

UCH-FC  
DOC-BMGN  
M777  
C-1

ix. grado



**ROL DE LA PROTEÍNA MAP1B EN LA REGULACIÓN  
DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN POLARIDAD  
NEURONAL Y SINAPSIS**



**Tesis**

**Entregada A La**

**Universidad De Chile**

**En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos**

**Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular,  
Celular Y Neurociencias**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Carolina Aida Montenegro Venegas**

**Mayo, 2011**

**Director de Tesis Dr:**

**Christian González**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

CAROLINA AIDA MONTENEGRO VENEGAS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 14 de Abril del 2011.

Director de Tesis:

Dr. Christian González

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Christian González", written over a dotted line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Magdalena Sanhueza

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Magdalena Sanhueza", written over a dotted line.

Dra. Úrsula Wyneken

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Úrsula Wyneken", written over a dotted line.

Dr. Juan Fernández

A large, stylized handwritten signature in blue ink, appearing to be "Juan Fernández", written over a dotted line.

*A mis queridos abuelos, hermanos y padres*



## AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quisiera darle las gracias al Dr. Christian González por haberme recibido en su laboratorio y así llevar a cabo mi proyecto de tesis. Además quisiera darle mis agradecimientos al Dr. Jesús Ávila y a todo su grupo por haberme acogido por un año y medio en su laboratorio en España y de esta manera poder realizar la mayor parte de mi trabajo de tesis. Agradezco mucho a mi comisión de tesis formada por la Dra. Magdalena Sanhueza; Dra. Úrsula Wyneken y Dr. Juan Fernández por sus consejos y ayuda. Junto con esto, le agradezco a mis compañeros de laboratorio y de doctorado: Cristina, Daniel B, Erick, Daniel H, David, Paula, Constanza y Ricardo por su apoyo y ánimo. Muchas gracias a mis hermanos Viviana, Romanette, Adolfo y Iván, a mis padres y abuelos por su constante preocupación y cariño. A mis queridas amigas Carolina A, Valeria y en especial a Lisette, por su apoyo y ánimo incondicional.

Muchas gracias a todos, la verdad es que sin su ayuda no podría haber llevado a cabo esta tesis.



## RESUMEN

El citoesqueleto de microtúbulos y de actina tiene un rol activo durante las distintas fases de la polarización neuronal y desarrollo del sistema nervioso. Los microtúbulos y su estabilización, mediada por la acción de proteínas estabilizadoras de microtúbulos "MAPs", determinan la formación del axón, y mantienen la identidad axonal durante el desarrollo del sistema nervioso. Por otro lado, miembros de la familia de las Rho-GTPasas pequeñas como RhoA, Rac1 y cdc42 son muy importantes en la regulación de la conversación cruzada entre actina y microtúbulos durante la especificación, guía y elongación del axón. Posteriormente, en estadios adultos, estas mismas moléculas regulan también la dinámica de las espinas dendríticas. Estas estructuras son protrusiones ricas en actina polimerizada que se extienden desde el tronco de la dendrita y son la unidad básica funcional de las sinapsis excitatorias del sistema nervioso central (SNC). Hasta hace pocos años la presencia de microtúbulos en las espinas dendríticas era materia de debate. Recientemente se demostró que en neuronas adultas los microtúbulos dinámicos pueden estar presentes en forma transitoria en las protrusiones dendríticas y podrían ser importantes para la formación y plasticidad de estas estructuras. Adicionalmente, se determinó la presencia de proteínas que se unen a microtúbulos en las espinas dendríticas, junto con su participación en la morfogénesis de espinas.

Los animales deficientes en la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B) muestran una inhibición en el crecimiento axonal y una disminución de la actividad de Rac1, la que impactaría en la formación y mantención del axón de neuronas de hipocampo en cultivo. La MAP1B tiene su máxima expresión durante los primeros estadios del desarrollo, y disminuye gradualmente cuando se llega a la etapa adulta. Sin embargo, la expresión de MAP1B en el adulto permanece elevada en regiones del cerebro que poseen un alto nivel de actividad y plasticidad sináptica, por ejemplo, el hipocampo. Se sabe que la MAP1B además de interaccionar con microtúbulos para estabilizarlos, puede interaccionar con los filamentos de



actina. Por lo tanto, esta tesis tuvo como objetivo general analizar los mecanismos moleculares a través de los cuales la proteína MAP1B regula el citoesqueleto de actina, contribuyendo de esta forma a regular los procesos de elongación axonal durante el desarrollo del sistema nervioso y de transmisión sináptica en estadios adultos.

Nuestros resultados demuestran que las neuronas de 1 día en cultivo, provenientes de los animales MAP1B (-/-) poseen una disminución en la actividad de las Rho-GTPasas Rac1 y cdc42 y un aumento en la actividad de RhoA. Determinamos que la MAP1B interacciona con Tiam1, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) específico para Rac1. Las neuronas deficientes en MAP1B transfectadas con las formas constitutivamente activas de Rac1, cdc42 ó Tiam1, fueron capaces de rescatar el fenotipo de elongación del axón.

En neuronas maduras de 21 DIV la ausencia de MAP1B causó una disminución en el número de espinas dendríticas maduras, un aumento en el porcentaje de protrusiones tipo filopodios y una reducción en la amplitud de las corrientes excitatorias post-sinápticas en miniatura (mEPSC) mediadas por los receptores AMPA. Además, las densidades post-sinápticas extraídas de animales adultos heterocigotos para MAP1B (+/-) mostraron una disminución en la actividad de Rac1 y un aumento de la actividad de RhoA. Por último, determinamos la presencia de MAP1B en los compartimientos pre-sinápticos y describimos una nueva interacción de ésta con la proteína Snapin. Adicionalmente, observamos que las neuronas deficientes en MAP1B de 16 DIV poseen una disminución en la tasa de liberación de vesículas sinápticas. Las presentes observaciones plantean la posibilidad que en neuronas en desarrollo, los microtúbulos regulen la actividad de las Rho-GTPasas a través de la proteína MAP1B. Por otra parte, el requerimiento de MAP1B para la efectiva unión de Tiam1 a los microtúbulos, define una nueva y crucial función para esta MAP durante la polarización neuronal. En estadios adultos MAP1B tendría un nuevo y crucial papel en la formación y maduración de las espinas dendríticas posiblemente a través de la regulación del citoesqueleto de actina. Esto eventualmente podría contribuir a la regulación de la actividad y plasticidad sináptica en el cerebro adulto. Además, MAP1B se encuentra en el

compartimiento pre-sináptico y su ausencia causa una disminución en la tasa de liberación de vesículas sinápticas, lo cual sugiere que podría participar directa o indirectamente en la regulación de la maquinaria que media la liberación de las vesículas sinápticas.

La relevancia general de este trabajo de tesis fue que determinamos que en estadios adultos MAP1B participa en la regulación de la función sináptica.

Las proyecciones a futuro son: 1) determinar si en neuronas jóvenes MAP1B forma parte del complejo de polaridad Par3-Par6-aPKC durante la elongación del axón. 2) Verificar si el fenotipo que observamos en las neuronas MAP1B (-/-) se debe a un efecto pre o post-sináptico.





## ABSTRACT

Microtubules and actin filaments have an active role during different stages of neuronal polarization and development of the nervous system. Microtubules, and their stabilization, mediated by the action of microtubule stabilizing proteins ("MAPs"), determine axon formation and maintain axonal identity in the developing nervous system. On the other hand, members of the family of small Rho-GTPases like: RhoA, Rac1 and cdc42, are very important in the regulation of the cross-talk between actin and microtubules during axon specification, guidance and elongation. In adult stages, these molecules also regulate the dynamics of dendritic spines. These structures are polymerized actin-rich protrusions that extend from dendritic shafts and are the basic functional unit of Central Nervous System (CNS) excitatory synapses. Until short ago, the presence of microtubules in dendritic spines was a matter of debate. Recently, it has been shown that dynamic microtubules in adult neurons can transiently be present in the dendritic spines and they could be important for the formation and plasticity of these structures. Additionally, the presence of microtubule-binding proteins in dendritic spines and their participation in spine morphogenesis have been demonstrated. Animals deficient in the microtubule associated protein MAP1B (-/-) show inhibition of axonal growth and a decrease in Rac1 activity, which might have an impact on axonal formation and maintenance of hippocampal neurons in culture. Expression of MAP1B is high during early stages of neuronal development and is down-regulated in the adult brain. However, MAP1B expression remains elevated in brain regions showing high levels of synaptic activity and plasticity, for example the hippocampus. It is known that MAP1B interacts with microtubules to stabilize them, but it can also interact with actin filaments. Therefore, the general objective of this thesis was to analyze the molecular mechanism through which MAP1B regulates the actin cytoskeleton, thus helping to regulate axonal elongation, during nervous system development and transmission, in adult stages. Our results show that MAP1B (-/-) neurons from 1 DIV have a decreased activity of Rho-GTPases Rac1 and cdc42 and an increase in RhoA activity. We found that MAP1B interacts



with Tiam1, a guanosine nucleotide exchange factor for Rac1. The expressions of a constitutively active form of Rac1, cdc42 or Tiam1, rescue the defect in axonal growth of MAP1B-deficient neurons. In mature neurons of 21 DIV, MAP1B deficiency causes a decrease in the number of mature dendritic spines, an increase in the percentage of filopodia-like protrusions and a reduction in the amplitude of miniature excitatory post-synaptic currents (mEPSC) mediated by AMPA receptors. Also, the postsynaptic densities from the heterozygous MAP1B (+/-) adult animals show a significant decrease in Rac1 activity and an increase in RhoA activity. Finally, we determined the presence of MAP1B in pre-synaptic compartments and described a new interaction of MAP1B with the Snapin protein. Additionally, we noted that MAP1B-deficient neurons of 16 DIV have a decreased rate of synaptic vesicles release. The present observations raise the possibility that in developing neurons, microtubules regulate the activity of Rho-GTPases through MAP1B. The requirement of MAP1B for effective binding of TIAM1 to microtubules appears to define a new and crucial function for this MAP during neuronal polarization. In adult stages, MAP1B might have a crucial new role in the formation and maturation of dendritic spines probably through regulation of the actin cytoskeleton. This could eventually contribute to the regulation of the synaptic activity and plasticity in the adult brain. Since MAP1B is in the presynaptic compartment and its absence causes a decrease in the rate of release of synaptic vesicles, we suggest that MAP1B could be directly or indirectly involved in the regulation of the machinery that mediates the release of synaptic vesicles.

The overall relevance of this thesis was that we determined that, in addition to its function in axon formation and guidance, MAP1B is involved in the regulation of synaptic function at adult stages.

The future projections of this work are: 1) To determine if, in young neurons, MAP1B is part of the polarity complex Par3-Par6-aPKC involved in axon elongation. 2) To check whether

the phenotype that we observed in MAPIB (-/-) neurons is due to a pre or post-synaptic effect.



## INTRODUCCIÓN

El citoesqueleto es una red tridimensional de filamentos que contribuye a la integridad de la célula eucariota, y se extiende por todo el citoplasma. Entre sus funciones, es responsable de la morfología de la célula, permite el movimiento y transporte intracelular (por medio de proteínas motoras) y participa en los procesos de mitosis, diferenciación celular y migración, transporte de vesículas, endocitosis, exocitosis y polaridad celular.

