incluso Cdc42 en neuronas en estado 2 y 3 de desarrollo neuronal. De esta manera se podría evaluar el efecto localizado de estas quinasas en el estado de actividad de las GTPasas pequeñas en los distintos compartimentos neuronales, y así vincularlas, en términos de causa y efecto, a su rol en la polarización neuronal. Además de técnicas de búsqueda de sustratos fosforilables para quinasas con técnicas como KISS o KIOSS que permitan identificar nuevos sustratos para Abl1 y Abl2 durante la polarización neuronal (Funahashi y cols, 2020).

El hecho de que en este trabajo se haya concluido que dos parálogos con alta similitud en código y estructura posean funciones divergentes, es interesante para la biología, pues lo común que se describe es que posean funciones similares. Pero no es nuevo, otros trabajos en proteínas parálogas del SNC, han sido descritas de realizar funciones opuestas anteriormente (Favaro y cols, 2018), por otro lado, dado los motivos de unión diferenciales que poseen las quinasas Abl de unión directa al citoesqueleto, es de esperar que la regulación del citoesqueleto sea distinta, y su efecto en los procesos de morfogénesis que se ven involucrados generen funciones diferenciales. Por último, el hecho de que Abl1 regule GEFs de Rac1 y sustratos de Rac1 como Wave2 y Wave3, mientras que Abl2, regule GAPs de RhoA, y sustratos de RhoA como Myosina IIb, es una de los antecedentes más fuertes que nos llevó a pensar en roles opuestos para la polarización neuronal, pues son reguladores maestros del citoesqueleto de actina durante la polarización y migración neuronal (Bradley y cols, 2009). Esos sustratos podrían evaluarse en paralelo mediante inmunofluorescencia durante las etapas claves de polarización neuronal en neuronas Abl1-KO o Abl2-KO vs neuronas WT.

Finalmente, se puede señalar que estos resultados pueden afinar la investigación que comúnmente se ha realizado durante los últimos años con respecto a las quinasas Abl, y someter los tratamientos con inhibidores a un escrutinio más exigente, teniendo en cuenta el efecto que ocasiona en proteínas distintas y particulares, especialmente cuando actúan a nivel de experimentos in vivo e in vitro. Es de esperar que, así como tienen funciones

diferenciales en la polarización neuronal, es probable que también lo tengan en procesos morfológicos como de guía axonal, migración neuronal, arborización dendrítica, maduración sináptica, entre otros.

Conclusiones

- En este trabajo la hipótesis “Abl-1 promueve la polarización neuronal a través de la activación de Rac1; mientras que Abl-2 inhibe la adquisición de polaridad”, se cumple en su eje principal: Abl1 promueve la polarización neuronal mientras que Abl2 la inhibe, sin embargo, no se puede comprobar en base a los resultados si es a través de la activación de Rac1 que Abl1 promueve la polarización neuronal, pero si podría estar implicado o afectar su actividad.
- **Abl1 promueve la polarización neuronal:** neuronas Abl1-KO presentan una disminución en el porcentaje de neuronas polarizadas a los 1, 2 y 3 DIV (comprobado morfológicamente) y a los 2 DIV reconfirmado con estudios de inmunobioquímica. Además, neuronas Abl1-KO presentan defectos en el fenotipo del cono de crecimiento.
- **Abl2 inhibe la polarización neuronal:** neuronas transfectadas con shAbl2 o Abl2-eGFP presentan un aumento o una disminución respectivamente del porcentaje de neuronas polarizadas. Asimismo, neuronas Abl1-KO tratadas con inhibidor o activador de Abl2 genera un aumento o una disminución respectivamente, del porcentaje de neuronas polarizadas.
- **Abl1 y Abl2 poseen niveles y localización diferenciales temprano en el desarrollo neuronal:** las quinasas Abl presentan una distribución global similar, pero con diferencias específicas localmente.
- **Abl1 promueve la actividad de Rac1 en el eje axonal:** siguiendo Cofilina fosforilada en Ser3, se observa una disminución en la relación fosfo-cofilina/cofilina total en los axones de neuronas hipocampales. Las quinasas Abl podrían regular la actividad de Rac1; mediante ensayos de *Pull-Down*, existe una tendencia a aumentar o disminuir la actividad de Rac1 cuando se inhibe o activa, farmacológicamente a las quinasas Abl.
- **Las quinasas Abl poseen efectos opuestos en la polarización neuronal.**