Entre las células polarizadas más prominentes y mejor caracterizadas están las neuronas. Las neuronas normalmente poseen 2 tipos de extensiones citoplasmáticas, morfológica y funcionalmente distintas; un único, largo y delgado axón y varias dendritas, que son prolongaciones cortas y ramificadas. Durante el proceso de señalización neuronal, las dendritas reciben señales que son procesadas e integradas en el cuerpo de la célula. La señal eléctrica se propaga a lo largo del axón hacia las terminales presinápticas, donde los axones forman sinapsis con las dendritas de otras neuronas. En el inicio del desarrollo neuronal la estructura de las neuronas es muy distinta de la morfología sofisticada anteriormente descrita.

El citoesqueleto juega un papel muy importante en este proceso de desarrollo neuronal, además de ser el responsable de la organización y mantenimiento de la forma altamente polarizada de una neurona ya madura. Está compuesto por 3 tipos de estructuras bien definidas: los filamentos intermedios, los filamentos de actina y los microtúbulos.

Los filamentos intermedios poseen un diámetro de 10 nm, y están formados por proteínas específicas para cada tipo celular. En las neuronas los más abundantes son los neurofilamentos. Ellos están compuestos por 3 subunidades polipeptídicas, NF-L (61 kD), NF-M (95 kD) y NF-H (115 kD) (Xu et al., 1996). Su función principal es darle rigidez a la neurona. Además transportan vesículas, material membranoso y organelos y a pesar que se encuentran en grandes concentraciones en los axones, no intervienen en el crecimiento y guía axonal. De esta manera ratones transgénicos que carecen de neurofilamentos son

perfectamente viables y no presentan ningún defecto importante en las conexiones neuronales (Eyer J et al., 1994).

Los filamentos de actina son polímeros de 5-7 nm de diámetro, compuestos por monómeros que se ensamblan formando filamentos helicoidales polarizados. Estos filamentos poseen un extremo de crecimiento rápido (extremo “puntiagudo”) y un extremo de crecimiento más lento (extremo “barbudo”). En las neuronas, la inestabilidad local de la actina es muy importante para la formación y elongación del axón (Bradke et al., 1999). Es así que, proteínas accesorias que regulan la polimerización de actina, puedan contribuir a regular el proceso de axonogenesis. Las proteínas que regulan la dinámica de actina son muchas y se han clasificado de acuerdo a sus funciones como: a) Nucleadoras (ARP2/3, formina) b) Despolimerizantes (cofilina) c) Intercambiadoras de nucleótidos (profilina) d) Proteínas estabilizadoras (gelsolina) (Dianza et al., 2005). La coordinación e integración de la actividad de estas proteínas es esencial para el control de la polimerización de actina *in vivo*.

Para la correcta polimerización de los microfilamentos también se necesita de la participación de proteínas de señalización de la familia de las proteínas G (Hall y Lalli, 2010). Estas proteínas denominadas la familia de las Rho-GTPasas juegan un papel esencial, ya que controlan el ensamblaje de filamentos de actina en todos los organismos vivos conocidos (Liquin L, 2000). Las proteínas que regulan la actividad de las RhoGTPasas incluyen los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), proteínas que activan las GTPasas y inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI). Las GEFs catalizan el intercambio de GDP por GTP para generar un estado activo de las Rho-GTPasas. En contraste las proteínas GAP estimulan la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas G monoméricas, mientras que los inhibidores de la disociación de los nucleótidos de guanina (GDI), mantienen secuestradas en su forma inactiva a las Rho-GTPasas. La expresión de las GEFs es tejido específica, proporcionando un mecanismo molecular para la modulación tejido-específica de las Rho-GTPasas (Jaffe AB et al., 2005). Su función en

células que presentan polaridad es esencial para definir los dominios de asimetría celular, la base de las diferencias funcionales en una célula polarizada (Schmidt & Hall, 2002).

En neuronas, se han descrito 3 grandes subgrupos de estas proteínas, Rac1, cdc42 y Rho A, cada una con una función específica. Rac1 y cdc42 son necesarias para la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente, durante la elongación del axón (Liquin Luo., 2000). En cambio, la actividad de la proteína RhoA en neuronas induce el colapso de los conos de crecimiento y neuritas, a través de un mecanismo que involucra a los motores del tipo miosina (Amano et al., 1996; Kawano., 1999). Las señales extracelulares se organizan jerárquicamente dentro de la célula, y convergen sobre las GTPasas monoméricas (Rac1, cdc42 y RhoA), y a partir de ellas se producen modificaciones en sus efectores que finalmente van a regular la dinámica de actina.

Los microtúbulos son tubos cilíndricos con un diámetro aproximado de 24 nm. Estas estructuras polarizadas están compuestas por heterodímeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Los dos extremos del microtúbulo son funcionalmente distintos. Lo que se conoce como el extremo “más” es el extremo que crece más rápido *in vitro* y oscila entre episodios de “rescate” (transición de despolimerización a polimerización) y “catástrofe” (transición de polimerización a despolimerización). Este fenómeno recibe el nombre de “inestabilidad dinámica”. La adición de los heterodímeros ocurre preferencialmente en el extremo “más” del microtúbulo. Esta dinámica que presentan los microtúbulos les permite reorganizarse rápidamente para adaptarse al contexto de la célula y responder a distintas señales extracelulares implicadas en procesos como la migración, transporte y polarización, entre otros (Conde y Cáceres, 2009). Las propiedades dinámicas de los microtúbulos también dependen de las modificaciones post-traduccionales que ocurren sobre la  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, tales como: la tirosinación (microtúbulos más dinámicos), destirosinación, acetilación (microtúbulos más estables), poliglutamilación, poliglicilación, fosforilación y palmitoilación. (Barra H et al., 1988; Bullinski et al., 1991; Hammond et al., 2008).

Finalmente, otro nivel de control sobre las propiedades dinámicas de los microtúbulos está dado por su unión a diferentes proteínas que interactúan con ellos y que se clasifican en: a) TIPS, aquellas que se unen al extremo (+) del microtúbulo en crecimiento, controlando así su dinámica y su asociación con organelos intracelulares y actina (EB1, EB3, CLIP170, CLIP115) (Poulain y Sobel, 2010) b) Proteínas desestabilizadoras de microtúbulos (Stathminas, SCG10) c) Proteínas estabilizadoras de microtúbulos ó MAPs (Tau, MAP1A, MAP1B y MAP2) que se unen a lo largo de los microtúbulos y los estabilizan (Dehmelt et al., 2005; Halpain et al., 2006).

### **Rol de los microtúbulos en polaridad neuronal**

Los microtúbulos actúan como grandes “vías” para dirigir el tráfico intracelular y son los reguladores primarios de la diferenciación neuronal (Conde y Cáceres, 2009). Trabajos recientes han demostrado que los microtúbulos tienen un papel activo durante las diferentes fases de la polarización neuronal. La regulación de la estabilidad de los microtúbulos en una neurita, juega un rol instructivo en el inicio de la polarización de las células nerviosas, ya que la estabilización local de los microtúbulos en una neurita, es suficiente para inducir la formación del axón. Esto queda de manifiesto en experimentos donde neuronas en cultivo son tratadas con bajas dosis de taxol (agente estabilizador de microtúbulos) y de esta forma extienden varias neuritas tipo axón que muestran un incremento en la cantidad de microtúbulos acetilados respecto de los destirosinados, un marcaje positivo para la proteína Tau1 distal y la ausencia de la proteína MAP2 (Witte et al., 2008). Junto con esto, la remodelación y la reorganización de la dinámica de microtúbulos en el cono de crecimiento son necesarias para el avance persistente de éste y la elongación axonal, así como para el reconocimiento de señales guía. Por ejemplo, bajas dosis de vinblastina, que no afectan la integridad de la organización de los microtúbulos axonales existentes, pero que disminuyen la dinámica de los microtúbulos, suprimen la elongación del axón. Los microtúbulos permanecen atrapados en una organización no-dinámica que no avanza al paso siguiente de

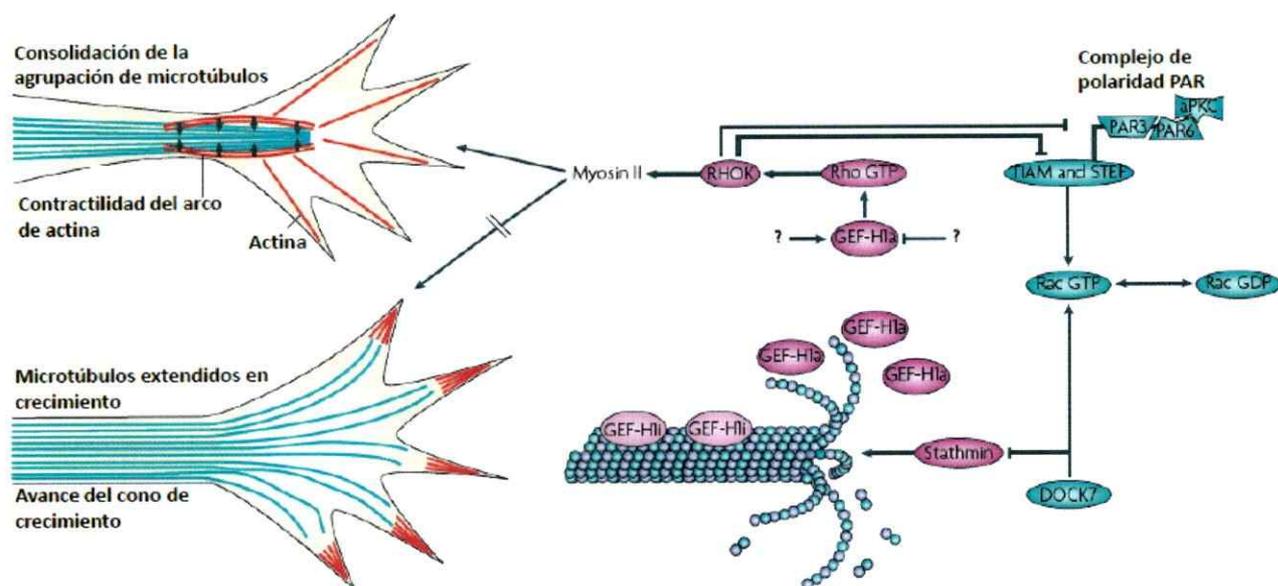
agrupación de microtúbulos, el cual es esencial para la formación de un nuevo segmento axonal (Conde y Cáceres, 2009). Se ha propuesto que una población de microtúbulos dinámicos pioneros que puedan invadir el velo lamelopoidal del cono de crecimiento, actúan como guías para la posterior invasión de microtúbulos que transportan organelos; lo cual a su vez promueve la consolidación del axón (Conde y Cáceres, 2009).

#### **Interacción microtúbulos-actina y formación del axón.**

Existen evidencias que durante los primeros estadios de polarización de neuronas de hipocampo en cultivo, los filamentos de actina influyen en forma significativa las propiedades dinámicas de los microtúbulos, y que existen interacciones recíprocas entre estos elementos del citoesqueleto que son importantes para la especificación, guía y elongación del axón (Bradke y Dotti 1999; Arimura et al., 2007; Dent et al., 2003). La polarización ocurre cuando una de las múltiples neuritas que emergen del cuerpo celular inicia una fase de elongación rápida para llegar a ser axón. La formación del axón se relaciona causalmente con cambios dramáticos en la organización y dinámica del citoesqueleto del cono de crecimiento. Estos cambios involucran una expansión del velo lamelopoidal periférico, un acortamiento de los cordones de actina y un aumento en la dinámica de actina, lo que permite la penetración de microtúbulos tirosinados (presumiblemente dinámicos) dentro de la región central del cono. (Bradke y Dotti, 1997, 1999; Kunda et al., 2001). En presencia de citocalasina D, un agente despolimerizante de actina, todas las prolongaciones menores son capaces de generar un axón. Este tratamiento lleva a la formación de múltiples axones, fenómeno que es precedido por la penetración de microtúbulos dentro de las puntas de las neuritas que están desprovistas de filamentos de actina (Bradke y Dotti, 1999; Ruthel y Hollenbeck, 2000; Kunda et al., 2001). Se ha propuesto que el proceso por el cual una sola neurita puede llegar a convertirse en axón depende de un complejo de polaridad que incluye a proteínas que regulan la estabilización de los microtúbulos, como *crmp2*, y a moléculas reguladoras de la polimerización de actina,

como cdc42 (Inagaki et al., 2001; Nishimura et al., 2005). Miembros de la familia de las Rho-GTPasas incluyendo RhoA, Rac1 y cdc42 parecen ser los principales responsables en la regulación de la conversación cruzada entre actina y microtúbulos en neuronas en desarrollo. Por ejemplo, la vía de señalización de Rho-Rho quinasa (RhoK) está directamente involucrada en la promoción de contractilidad de la actina y de la agrupación de microtúbulos dirigida por miosina II durante la consolidación del axón (Burnette et al., 2008). La inhibición de la vía Rho-RhoK durante las etapas iniciales de la extensión de la neurita podría promover el crecimiento mediante la reducción de la barrera de actina, que previene el avance de los microtúbulos hacia el dominio periférico del cono de crecimiento (Figura A). De hecho, la inhibición de la quinasa Rho induce la formación de múltiples axones en neuronas hipocampales (Da Silva et al., 2003). Se ha descrito que la quinasa Rho (RhoK) fosforila e inactiva a STEF y Tiam1, dos factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) específicos para Rac1, los cuales se asocian con microtúbulos y participan en la formación del axón (Kunda et al., 2001; Takefuji et al., 2007; Nakayama et al., 2008) así como también a PAR3, impidiendo de esta manera la formación del complejo de polaridad (Nakayama et al., 2008). GEF-H1 es una Rho GEF de RhoA que se asocia con los microtúbulos y se activa cuando los microtúbulos se despolimerizan (Birkenfeld et al., 2008). Por el contrario, la activación de Rac1 mediada por DOCK7, otra GEF para Rac1, lleva a la fosforilación e inactivación de la proteína desestabilizadora de microtúbulos "Stathmina". Esto podría contrarrestar la activación de la vía de señalización de Rho-RhoK inducida por GEF-H1 (Watabe-Uchida et al., 2006; Birkenfeld et al., 2008). La inhibición de esta vía promueve la formación del complejo de polaridad PAR3-PAR6-aPKC, el que a su vez puede activar a Tiam1/STEF, producir un posterior aumento de la actividad de Rac1, expansión del lamelopodio del cono de crecimiento, penetración y abertura de los microtúbulos y avance del cono de crecimiento (Arimura y Kaibuchi 2007). De esta manera, un circuito de retroalimentación que involucra los efectos opuestos de RhoA y Rac1

(actuando a través de las GEFs asociadas a microtúbulos) y la regulación de la dinámica de actina y microtúbulos parece ser crucial durante la especificación del axón (Figura A)



(Adaptado de Conde y Cáceres, 2009)

**Figura A. Interacción microtúbulos-actina en el cono de crecimiento axonal. Esquema de la retroalimentación entre microtúbulos y filamentos de actina en la consolidación del axón y avance del cono de crecimiento.** Durante la consolidación, la vía de señalización de la Rho-RhoK fosforila a miosina II, promoviendo así la contractilidad del arco de actina y la agrupación de microtúbulos. RhoK fosforila e inactiva a PAR3, impidiendo la formación del complejo de polaridad PAR, así como la actividad de Tiam1 y STEF (Tiam2), intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), específicos para Rac1. Inversamente, la activación de Rac1 mediada por DOCK7, lleva a la fosforilación e inactivación de statmina. Esto podría prevenir la activación de la vía RhoA-RhoK, mediada por la GEF-H1y de esta manera favorecer la activación de Rac1. La inhibición de la señalización de RhoA-RhoK promueve la formación del complejo de polaridad PAR3-PAR6-proteína quinasa C atípica (aPKC), el cual a su vez puede activar a Tiam1 o STEF. De esta manera incrementa la actividad de Rac1, la expansión del cono de crecimiento lamelopoidal, la penetración y extensión de los microtúbulos y finalmente el avance del cono de crecimiento. Así, el control del encendido y apagado y la dirección de este ciclo (hacia RhoA o Rac1), podría permitir el cambio de fases, desde el crecimiento a consolidación durante la extensión de la neurita y viceversa. Las flechas con punta indican la regulación positiva, en cambio las sin punta, se refieren a regulación negativa. (Adaptado de Conde y Cáceres, 2009)

### **Rol de los microtúbulos en las espinas dendríticas.**

En la sección precedente se ha descrito como los elementos del citoesqueleto neuronal, microtúbulos y filamentos de actina, pueden contribuir concertadamente a la determinación del axón durante la diferenciación neuronal. Se ha propuesto que la formación del axón y los cambios que ocurren en neuronas maduras, y que participan en el control de la determinación de las espinas dendríticas, no obstante ser procesos celulares que ocurren separados temporal y espacialmente, podría tener principios mecanísticos comunes. En las neuronas maduras, una vez que los axones y las dendritas se han establecido y madurado, se forman las espinas dendríticas, pequeñas protuberancias ricas en F-actina con un cuello delgado y una cabeza globular, que se extienden desde la superficie de las dendritas. Las espinas dendríticas constituyen la zona donde ocurren la gran mayoría de las sinapsis excitatorias en el SNC de mamíferos (Matus et al., 2000; Dillon et al., 2005).

Observaciones realizadas en neuronas vivas muestran que las espinas sufren cambios rápidos en su estructura y que tal plasticidad morfológica se debe al citoesqueleto de actina (Fisher et al., 2000; Dillon et al., 2005). Además, se ha reportado que modificaciones en la dinámica de actina están directamente involucradas en la regulación de las sinapsis maduras y que los cambios en la morfología de las espinas dendríticas que son dependientes de actina, juegan un rol importante en los eventos de plasticidad sináptica considerados críticos para los procesos de aprendizaje y memoria (Malenka y Nicoll, 1999). Estudios han demostrado que los niveles de receptores de glutamato en la densidad postsináptica (PSD) influyen la dinámica local de actina, y por lo tanto la morfología de las espinas (Fischer et al., 2000). Adicionalmente, la despolimerización de F-actina reduce el número de receptores de glutamato en la PSD (Allison et al., 1998). Las liberaciones repetitivas de glutamato sobre las espinas dendríticas de neuronas hipocámpales inducen crecimiento selectivo de las espinas estimuladas, lo que es acompañado por un aumento de las corrientes mediadas por los receptores de glutamato tipo AMPA y pueden ser inhibidas en presencia del inhibidor de la

polimerización de actina, latrunculina A (Matsuzaki et al., 2004). Esto demuestra que la relación que existe entre la actividad sináptica y la dinámica local de actina es bidireccional, porque la modulación de la dinámica de las espinas dependiente de la neurotransmisión, es requerida para las alteraciones de la fuerza sináptica. Trabajos anteriores señalan que la actividad sináptica es capaz de variar la dinámica de actina en las espinas; mediante el reclutamiento y activación de los reguladores del citoesqueleto de actina, principalmente los miembros de la familia de las RhoGTPasas, tales como RhoA, Rac1 y cdc42 (Hall, 1998). La activación de Rac1 promueve la polimerización de actina, lo que resulta en el aumento y estabilización de ramificaciones dendríticas (Li et al., 2002), así como el desarrollo y mantenimiento de una mayor densidad de espinas (Nakamaya et al., 2000). En contraste, la activación de RhoA disminuye la longitud y densidad de espinas, indicando que RhoA tiene un efecto negativo en la formación y mantención de estas estructuras (Nakayama et al., 2000; Pilpel y Segal, 2004; Tashiro et al., 2000). La GEF-H1 es específica de RhoA y es una proteína que se asocia a los receptores AMPA. La inhibición de la actividad de los receptores AMPA promueve la activación de GEF-H1 y ésta a su vez regula en forma negativa el desarrollo de las espinas a través de la activación de la cascada de RhoA (Kang et al., 2009). Algunos trabajos indican que la morfogénesis de espinas y el crecimiento de las arborizaciones dendríticas en respuesta a la activación de los receptores de NMDA, se debe a que este receptor interacciona a través de sus subunidades NR1 y NR2B con la GEF específica de Rac1 "Tiam1". Esta interacción permite que Tiam1 se fosforile (Fleming et al., 1999) y pueda activar a Rac1. Esto promueve el remodelamiento del citoesqueleto de actina, morfogénesis de espinas, además de plasticidad sináptica (Tolias et al., 2005). Adicionalmente, se ha reportado que la proteína PAR3 regula la morfogénesis de espinas, ya que se une a Tiam1 y espacialmente la restringe a las espinas dendríticas (Zhang y Macara, 2006). Además, se ha descrito que la activación de los efectores río abajo de Rac1, como son LIMK-1 y cofilina es importante para la morfogénesis de espinas, ya que su ausencia produce anomalías en el citoesqueleto de actina, con espinas dendríticas con una

morfología anormal, consistente en cabezas más pequeñas, cuellos más anchos y una menor cantidad de F-actina, en comparación con los ratones silvestres (Meng et al., 2002; Rust et al., 2010). Hasta hace pocos años se creía que el mayor componente de las espinas dendríticas era la actina polimerizada (Tada y Sheng, 2006), mientras que se pensaba que los microtúbulos estaban excluidos de estas estructuras (Matus et al., 2000; Kaech et al., 2001). Recientemente se demostró que en neuronas adultas los microtúbulos dinámicos pueden estar presentes en forma transitoria en las protrusiones dendríticas y podrían ser importantes para la formación y plasticidad de estas estructuras (Gu et al., 2008., 2009; Hu et al., 2008; Jaworski et al., 2009). No solo eso, estos trabajos recientes han demostrado la presencia de proteínas que se unen a los microtúbulos en las espinas dendríticas, junto con su participación en la morfogénesis de éstas (Jaworski et al., 2009). Mediante estudios de microscopía en tiempo real usando  $\alpha$ -tubulina y proteínas que se unen al extremo (+) de los microtúbulos acopladas a proteína fluorescente verde "GFP" en cultivos de neuronas hipocampales maduras, se descubrió que los microtúbulos neuronales son muy dinámicos y que salen del eje dendrítico, se curvan e ingresan transitoriamente a las espinas dendríticas (Hu et al., 2008; Jaworski et al., 2009). La entrada de estos microtúbulos podría ser guiada por elementos pre-existentes del citoesqueleto, tales como otros microtúbulos o por filamentos de actina, ya que se sabe que la densidad post-sináptica puede servir como punto de anclaje para paquetes de actina (Sheng y Hoogenraad, 2007). Algunas evidencias sugieren que la invasión transitoria de los microtúbulos en las espinas dendríticas está asociado con cambios morfológicos, tales como crecimiento rápido de la espina y formación de protrusiones en la cabeza de las espinas (Hu et al., 2008; Jaworski et al., 2009). La proteína EB3, se une al extremo (+) de los microtúbulos, e interacciona directamente con la proteína p140Cap, la que a su vez se une a la proteína de unión a F-actina "cortactina". La interacción entre EB3 y p140Cap podría controlar la función de cortactina y regular la dinámica de actina dentro de la espina dendrítica (Jaworski et al., 2009). Hasta el momento, mientras que están bien establecidos los vínculos moleculares entre filamentos de actina y microtúbulos en

las etapas iniciales de la polarización, se sabe muy poco acerca de estos lazos en las neuronas maduras, (Hoogenraad y Bradke, 2009).