Referencias

- Adler, C. E., Fetter, R. D., & Bargmann, C. I. (2006). UNC-6/Netrin induces neuronal asymmetry and defines the site of axon formation. *Nature neuroscience*, 9(4), 511-518.
- Arimura, N., & Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(3), 194-205.
- Banker, G. A., & Cowan, W. M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain research*, 126(3), 397-425.
- Barnes, A. P., & Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annual Review of neuroscience*, 32, 347-281.
- Bernstein, B. W., & Bamburg, J. R. (2010). ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends in cell biology*, 20(4), 187-195.
- Berry, M., & Rogers, A. W. (1965). The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *Journal of Anatomy*, 99(Pt 4), 691-709.
- Bradke, F., & Dotti, C. G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science*, 283(5409), 1931-1934.
- Bradley, W. D., & Koleske, A. J. (2009). Regulation of cell migration and morphogenesis by Abl-family kinases: emerging mechanisms and physiological contexts. *J. Cell Sci.*, 122(19), 3441–3454.
- Cáceres, A., Ye, B., & Dotti, C. G. (2012). Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment. *Current opinion in cell biology*, 24(4), 547-553.
- Calderón de Anda, F., Gärtner, A., Tsai, L. H., & Dotti, C. G. (2008). Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *Journal of Cell Science*, 121(2), 178-185.
- Chen, X., & Macara, I. G. (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nature cell biology*, 7(3), 262-269.
- Cheng, P. L., Lu, H., Shelly, M., Gao, H., & Poo, M. M. (2011). Phosphorylation of E3 ligase Smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. *Neuron*, 69(2), 231-243.
- Chuang, J. Z., Yeh, T. Y., Bollati, F., Conde, C., Canavosio, F., Cáceres, A., & Sung, C. H. (2005). The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Developmental cell*, 9(1), 75-86.
- Clarke, A., McQuenn, P.G., Fang, H.Y., Kannan, R., McCreedy, E., Wincovitch, S., Giniger, E. (2020) Abl signaling directs growth of a pioneer axon in *Drosophila* by shaping the intrinsic fluctuations of actin. *Molecular Biology of the Cell*, 31(6), 397-510

Colicelli, J. (2010). ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci. Signal.*,3(139).

Conde, C., Arias, C., Robin, M., Li, A., Saito, M., Chuang, J. Z., ... & Cáceres, A. (2010). Evidence for the involvement of Lfc and Tctex-1 in axon formation. *Journal of Neuroscience*, 30(19), 6793-6800.

Craig, E. M., Van Goor, D., Forscher, P., & Mogilner, A. (2012). Membrane tension, myosin force, and actin turnover maintain actin treadmill in the nerve growth cone. *Biophysical journal*, 102(7), 1503-1513.

Da Silva, J. S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., & Dotti, C. G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuriteogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *The Journal of cell biology*, 162(7), 1267-1279.

Dajas-Bailador, F., Jones, E. V., & Whitmarsh, A. J. (2008). The JIP1 scaffold protein regulates axonal development in cortical neurons. *Current Biology*, 18(3), 221-226.

Deglinerti, A., Liu, Y., Colak, D., Hengst, U., Xu, G., & Jaffrey, S. R. (2015). Coupled local translation and degradation regulate growth cone collapse. *Nature communications*, 6, 6888.

Dent, E. W., Barnes, A. M., Tang, F., & Kalil, K. (2004). Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. *Journal of Neuroscience*, 24(12), 3002-3012.

Dotti, C. G., Sullivan, C. A., & Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *Journal of Neuroscience*, 8(4), 1454-1468.

Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell*, 106(4), 489-498.

Eva E. Sander, Jean P. ten Klooster, Sanne van Delft, Rob A. van der Kammen, John G. Collard; Rac Downregulates Rho Activity: Reciprocal Balance between Both Gtpases Determines Cellular Morphology and Migratory Behavior. *J Cell Biol* 29 November 1999; 147 (5): 1009–1022.