Los antecedentes aquí expuestos sugieren que existe una conexión entre los microtúbulos y los filamentos de actina, que es importante para la formación del axón y la morfogénesis de espinas en neuronas adultas. Por lo tanto, es probable pensar que deben existir proteínas que pueden interactuar con ambos citoesqueletos, y que estas son buenas candidatas para jugar un papel importante en la regulación cruzada de estos dos elementos del citoesqueleto neuronal. A continuación, se presentan los argumentos que postulan a algunas MAPs como posibles elementos clave para la regulación de estos procesos.

#### **Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)**

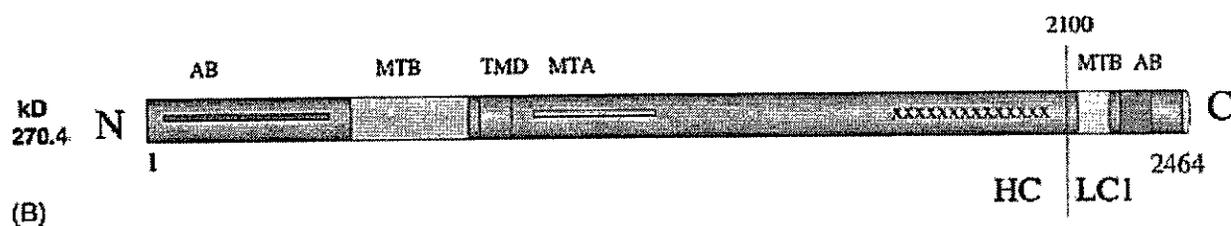
De forma general toda proteína que se asocia con los microtúbulos puede considerarse una MAP. Sin embargo, pueden clasificarse en proteínas motoras, quinasas, adaptadoras y las llamadas proteínas estructurales "MAPs", las que se unen a los microtúbulos y los estabilizan. En este grupo destacan MAP1A, MAP1B, MAP2 y Tau. Además existe un grupo de MAPs especializadas que se unen a los extremos (+) del microtúbulo y se conocen con el nombre de TIPs (Tubulin interacting protein), como la EB1 y EB3.

Muchas de estas MAPs (MAP1A, MAP1B, MAP2 y Tau) comparten propiedades comunes, como la protección de los microtúbulos frente a la despolimerización, pero también poseen características específicas que las diferencian a unas de otras; como los diferentes lugares de unión a los microtúbulos o su acción sobre la nucleación de los microtúbulos. Además, estas proteínas tienen una expresión temporal y subcelular específica durante la neurogénesis, la diferenciación y la maduración de las neuronas. En neuronas maduras estas proteínas se distribuyen de manera asimétrica, mientras que Tau se encuentra preferencialmente en el axón, MAP2 se distribuye en las dendritas (Peng et al., 1985; Matus et al., 1988). No sólo existe segregación entre diferentes miembros de la familia de las MAPs, también existe una

segregación asociada a las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir estas proteínas. Un ejemplo de esto es la proteína MAP1B que cuando está fosforilada en el llamado modo I, por quinasas dirigidas por prolina tales como GSK-3 $\beta$  y CDK-5, se localiza preferentemente en la parte distal del axón en las neuronas en desarrollo. En cambio, cuando es fosforilada en el llamado modo II por la caseína quinasa II su localización es fundamentalmente somato-dendrítica en neuronas maduras.

### **Proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B)**

La proteína MAP1B, que se asocia a microtúbulos y los estabiliza (Figura B), es la primera de las MAPs en expresarse durante el desarrollo del sistema nervioso (Tucker et al., 1989). Se concentra principalmente en la parte distal de los axones en crecimiento donde se asocia con microtúbulos tirosinados (Black et al., 1994). Su presencia se ha detectado por inmunohistoquímica en células de glía, axones, cuerpos neuronales y dendritas. El motivo de unión a tubulina en MAP1B, es diferente del motivo descrito para otras MAPs como MAP2, MAP4 y Tau. Está compuesta de numerosas repeticiones de cuatro aminoácidos, esencialmente básicos (Noble et al., 1989). La presencia de estos residuos básicos le confiere una capacidad distinta de estabilización de microtúbulos al compararle con otras MAPs *in vitro* y cuando son expresadas en células eucariontes. Una diferencia fundamental con otras MAPs, es que la sobre-expresión de MAP1B no induce la formación de manojos de microtúbulos en células transfectadas, no obstante es capaz de estabilizar a los microtúbulos (Takemura et al., 1992).



Riederer et al, 2007

**Figura B. Esquema de la estructura y sitios funcionales de la proteína MAP1B.** En el aminoácido 2100 se indica la separación de la proteína en una cadena pesada HC y una liviana LC. MAP1B está compuesta de 2464 aminoácidos, posee dos sitios de unión a actina (AB) uno en la cadena liviana (aminoácidos 2336-2459) y otro en el amino-terminal de la cadena pesada (aminoácido 517). El sitio de unión a tubulina (MTB) de la MAP1B se caracteriza por 21 repeticiones KKEK cerca del extremo amino terminal de la cadena pesada (517-848) y abarca también un MTB en la cadena liviana (2210-2336). Cerca del primer MTB, se observa un potencial dominio transmembrana (TMD). Además posee un sitio que ayuda a incrementar el ensamblaje de microtúbulos (MTA). Posee una región hidrofílica (1866-2071) cerca del extremo carboxilo terminal, el cual contiene 12 repeticiones (YSYETXEXTTXXPXX), la cual está indicada por X en el esquema (Riederer et al., 2007).

MAP1B tiene un homólogo estructural, la MAP1A y ambas proteínas están compuestas por una cadena pesada "HC" y una cadena liviana "LC". La mayor homología entre MAP1B y MAP1A se presenta en dos dominios en el extremo aminoterminal de la cadena pesada (HC) y uno en el carboxilo terminal de la cadena liviana (LC) (Hammarback et al, 1991). En cada caso, la cadena pesada y la liviana se generan por escisión proteolítica de sus respectivas poliproteínas precursoras (MAP1A y MAP1B). Estas subunidades son intercambiables *in vitro* (Schoenfeld et al., 1989). Ambas se unen a microtúbulos y a filamentos de actina, sugiriendo que podrían estar involucradas en mediar o regular la interacción entre los

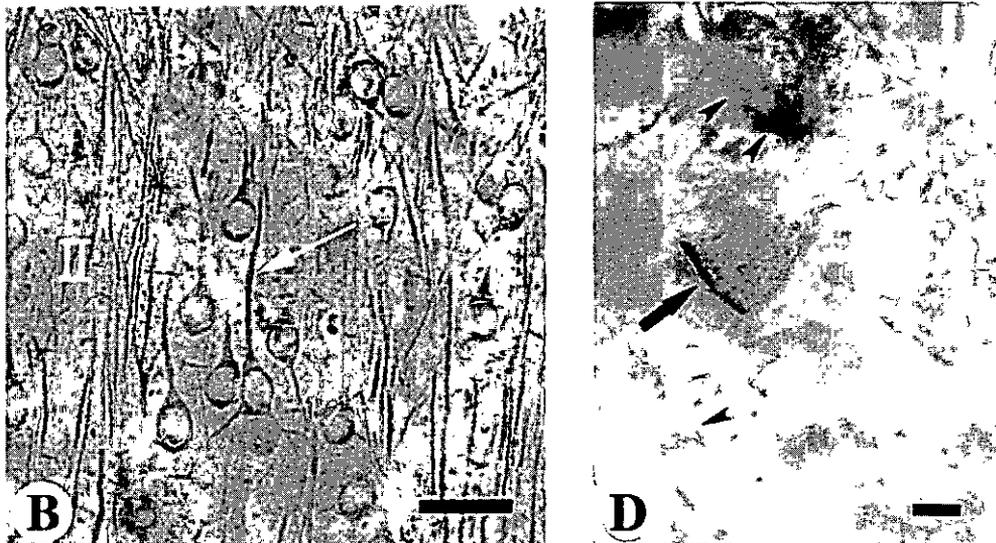
microtúbulos y filamentos de actina, lo cual es esencial para la función y morfogénesis neuronal (Pedrotti y Islam., 1996; Cueille et al., 2007).

La proteína MAP1B es esencial para el desarrollo normal del cerebro, pues participa en los procesos de axonogénesis y polaridad neuronal (González-Billault et al., 2001; Meixner et al., 2000). La interrupción del gen que codifica para MAP1B da lugar a una alteración del desarrollo del cerebro (Edelmann et al., 1996; Takei et al., 1997; González-Billault et al., 2000; Meixner et al., 2000; Takei et al., 2000). Los defectos asociados a la pérdida de función de MAP1B afectan especialmente a aquellos procesos en donde la aparición de extensiones citoplasmáticas son críticas para el adecuado funcionamiento, tales como: la migración neuronal (González-Billault et al., 2005) y la guía axonal (Del Río et al., 2004). Más importante aún, neuronas hipocampales piramidales en cultivo provenientes de animales MAP1B (-/-) muestran una velocidad reducida en la elongación del axón (Takei et al., 2000; González-Billault et al., 2001). Estas neuronas exhiben conos de crecimiento con un pequeño velo lamelopoidal, un aumento en la actividad protrusiva de la actina, así como una disminución en el número de microtúbulos tirosinados y en el ensamblaje y dinámica de los microtúbulos. Estos antecedentes vinculan a MAP1B con el control de la polimerización y estabilidad de los filamentos de actina, sin que hasta la fecha se conozcan los mecanismos moleculares específicos que subyacen a esta regulación.

La expresión de MAP1B no es constitutiva, y es así que durante el desarrollo del sistema nervioso alcanza sus máximos niveles de expresión, los que disminuyen gradualmente cuando se llega a la etapa adulta. Sin embargo, la expresión de MAP1B en adulto permanece elevada en regiones del cerebro que retienen un alto nivel de neuritogénesis y crecimiento axonal como son: el bulbo olfatorio, las células fotosensitivas de la retina, el hipotálamo, los núcleos talámico anterodorsal y trigémino y en áreas donde existe una gran plasticidad neuronal, como el hipocampo y las células de Purkinje en el cerebelo. El significado funcional de la expresión continua de MAP1B en el sistema nervioso adulto aún se desconoce. No obstante, las regiones que retienen altos niveles de expresión de MAP1B se

caracterizan por modificaciones estructurales en respuesta a estimulaciones experimentales o fisiológicas, o por una gran plasticidad inducida por lesiones, como por ejemplo, el hipotálamo.

En las etapas más tardías de la sinaptogénesis se ha detectado un aumento de MAP1B en la membrana plasmática (Kitamura et al, 2007), también se ha descrito la presencia de MAP1B en la membrana postsináptica, sugiriendo un rol en la función sináptica (Figura C; Kawakami et al, 2003)



**Figura C. Localización ultraestructural de MAP1B en corteza cerebral de rata.** En B se muestra una fotografía de células piramidales de la capa V tomada mediante microscopía óptica, observándose una marcada tinción positiva para MAP1B, usando un anticuerpo policlonal contra MAP1B, en las dendritas y soma de las neuronas. La dendrita apical de las células piramidales se marca intensamente (flecha blanca), en cambio, el núcleo no se tiñe (barra=30  $\mu$ m). D es una microfotografía de microscopía electrónica representativa de la localización de MAP1B en las sinapsis de neuronas de la capa II de corteza cerebral. La flecha negra indica la presencia de MAP1B en el área postsináptica. La mayoría de las sinapsis que son positivas para MAP1B son asimétricas. Las cabezas de flecha indican las

sinapsis que son negativas para la tinción con el anticuerpo contra MAP1B (barra =200nm). (Kawakami et al., 2003)

Por lo tanto, es probable que la expresión mantenida de MAP1B en el adulto facilite eventos transitorios de remodelamiento del citoesqueleto, los que podrían contribuir a la regeneración axonal y plasticidad sináptica (Nothias et al., 1996). MAP1B es una proteína de una masa molecular grande y se ha visto que interacciona con varias proteínas, por eso se ha sugerido que tendría un rol como proteína adaptadora. La MAP1B está implicada en una gran cantidad de funciones celulares, pudiendo ser un nexo de unión entre los microtúbulos y los filamentos de actina. Se ha visto que interacciona con proteínas como la gigaxonina, una proteína que sirve de puente entre los microtúbulos y los filamentos intermedios, y que está implicada en la neuropatía del axón gigante (Bomont et al., 2003; Ding et al., 2002; Allen et al., 2005). También interacciona con el transportador de glicina GLYT-1, y esta interacción es esencial en la neurotransmisión en la retina (Hanley et al., 2000; Pattnaik et al., 2000). Finalmente, también interacciona con GRIP1 (del inglés "Glutamate Receptor Interacting Protein"), lo que sugiere un posible rol en la estabilización de los receptores AMPA (Seog et al., 2004).

Tomando en cuenta estos antecedentes y lo mencionado en los párrafos anteriores pensamos que la proteína MAP1B en cerebro adulto podría participar en la regulación de la plasticidad y actividad sináptica a través de la formación de complejos multiproteicos con moléculas involucradas en los procesos de neurotransmisión, remodelación del citoesqueleto de actina y/o plasticidad neuronal. Junto con esto pensamos que en los primeros estadios del desarrollo MAP1B participa en la elongación del axón mediante la regulación de las moléculas que participan en las modificaciones del citoesqueleto de actina. Por lo tanto, proponemos la siguiente hipótesis:

## **HIPÓTESIS**

**La proteína MAP1B puede controlar el ensamblaje de los filamentos de actina durante el desarrollo del sistema nervioso, contribuyendo a la elongación de axones en neuronas jóvenes, y en cerebro adulto, a la formación y mantención de las espinas dendríticas y a la regulación de la neurotransmisión.**

### **OBJETIVO GENERAL**

**Analizar los mecanismos moleculares a través de los cuales la proteína MAP1B regula los procesos de elongación axonal durante el desarrollo del sistema nervioso y de transmisión sináptica en estadios adultos.**

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Evaluar si durante el desarrollo embrionario, la disminución en la expresión de MAP1B induce cambios en el remodelamiento del citoesqueleto de actina que impacten sobre la generación de polaridad neuronal.**
- 2. Estudiar si en el cerebro adulto, la disminución en la expresión de MAP1B induce cambios en el remodelamiento del citoesqueleto de actina que impacten sobre la formación y/o mantención de las espinas dendríticas.**
- 3. Evaluar la posible participación de la proteína MAP1B en la formación de complejos multiproteicos en el cerebro adulto, que den cuenta de su participación en el control de la neurotransmisión.**

## MATERIALES Y METODOS

### MATERIALES

Los medios de cultivo Neurabasal-A, *Minimal essential medium* (MEM), *Dulbecco modified Eagle's medium* (DMEM), Hank's BSS, Glutamax I y la tripsina-EDTA se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, CA). El suero fetal bovino (FBS), el suero de caballo (HS) y los suplementos neuronales B27 y N2 se adquirieron en GIBCO™. La genoteca de cerebro de ratón adulto (msBrain cDNA matchmaker "Clontech") y los plasmidios utilizados en el ensayo de doble híbrido se adquirieron en Clontech. Los reactivos de biología molecular se obtuvieron de Promega, Fermentas y BioLabs. La sonda fluorescente FM4-64 se adquirió en Molecular Probes (Eugene, USA) y el medio de montaje (Fluorsave) para fluorescencia en Calbiochem. El Kit de nucleofección de neuronas de ratón se adquirió en Amaxa (Gaithersburg, MD). Las membranas de PVDF y el reactivo de quimioluminiscencia ECL fueron adquiridos en Amersham Pharmacia Biotech. Los reactivos y productos químicos de uso general empleados en este trabajo se adquirieron en Sigma Chemical Co (St Louis, USA) y en Merck (Darmstadt, Alemania).

### Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados en la inmunodetección (WB) y en inmunofluorescencia (IF) y las diluciones usadas se describen en la tabla I.

Anticuerpo primario	Proteína	Especie	Casa comercial	Dilución WB	Dilución IF
Anti- $\alpha$ -tubulina	$\alpha$ -tubulina	Ratón	Sigma Aldrich	1:5000	1:2000
Anti- $\beta$ -III tubulina	Isotipo $\beta$ -III-tubulina	Ratón	Sigma Aldrich	1:2000	1:1000

Antitubulina tirosinada	Tubulina tirosinada	Ratón	Sigma Aldrich	1:5000	1:2000
Anti- $\beta$ - actina	$\beta$ -actina	Ratón	Sigma	1:5000	1:2000
N19	MAP1B	Cabra	Santa-Cruz	1:1000	1:2000
Anti- $\beta$ - galactosidas a	$\beta$ -galactosidasa	Ratón	Promega	1:5000	1:1000
Anti-Tiam1	Tiam1	Conejo	Santa-Cruz	1:1000	1:200
Anti- pPMYT	pPMYT	Cabra	Santa-Cruz	1:500	-
Anti-P- cofilina (Ser 3)	P-cofilina	Conejo	Cell Signaling	1:1000	-
Anti-cofilina	cofilina	Conejo	Sigma	1:1000	-
Anti-P- LIMK-1	P-LIMK	Conejo	Cell Signaling	1:1000	-
Anti-LIMK- 1 (Thre 508)	LIMK	Cabra	Santa-Cruz	1:1000	-
Anti-Rac1	Rac1	Ratón	Cytoskeleton	1:500	-
Anti-RhoA	RhoA	Ratón	Cytoskeleton	1:500	-
Anti-cdc42	cdc42	Ratón	Cytoskeleton	1:500	-
Anti-HA	HA	Conejo	Sigma	1:1000	1:200
Anti-Myc (clon A14)	Myc	Conejo	Santa-Cruz	1:1000	1:200

Anti-PSD95	PSD95	Ratón	Cell Signaling	1:1000	-
Antisinapto fisina	Sinaptofisina I	Cabra	Santa-Cruz	1:500	
Tau1	Tau desfosforilado	Ratón	Chemicon	1:1000	1:500
Anti-Snapin	Snapin	Cabra	Santa Cruz	1:1000	1:100
Anti- MAP2(514)	MAP2	Conejo	Laboratorio Jesús Ávila		1:200

**Tabla I. Resumen de los anticuerpos y las diluciones utilizadas tanto en los experimentos de Western Blot como inmunofluorescencia**

Los anticuerpos secundarios empleados, tanto en Western Blot (WB) como en inmunofluorescencia (IF), y sus diluciones, se resumen en la siguiente tabla II

Anticuerpo secundario	Especie	Casa comercial	Dilución WB	Dilución IF
Anti-ratón HRP	Cabra	Dako	1:1000	-
Anti-conejo HRP	Cabra	Dako	1:1000	-
Anti-cabra	Burro	Santa-Cruz	1:2000	-
Anti-ratón Alexa 488, 594, 647	Burro	Invitrogen	-	1:400
Anti-conejo Alexa 488, 594, 647	Burro	Invitrogen	-	1:400
Anti-cabra Alexa 555	Burro	Invitrogen	-	1:400

**Tabla II.** Lista de anticuerpos secundarios y las diluciones a las que se emplearon en Western Blot (WB) e Inmunofluorescencia (IF).

## MÉTODOS

### Animales

Los ratones mutantes de MAP1B pertenecen a la cepa NMR1 y se generaron mediante la técnica de *gene trapping* (Chowdhury et al, 1997). El vector utilizado para interrumpir la expresión del gen contiene un gen quimérico compuesto por neomicina fosfotransferasa (*neo<sup>r</sup>*) y  $\beta$ -galactosidasa, los que se encuentran bajo el control de expresión del promotor del gen atrapado. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo a los protocolos estandarizados y aprobados por la comisión de bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

### Genotipificación de los animales mutantes para MAP1B: reacción de polimerasa en cadena (PCR)

Para genotipar los animales, se hizo una biopsia de la cola durante los primeros 14 días de vida de los ratones y se les extrajo el ADN genómico. Posteriormente mediante PCR y utilizando partidores específicos contra la secuencia del gen de resistencia a neomicina, se determinó el genotipo de cada ratón.

A: 5' – CAT GGT CAG GTC ATG GAT GAG C-3'

B: 5' – TAA TCA GCC ACT GAT CCA CCC AG-3'

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo usando una mezcla de reacción estándar que contenía: como templado el ADN genómico (100 ng), 0,2  $\mu$ M de cada partidor, 1,0 U de *Taq* DNA polimerasa, 200  $\mu$ M de dNTPs en un volumen final de reacción de 50  $\mu$ l. Las condiciones de PCR fueron: denaturación inicial a 94°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos con una temperatura de denaturación de 94°C por 1 minuto,

una fase de apareamiento a 60°C por 1 minuto y una fase de elongación a 72°C por 1 minuto y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Finalmente la reacción de PCR se corrió en geles de agarosa al 2% y se analizó la presencia de una banda de 238 pares de bases que estaba presente tanto en ratones heterocigotos como homocigotos para la mutación en MAP1B. Posteriormente el genotipo de cada ratón se confirmó por ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra MAP1B total (N19) y  $\beta$ -galactosidasa.

### **Cultivos celulares**

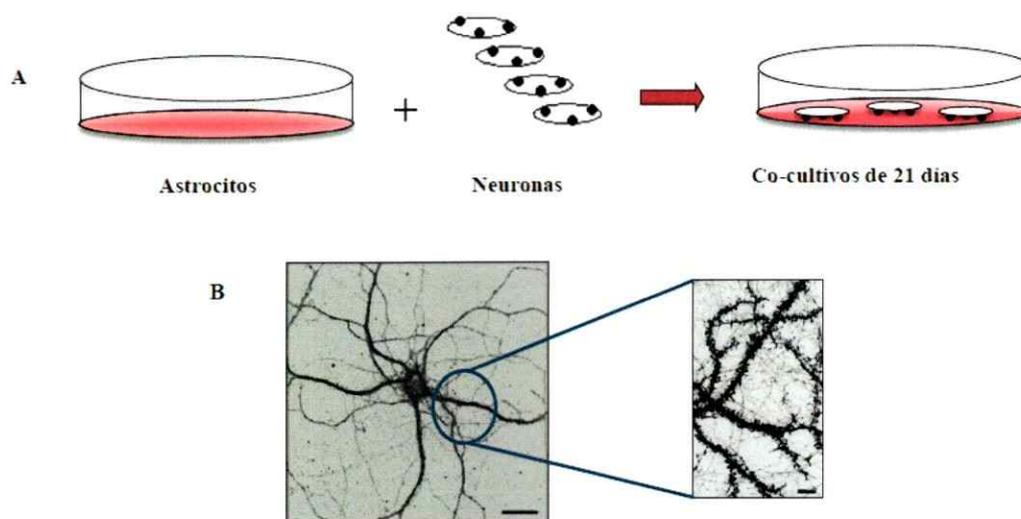
La línea celular Cos-7 (células epiteliales de riñón de mono) se crecieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, 4,5 g/l glucosa) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 5% y 100  $\mu$ g/ml de penicilina y estreptomicina. Las células se crecieron en placas de cultivo a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad controlada al 95% hasta alcanzar la densidad deseada.