Funahashi, Y., Watanabe, T., & Kaibuchi, K. (2020). Advances in defining signaling networks for the establishment of neuronal polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 63, 76–87. doi: 10.1016/j.ceb.2019.12.009

Fusco, L., Lefort, R., Smith, K., Benmansour, F., Gonzalez, G., Barillari, C., ... & Pertz, O. (2016). Computer vision profiling of neurite outgrowth dynamics reveals spatiotemporal modularity of Rho GTPase signaling. *J Cell Biol*, 212(1), 91-111.

Gerboth, S., Frittoli, E., Palamidessi, A., Baltanas, F. C., Salek, M., Rappsilber, J., ... & Kreutmair, S. (2017). Phosphorylation of SOS1 on tyrosine 1196 promotes its RAC GEF activity and contributes to BCR- ABL leukemogenesis. *Leukemia*, 32(3), 820-827.

Gonzalez-Billault, C., Muñoz-Llancao, P., Henriquez, D. R., Wojnacki, J., Conde, C., & Cáceres, A. (2012). The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton*, 69(7), 464-485.

Howell, B., Larsson, N., Gullberg, M., & Cassimeris, L. (1999). Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Molecular biology of the cell*, 10(1), 105-118.

Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 72(1), 609-642.

Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature protocols*, 1(5), 2406-2415.

Kannan, R., Song, J. K., Karpova, T., Clarke, A., Shivalkar, M., Wang, B., ... & Giniger, E. (2017). The Abl pathway bifurcates to balance Enabled and Rac signaling in axon patterning in *Drosophila*. *Development*, 144(3), 487-498.

Killeen, M. T., & Sybingco, S. S. (2008). Netrin, Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Developmental biology*, 323(2), 143-151.

Kim, W. Y., Zhou, F. Q., Zhou, J., Yokota, Y., Wang, Y. M., Yoshimura, T., ... & Snider, W. D. (2006). Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron*, 52(6), 981-996.

Kole, M. H., & Stuart, G. J. (2012). Signal processing in the axon initial segment. *Neuron*, 73(2), 235-247.

Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S., & Lim, L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Molecular and cellular biology*, 17(3), 1201-1211.

Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K., & Cáceres, A. (2001). Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *Journal of Neuroscience*, 21(7), 2361-2372.

Lowery, L. A., & Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(5), 332-343.

Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(6), 446.

La trasladé estaba mal colocada

- Ménager, C., Arimura, N., Fukata, Y., & Kaibuchi, K. (2004). PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *Journal of neurochemistry*, 89(1), 109-118.
- Moresco, E. M. Y. (2006). Abl family kinases in mammalian development. In *Abl Family Kinases in Development and Disease* (pp. 93-104). Springer, New York, NY.
- Nakamuta, S., Funahashi, Y., Namba, T., Arimura, N., Picciotto, M. R., Tokumitsu, H., ... & Kaibuchi, K. (2011). Local Application of Neurotrophins Specifies Axons Through Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate, Calcium, and Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinases. *Sci. Signal.*, 4(199), 76-84.
- Naoki, H., Nakamuta, S., Kaibuchi, K., & Ishii, S. (2011). Flexible search for single-axon morphology during neuronal spontaneous polarization. *PLoS One*, 6(4), e19034.
- Ng, J., & Luo, L. (2004). Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron*, 44(5), 779-793.
- Nishimura, T., Kato, K., Yamaguchi, T., Fukata, Y., Ohno, S., & Kaibuchi, K. (2004). Role of the PAR-3–KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nature cell biology*, 6(4), 328-334.
- Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y. I., Ohno, S., ... & Kaibuchi, K. (2005). PAR-6–PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nature cell biology*, 7(3), 270-277.
- Nobes, C. D., & Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1), 53-62.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H. R., Zhang, Y., & Wrana, J. L. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFβ receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*, 307(5715), 1603- 1609.
- Peacock, J. G., Miller, A. L., Bradley, W. D., Rodriguez, O. C., Webb, D. J., & Koleske, A. J. (2007). The Abl-related gene tyrosine kinase acts through p190RhoGAP to inhibit actomyosin contractility and regulate focal adhesion dynamics upon adhesion to fibronectin. *Molecular biology of the cell*, 18(10), 3860-3872.
- Pertz, O. C., Wang, Y., Yang, F., Wang, W., Gay, L. J., Gristenko, M. A., ... & Camp, D. G. (2008). Spatial mapping of the neurite and soma proteomes reveals a functional Cdc42/Rac regulatory network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 1931-1936.
- Pertz, O. (2010). Spatio-temporal Rho GTPase signaling—where are we now?. *J Cell Sci*, 123(11), 1841- 1850.