### **Cultivos primarios de células hipocampales**

Los cultivos de neuronas hipocampales piramidales se llevaron a cabo a partir de embriones en estadio E18 de gestación, siguiendo el método descrito previamente por Banker y Cowan (1977). Brevemente, después de obtener los hipocampos, se disectaron en medio Hank's libre de Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>, pH 7,4 (HBSS) y se trataron con papaína (Worthington Biochemical Corporation) durante 30 minutos a 37°C. Se disgregó el tejido mecánicamente y se estimó el número de células disgregadas por conteo mediante un hemocitómetro. A continuación, las células re-suspendidas en medio de adhesión (Neurobasal suplementado con 0,6% de D-glucosa, 10% de suero de caballo, 2mM de glutamax, 2mM piruvato de sodio, 100U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina) fueron sembradas en placas petri y cubreobjetos de vidrios pre-tratados con poli-L-lisina (100  $\mu$ g/ml). Posteriormente después de 3 horas se cambió el medio de adhesión por medio neurobasal de mantención libre de

suero suplementado con B27, N2, 2mM de Glutamax, 2mM piruvato de sodio, 100 U/mL penicilina y 100 mg/mL estreptomicina. Para evitar la proliferación de células no-neuronales a los 3 días de incubación *in vitro* (DIV) se añadió al medio Arabinofuranosilcitosina (Ara-C; Calbiochem) a una concentración final de 5 $\mu$ M.

Para los estudios de polaridad las neuronas fueron sembradas a una densidad de 5000 células por cristal de 12 mm de diámetro y mantenidas 1 DIV. En cambio, para los análisis de morfología de espinas dendríticas y electrofisiología, los cultivos fueron mantenidos por largos periodos de tiempo (entre 14 y 21 días). Para ello las neuronas fueron plaqueadas a una densidad de 50.000 células sobre cristales de 12 mm de diámetro, decorados con 3 pequeñas esferas de parafina estéril, e invertidas sobre una monocapa de astrocitos en un 70-80% de confluencia (Kaech et al, 2007) (Fig D). Una vez a la semana, un tercio del medio de estos cultivos fue reemplazado por medio neurobasal de mantención fresco.



**Figura D. Co-cultivos de astrocitos-neuronas (A)** Esquema de la realización de co-cultivos de 21 días de neuronas y astrocitos. **(B)** Imagen de contraste de fase de una neurona hipocampal a los 21 días de incubación in vitro (DIV) Barra: 20 $\mu$ m. Nótese la claridad con la cual se pueden observar y estudiar estructuras tan pequeñas como las espinas dendríticas (Barra: 2 $\mu$ m).

### Cultivo de astrocitos

El cultivo fue preparado según (Kaech et al, 2007). Para ello se usaron neonatos de ratón en estadio de desarrollo P1, en donde las cortezas fueron disectadas en medio Hank's libre de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , pH 7,4 (HBSS) e incubadas con 0,25% de tripsina y 1%(peso/vol) DNAsa durante 15 minutos a 37°C. A continuación se realizaron 3 lavados con HBSS y el tejido se disgregó de manera mecánica primero con una pipeta de vidrio de 10 ml y después con una de 5ml. Posteriormente la suspensión de células se pasó por un filtro de un diámetro de poro de 70 micras (Falcon) y las células obtenidas fueron sembradas sobre placas M6 sin poli-L-lisina. Estas células se cultivaron en medio de Glia (MEM suplementado con 10% de suero de caballo, 2 mM, glutamina ,2mM piruvato de sodio, 0,6% de D-glucosa, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 mg/mL). Cada 4 o 5 días se le cambio el medio a las placas y

cuando los astrocitos se encontraron a una confluencia entre el 60-80 % se usaron para realizar los co-cultivos con las neuronas de hipocampo. Un día antes de invertir los cristales con las neuronas plaqueadas, se les cambió el medio de Glía por medio Neurobasal de mantención.

### **Transfecciones**

Para las transfecciones transitorias de células Cos-7 se transfectó 1 µg de plásmido por pocillo de placa M24 y 4 µg para placas petri de 60mm a una densidad celular del 80-90% aproximadamente, con Lipofectamina TM 2000 (Invitrogen) en el medio de transfección Optimem (GIBCO). Para cada transfección, se diluyó 1 µg de DNA en 50 µl de Optimem y 2 µl de Lipofectamina TM 2000 en otros 50 µl de Optimem (para las placas se usaron 250 µl en cada caso y 8 µl de lipofectamina) Estas diluciones se incubaron por separado 5 minutos a temperatura ambiente, y pasado este tiempo, fueron mezcladas y mantenidas a temperatura ambiente durante 20 minutos. La mezcla final fue añadida gota a gota a las células, a las cuales previamente se les había cambiado el medio por Optimem sin antibióticos. Pasadas 4-6 horas se detuvo la transfección cambiando el medio de transfección por medio de plaqueo DMEM 10% FBS.

### **Nucleofección y plasmidios**

Para transfectar neuronas en suspensión obtenidas de hipocampos de embriones E18 usamos el método de la nucleofección. Para ello se usó el kit de nucleofección de neuronas de ratón de Amaxa y se siguió el protocolo descrito por el fabricante. Por cada reacción se utilizaron  $8 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  células, las que fueron re-suspendidas en 100µl de solución de nucleofección y 3µg del plásmido y colocadas en una cubeta. Para los experimentos de polaridad los vectores utilizados fueron lo siguientes: 1) Tiam1 cDNA (C119; Kunda et al., 2001) clonado en el vector pcDNA3, el cual contenía el promotor de citomegalovirus (CMV) y una cola HA y que corresponde a la forma constitutivamente activa de Tiam1 2) un cDNA

para la forma silvestre de Rac1 y otro para la forma constitutivamente activa de Rac1(CA-Rac1, mutante V12) clonada en el vector pcDNA3 y que poseía una cola myc 3) un cDNA para la forma nativa de cdc42 y otro la forma constitutivamente activa de cdc42(CA-cdc42 mutanteV12) clonada en el vector pcDNA3 que contenía un epitopo myc. Se seleccionó el programa apropiado para neuronas hipocampales de ratón en el nucleofector (programa O-005) y se insertó la cubeta. Una vez terminado el pulso eléctrico, se añadieron a la cubeta 500 µl de medio de adhesión. Posteriormente las células fueron sembradas a la confluencia deseada sobre cristales tratados con poli-L-lisina. Pasadas 3 horas se les cambió el medio por medio neurobasal suplementado con B27, y a las 24 horas post-transfección se fijaron con PFA y sacarosa al 4% en PBS, durante 30 minutos a 37°C.

#### **Inmunofluorescencia de células**

Las células sembradas sobre cristales de vidrio cubiertos con poli-L-lisina se lavaron por 5 minutos en solución de PBS y fueron fijadas con 4% paraformaldehído- 4% sacarosa en PBS, durante 30 minutos a 37°C. A continuación fueron permeabilizadas por 15 minutos con una solución de 0,1% Tritón X-100 en PBS, lavadas y bloqueadas a temperatura ambiente con 5% de albúmina de suero de bovino (BSA). Los anticuerpos primarios se añadieron en 1% BSA/PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS, se añadieron los anticuerpos secundarios o la faloidina-TRITC (1/200, SIGMA) en 1% BSA/PBS. Tras 3 lavados con PBS y uno con H<sub>2</sub>O, se montaron los cristales con FluorSave sobre portaobjetos de vidrio para su posterior observación al microscopio. Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META y un LSM 410.

### **Análisis morfométricos de los parámetros de la forma neuronal**

Las imágenes se digitalizaron en un monitor de video mediante el programa Metamorph (Universal Imaging, West Chester, PA). Para las mediciones de longitud neurítica o forma de cono de crecimiento, las células teñidas con los anticuerpos fueron seleccionadas al azar y analizadas usando las herramientas de mediciones morfométricas del programa Metamorph como se describe en (Paglini et al., 1998; Kunda et al., 2001). Las mediciones de longitud axonal se realizaron mediante el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### **Reconstrucción en 3D de las espinas dendríticas**

Para llevar a cabo el estudio del número de espinas dendríticas, morfología de la cabeza y cuello se adquirieron imágenes de microscopía confocal con un objetivo de aceite de inmersión de 63X de neuronas de 21DIV provenientes de animales WT e hipomorfos para MAP1B. Para obtener las imágenes se usó una resolución de 1024X1024 píxeles con un promedio de 2 y 0,60  $\mu\text{m}$  de pinhole. Para realizar las reconstrucciones en 3D de la morfología de las espinas se hicieron Z-stacks con 13 cortes de 0,150  $\mu\text{m}$  de separación. Posteriormente las imágenes fueron deconvolucionadas mediante el programa Huygens. Las reconstrucciones se llevaron a cabo a través del programa IDL time Calc. La clasificación de los distintos tipos de espinas dendríticas se llevo a cabo según el siguiente criterio: 1- espinas “*mushroom*” poseían una cabeza grande con un diámetro mayor a 0,75  $\mu\text{m}$  y un cuello corto y estrecho, 2- espinas “*stubby*” no poseían una obvia constricción entre la cabeza y la unión del tronco de la dendrita, 3- espinas “*thin*” poseían una cabeza pequeña con un diámetro entre 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  y un cuello largo y estrecho, 4- “*Filopodios*” se caracterizaban por ser delgadas protrusiones de longitud mayor a 1,5  $\mu\text{m}$  sin una cabeza distinguible. Para realizar los análisis cuantitativos de morfología se llevaron a cabo 3 experimentos independientes en donde se midieron 500 protrusiones para cada genotipo y estudio. Para cuantificar la densidad de espinas dendríticas se realizaron 3 experimentos independientes y en cada caso

se tomaron 3 ramificaciones dendríticas por neurona (10 neuronas por experimento). Para los análisis descritos en esta sección, se tomaron en cuenta las proyecciones dendríticas que se detectan a partir de 100-150  $\mu\text{m}$  de longitud del soma y a lo largo de las dendritas

### **Purificación de Sinaptosomas**

El protocolo usado para purificar las fracciones sinaptosomales desde cerebros de ratones adultos fue adaptado de (Carlin et al., 1980). Brevemente, se homogeneizó el cerebro anterior de ratones adultos de 1 mes y medio de edad en 4 volúmenes/gr de buffer A (0.32 mM sucrosa, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ , cocktail de inhibidores de proteasas, 1mM de ácido okadaico y 1 mM ditiotritol) en un homogeneizador de vidrio. Después de adicionar 10 volúmenes/gr de buffer A, el homogeneizado se centrifugó a 1400 g por 10 minutos a 4°C, de ahí se recuperó el sobrenadante S1 y el pellet P1 fue re-suspendido, homogeneizado en 4 volúmenes/gr de buffer A y centrifugado a 700 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se combinó con el S1 y se centrifugó 13,800 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente el sobrenadante S2 fue separado del pellet P2 y centrifugado a 100,000 g por 1 hora a 4°C, usando un rotor TL100.3 El sobrenadante resultante S3 constituyó la fracción citosólica y el pellet P3 la fracción sinaptosomal cruda. Para separar las fracciones pre y post-sináptica, la fracción sinaptosomal cruda se re-suspendió en 24 ml de buffer B (0.32 mM sucrosa, 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1 mM EGTA, 1 mM ditiotritol, un cocktail de inhibidores de proteasas y 1mM de ácido okadaico) por 10 gramos de tejido inicial. Esto se diluyó 10 veces su volumen en 0,1mM de  $\text{CaCl}_2$  frío. A continuación, se adicionó el mismo volumen de una solución de solubilización concentrada 2X (40mM Tris, 2% Tritón X-100 a pH 6,0) y se incubó por 30 minutos en hielo con agitación suave. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas por 30 minutos a 40000 g con un rotor SW41 a 4°C, el pellet obtenido correspondió a las uniones sinápticas, en cambio, el sobrenadante a las proteínas extra-sinápticas. En seguida, el pellet se lavó con 20mM Tris, 1% Tritón X-100 a pH 6,0, se

re-suspendió en 500  $\mu$ l de 20 mM de Tris, 1% Tritón X-100 a pH 8.0 y se incubó por 30 minutos a 4<sup>0</sup>C con agitación constante. En el paso siguiente, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 33500 rpm en un rotor TL 100.1 y a 4<sup>0</sup>C con el cual se obtuvo un pellet pequeño (las densidades post-sinápticas) y un sobrenadante que contenía las proteínas pre-sinápticas. El paso anterior fue repetido 2 veces más con el fin de lograr una mejor separación. Finalmente el pellet que contenía las proteínas post-sinápticas se re-suspendió en 50 $\mu$ l de buffer de carga SDS. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo a través del método de Bradford. Se utilizaron anticuerpos contra sinaptofisina y PSD-95, para verificar el enriquecimiento en las fracciones pre y postsinápticas, respectivamente.

#### **Extracción de proteínas**

Los extractos totales de proteínas procedentes del tejido cerebral y de cultivos celulares se obtuvieron mediante la homogenización en buffer de lisis constituido por 50 mM HEPES, pH 7.4, 10mM, EDTA 0,1mM NaCl 0.1 % Tritón X-100, inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml aprotinina, 10  $\mu$ g/ml pepstatina, 10  $\mu$ g/ml leupeptina) e inhibidores de fosfatasas (10mM NaF, 1mM  $Na_3VO_4$ , 1mM ácido okadaico). Posteriormente los extractos fueron homogeneizados y centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos a 4<sup>0</sup>C. Finalmente la concentración de proteínas en las muestras se determinó mediante el método de Bradford

#### **Electroforesis (Western blot)**

A los extractos de proteínas obtenidos según el protocolo anterior se les añadió buffer de carga de electroforesis (250 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 10% glicerol, 2%  $\beta$ -mercaptoetanol, y 0.0006% azul de bromofenol) y las muestras se hirvieron por 5 minutos a 95<sup>0</sup>C. Posteriormente las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida de distintos porcentajes, según el peso molecular de las proteínas primarias de interés, en presencia de SDS (se cargaron entre 5-25  $\mu$ g de proteína total por pocillo). Luego las proteínas separadas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, en el caso de proteínas pequeñas

(15 a 40 Kda) se utilizaron membranas de PVDF y para comprobar la eficiencia de la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau. A continuación se bloquearon con leche descremada al 5% (p/v) en PBS-0.1% Tween-20 (v/v), durante 45 minutos y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario diluido en medio de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después fueron lavadas durante cinco minutos 5 veces consecutivas con PBS-0.1% Tween-20. Para la inmunodetección, las membranas se incubaron por 60 minutos con los anticuerpos secundarios respectivos acoplados a peroxidasa (HRP), diluidos en medio de bloqueo (1/2000). Finalmente las membranas fueron lavadas cinco veces durante 5 minutos con PBS-0.1% Tween-20 y las proteínas inmunoreactivas fueron visualizadas utilizando el sistema ECL de Amersham. La cuantificación de las proteínas se realizó utilizando el densitómetro GS-710 de Bio-Rad. Los valores de densitometría obtenidos con estos anticuerpos en el rango lineal de detección, se normalizaron con respecto a los valores obtenidos con el anticuerpo anti- $\beta$ -actina o la proteína total (dependiendo de cada caso) para corregir cualquier desviación en las cantidades de proteínas cargadas.

### **Ensayos de inmunoprecipitación**

Tanto las cortezas e hipocampos de ratones wt y MAP1B (-/-) embrionarios o adultos como las células Cos-7 transfectadas con los plasmidios de interés se homogeneizaron en buffer de inmunoprecipitación frío (50mM Tris, 50mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 0,2mM Ortovanadato de Sodio; 0,2mM PMSF; 2  $\mu$ g/ml aprotinina; 2 $\mu$ M leupeptina; 1  $\mu$ g/ml pepstatina; 0,5% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, pH 9.) El homogeneizado se centrifugó a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C. Posteriormente el sobrenadante, el cual es considerado como el lisado total, se cuantificó y 500  $\mu$ g de él se incubaron con 5  $\mu$ g de anticuerpo específico para cada caso, en un volumen final de 1ml. Esta mezcla se incubó toda la noche con agitación constante a 4°C. Luego se agregaron 30 $\mu$ l de una solución de proteína A-

Sepharosa 50% (Amersham) y se dejó en agitación constante por 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo los inmunocomplejos se recuperaron por centrifugación a 16000g por 15 minutos, una vez que el precipitado se recuperó, se lavó 4 veces con buffer de inmunoprecipitación y se resuspendió en 30µl de buffer de carga 2X. Finalmente las proteínas se separaron por geles de SDS-PAGE y caracterizadas por *Western Blot*.

### **Ensayo de actividad de Rho-GTPasas**

El ensayo de actividad de la Rac1 se llevó a cabo como se describe en (Waterman-Storer et al, 1999). Brevemente, los cultivos de neuronas hipocampales de 1 DIV fueron lisados a 4°C en buffer de lisis (50mM tris; 150 mM NaCl; 1% Tritón y 0,5% deoxicolato, pH 7,2). La proteína Rac1 y cdc42 unida a GTP se precipitó de los lisados obtenidos a 4°C mediante perlas de glutatión-sefarosa que llevaban acoplado la región conocida como CRIB(Cdc42/Rac1 Interactive Binding) o p21 Binding Domain (PBD) de la proteína efectora de Rac1, p21 activated kinase 1 (PAK). Se ha visto que esta región es capaz de unirse de manera específica a la forma activa de Rac1 o cdc42, es decir, unidos a GTP. Las proteínas unidas a las perlas de sefarosa fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% y detectadas mediante anticuerpos contra Rac1 y cdc42 respectivamente. Los ensayos de pull down y western blot para la RhoA-GTP se llevaron a cabo como lo descrito para Rac1, pero usando perlas de sefarosa que poseían un dominio de unión de la proteína efectora de Rho, rotekina. El dominio de unión reconocía específicamente a la forma activa de RhoA. Tanto RhoA total como la unida a GTP fueron detectadas con un anticuerpo anti-RhoA (RhoA activation assay, Biochem kit Cytoskeleton).

## Experimentos de electrofisiología

Para los experimentos de electrofisiología se cultivaron neuronas de hipocampo de ratones WT y MAP1B (-/-) en cristales de vidrio de 10mm de diámetro tratados con poli-L-lisina y se mantuvieron por 21 días, en co-cultivo con astrocitos.

El día del registro los cristales con las neuronas se transfirieron a una cámara de registro de un microscopio invertido y se perfundieron con una solución extracelular (ACSF) compuesta por: 119mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11mM glucosa, 26mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,3mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>, a una osmolaridad de 290 mosmoles/Kg. Las soluciones extracelulares fueron burbujeadas con 95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> y se aplicaron al baño mediante un sistema de perfusión por gravedad.

Se utilizó la técnica de *patch-clamp* descrita por (Hamill, 1981) usando la configuración de *whole-cell* con parche perforado (Falke, 1989). Las micropipetas empleadas se fabricaron a partir de capilares de borosilicato de 1.5 mm y 0.86 mm de diámetro externo e interno respectivamente (Sutter Instruments) mediante un estirador de pipetas horizontal P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA) con una resistencia de entre 4 y 6 MΩ. En el baño se utilizó un electrodo de Ag/AgCl y la solución interna que se introdujo en la pipeta, y que estuvo en contacto con el electrodo, contenía 120 mM metanosulfonato de cesio, 10 mM HEPES, 2.0mM MgCl<sub>2</sub>, 8mM NaCl, 2mM ATP, 0.3 mM GTP, 12,75 mM fosfocreatina de sodio y 0.2 mM EGTA, a un pH de 7.25. La osmolaridad fue ajustada a 290 miliosmoles

Las corrientes macroscópicas se registraron mediante un amplificador Axopatch 1-B (Axon Instruments, Inc) y filtrados a 2 KHz. La adquisición de datos y el control de los parámetros utilizados se realizaron con el software SCAN (Strathclyde Software, courtesy Dr.J.Dempster). El análisis de datos se llevó a cabo con el software pCLAMP (Molecular Devices).

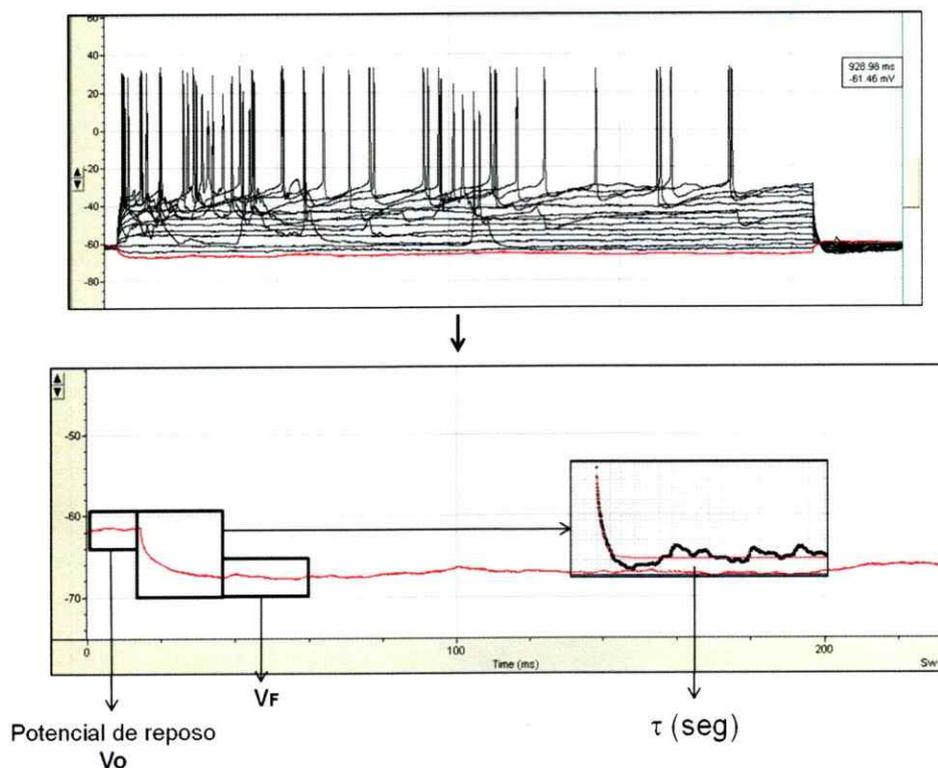
### Determinación de las propiedades pasivas y activas de las células