Plant, P. J., Fawcett, J. P., Lin, D. C., Holdorf, A. D., Binns, K., Kulkarni, S., & Pawson, T. (2003). A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nature cell biology*, 5(4), 301-308.

Polleux, F., & Snider, W. (2010). Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(4), a001925.

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, 145(1), 61-83.

Ramón y Cajal (1913-1914) *Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del Sistema Nervioso*. Madrid, Imp. Nicolás y Moya.

Ramón y Cajal (1954) *Neuron Theory or Reticular Theory? Objective Evidence Of The Anatomical Unity Of Nerve Cells*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Ramón y Cajal.

Sanchez, M., Gastaldi, L., Remedi, M., Cáceres, A., & Landa, C. (2008). Rotenone-induced toxicity is mediated by Rho-GTPases in hippocampal neurons. *Toxicological sciences*, 104(2), 352-361.

Schwamborn, J. C., & Püschel, A. W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nature neuroscience*, 7(9), 923-929.

Shi, S. H., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*, 112(1), 63-75.

Shimizu, A., Mammoto, A., Italiano, J. E., Pravda, E., Dudley, A. C., Ingber, D. E., & Klagsbrun, M. (2008). ABL2/ARG tyrosine kinase mediates SEMA3F-induced RhoA inactivation and cytoskeleton collapse in human glioma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 27230-27238.

Sfakianos, M. K., Eisman, A., Gourley, S. L., Bradley, W. D., Scheetz, A. J., Settleman, J., ... & Koleske, A. J. (2007). Inhibition of Rho via Arg and p190RhoGAP in the postnatal mouse hippocampus regulates dendritic spine maturation, synapse and dendrite stability, and behavior. *Journal of Neuroscience*, 27(41), 10982-10992.

Sini, P., Cannas, A., Koleske, A. J., Di Fiore, P. P., & Scita, G. (2004). Abl-dependent tyrosine phosphorylation of Sos-1 mediates growth-factor-induced Rac activation. *Nature Cell Biology*, 6(3), 268-274.

Tahirovic, S., Hellal, F., Neukirchen, D., Hindges, R., Garvalov, B. K., Flynn, K. C., ... & Bradke, F. (2010). Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. *Journal of Neuroscience*, 30(20), 6930- 6943.

- Takano, T., Wu, M., Nakamuta, S., Naoki, H., Ishizawa, N., Namba, T., ... & Amano, M. (2017). Discovery of long-range inhibitory signaling to ensure single axon formation. *Nature Communications*, 8(1), 33-44.
- Takenawa, T., & Suetsugu, S. (2007). The WASP–WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(1), 37-48.
- Von Stein, W., Ramrath, A., Grimm, A., Müller-Borg, M., & Wodarz, A. (2005). Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development*, 132(7), 1675-1686.
- Warner, S. J., Yashiro, H., & Longmore, G. D. (2010). The Cdc42/Par6/aPKC polarity complex regulates apoptosis-induced compensatory proliferation in epithelia. *Current Biology*, 20(8), 677-686.
- Watabe-Uchida, M., Govek, E. E., & Van Aelst, L. (2006). Regulators of Rho GTPases in neuronal development. *Journal of Neuroscience*, 26(42), 10633-10635.
- Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S. I., Nakatani, A., Ikeuchi, T., & Hatanaka, H. (1997). Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30334-30339.
- Yoshimura, T., Arimura, N., Kawano, Y., Kawabata, S., Wang, S., & Kaibuchi, K. (2006). Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 340(1), 62-68.
- Zukerberg, L. R., Patrick, G. N., Nikolic, M., Humbert, S., Wu, C. L., Lanier, L. M. & Tsai, L. H. (2000). Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron*, 26(3), 633-646.