Los registros se realizaron a una temperatura de 29°C, en las condiciones explicadas anteriormente. Para la determinación de las propiedades pasivas y activas se aplicaron pulsos sucesivos de corriente hiperpolarizantes o despolarizantes, de 20 msec de duración, desde -50 pA y en incrementos de 50 pA. Se registró el potencial de membrana en modo *current-clamp* (se fija la corriente) (Fig E). El potencial de reposo se midió en la condición de corriente total cero

La resistencia de la célula se calculó a partir de la diferencia de voltaje presente antes y después de la inyección de corriente hiperpolarizante, dividido por la intensidad de corriente inyectada (-50 pA), siguiendo la ley de Ohm (voltaje=intensidad x resistencia). La capacitancia, propiedad pasiva de la célula de almacenar cargas, se calculó a partir de la fórmula siguiente:

$$\tau \text{ (seg)} = \text{Capacitancia (F)} \times \text{Resistencia } (\Omega)$$

Donde *tau* es el tiempo necesario para que el voltaje decaiga el 37% de su valor inicial (Seg: segundos; F: faradays;  $\Omega$ : ohms)

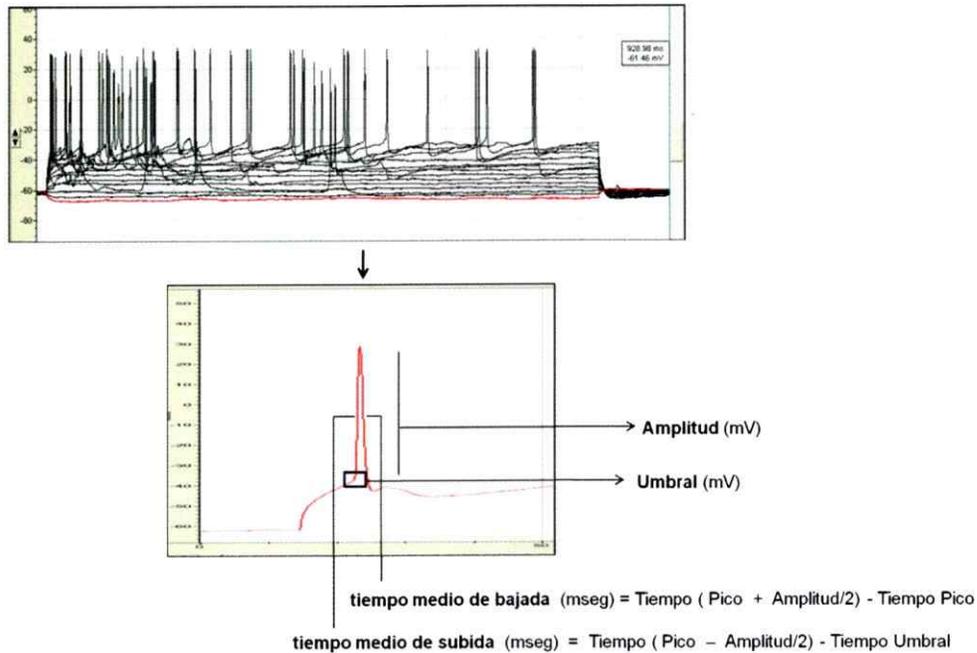


**Resistencia ( $\Omega$ ) =  $(V_o - V_F) (V) /$  Intensidad de corriente inyectada (A)**

**Capacitancia (F) =  $t$  (seg) / Resistencia ( $\Omega$ )**

**Figura E. Ejemplo de los registros obtenidos y cálculos de las propiedades pasivas de la neurona.** Se realizaron inyecciones de corriente de amplitud creciente y se midió la respuesta (voltaje) en la modalidad de *current-clamp*. A partir de estos registros se calculó el potencial de reposo, la resistencia y la capacitancia de células silvestres y deficientes en MAP1B.

Las propiedades de los potenciales de acción se calcularon a partir de los registros anteriores. Se tomó el primer potencial de acción que descargó la neurona durante las inyecciones de corriente y se calcularon parámetros como el umbral, la amplitud, el tiempo medio de subida (“*half rise time*”) y el tiempo medio de bajada (“*half decay time*”) (Figura F).



**Figura F. Ejemplo de los registros obtenidos y cálculos de las propiedades de los potenciales de acción.** Se realizaron inyecciones crecientes de corriente y se midió la respuesta en la modalidad de *current-clamp*. A partir de estos registros se calculó el umbral, la amplitud, el tiempo medio de subida y el tiempo medio de bajada de potenciales de acción generados por neuronas silvestres y deficientes en MAP1B.

El umbral se consideró como el valor de potencial de membrana en el cual la neurona comienza a descargar el potencial de acción. La amplitud es el valor del potencial desde el umbral hasta que el potencial de acción alcanza el valor máximo. El tiempo medio de subida es el tiempo que pasa desde que empieza el potencial de acción hasta que éste alcanza la mitad del valor de su amplitud. El tiempo medio de bajada es el tiempo que transcurre desde que el potencial ha alcanzado su pico máximo hasta que llega a la mitad del valor de su amplitud. A partir de estos mismos registros se calculó el número de potenciales de acción que descargaban las neuronas durante inyecciones de corriente de 50pA en un tiempo de 200 mseg de duración También se calculó el número de potenciales de acción espontáneos que descarga la célula, registrados en la modalidad de *current-clamp*, (0 pA)

### **Registros de mEPSC (corrientes post-sinápticas excitatorias en miniatura)**

Para estos experimentos se hicieron registros a  $-60\text{mV}$  de célula completa en la modalidad “*voltage-clamp*” (se fija el voltaje y se mide la corriente) de neuronas hipocámpales de 21 DIV. Las mediciones de las corrientes se llevaron a cabo en presencia de  $100\mu\text{M}$  APV (ácido DL-2 amino-5 fosfopentanoico –Sigma), antagonista del receptor de NMDA, de esta manera las mini-corrientes que se miden son las que dependen de los receptores AMPA, y  $1\mu\text{M}$  de tetrodotoxina, inhibidor de los canales de sodio, para evitar los potenciales de acción espontáneos. El día del registro los cristales con las neuronas se transfirieron a una cámara de registro de un microscopio invertido y se perfundieron con una solución extracelular (ACSF) compuesta por:  $119\text{mM}$  NaCl,  $2,5\text{mM}$  KCl,  $2,5\text{mM}$  de  $\text{CaCl}_2$ ,  $1,3\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2,6\text{mM}$   $\text{NaHCO}_3$ ,  $1\text{mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $11\text{mM}$  glucosa,  $0,1\text{mM}$  de picrotoxina (inhibidor de los receptores GABA-A) (pH 7,4). Las soluciones extracelulares fueron burbujeadas con 95%  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$  y se aplicaron al baño mediante un sistema de perfusión por gravedad. Las pipetas de *patch-clamp* utilizadas ( $4-6\text{M}\Omega$ ) contenían una solución interna de  $115\text{mM}$  de metanosulfato de cesio,  $20\text{mM}$  de CsCl,  $10\text{mM}$  HEPES,  $2,5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $4\text{mM}$   $\text{Na}_2\text{ATP}$ ,  $0,4\text{mM}$   $\text{Na}_3\text{GTP}$ ,  $10\text{mM}$  de fosfocretina de sodio y  $0,6\text{mM}$  EGTA (pH 7,25). Las corrientes fueron adquiridas y analizadas con el programa pClamp (Molecular Devices).

### **Ensayo de Doble Híbrido.**

El fragmento de cDNA que codifica para la cadena liviana de la MAP1B”LC1” se clonó en el vector pGBKT7 en el mismo marco de lectura con el dominio de unión a ADN de GAL4 (Clontech). Este plasmidio que contenía la proteína “cebo” fue introducido en la cepa de levadura AH109. Posteriormente esta cepa de levadura se hizo crecer con la cepa Y187, que contenía una librería genómica de cerebro de ratón adulto “presa” de 2 meses de edad, construida en el vector pGDAT7 y que poseía el dominio de activación de GAL4(Clontech).

A continuación las levaduras fueron sembradas en placas SD agar deficientes en triptófano, leucina, adenina y histidina. Los clones que resultaron positivos fueron aquellos que crecieron en las placas y que además dieron positivos a la reacción de la  $\beta$ -galactosidasa. Todos los clones que resultaron positivos fueron secuenciados y caracterizados usando la base de datos BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) Finalmente para confirmar la positividad de los clones, se co-transformaron en levaduras AH109, las cuales poseían el plasmidio con el cebo "LC1", con el vector que contenía el cDNA de la proteína identificada como posible interactor y se sembraron en placas SD-agar carentes de los 4 aminoácidos mencionados anteriormente. Los clones que crecieron y fueron positivos a la reacción de la  $\beta$ -galactosidasa, se seleccionaron para los experimentos posteriores.

#### **Ensayo de Liberación de vesículas sinápticas.**

Para estos experimentos, las neuronas hipocámpales de ratón de 16 DIV fueron sacadas del incubador, lavadas 1 vez con una solución Tyrode modificada (2mM  $\text{CaCl}_2$ ; 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 119mM NaCl, 2,5 mM KCl, 30% glucosa y 25mM de Hepes/NaOH a pH 7.4 en presencia de 50 $\mu$ M de APV (antagonista del receptor NMDA) y 10 $\mu$ M de CNQX (antagonista receptor AMPA/kainato) y posteriormente se incubaron en oscuridad durante 30 segundos con 10 $\mu$ M de la sonda FM4-64 (Molecular Probes) seguida de una despolarización con 30mM KCl por 1 minuto. La tinción inespecífica y la no-sináptica de la sonda FM4-64 fue disminuida por el lavado con solución Tyrode 1 ml/min durante 10 minutos. La cámara cerrada que contenía las neuronas, se montó sobre una platina motorizada acoplada a un microscopio confocal LSM 510 META. A continuación, se adquirieron imágenes de las neuronas con un objetivo de inmersión en agua de 63X 1.4 AN usando una resolución de 512 X512 píxeles y excitando las neuronas con laser de 543nm. La señal fluorescente fue recolectada sobre los 685nm. Posteriormente, se adquirió una línea base durante 1 minuto, tiempo después del cual

las neuronas se despolarizaron con 90mM de KCl y se fotografiaron por 300 segundos a intervalos de 2 segundos. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25°C.

#### **Recuento de botones sinápticos activos.**

Para estos análisis las neuronas hipocampales de 16 DIV se incubaron con 10  $\mu$ M de la sonda FM4-64 (Molecular Probes) seguida de una despolarización con 30mM KCl por 1 minuto. La tinción inespecífica y la no-sináptica de la sonda FM4-64 fue disminuida por el lavado con solución Tyrode 1 ml/min durante 10 minutos. Posteriormente, se contó el número de botones sinápticos que se marcaron con la sonda por 10 micras de longitud del axón.

#### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se llevó a cabo con los programas SPSS 15.0 y STATA10. Los datos se han representado como los valores medios  $\pm$  S.E.M. Primero se analizó si los datos se ajustaban a una distribución normal, realizando la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov. En el caso de muestras que seguían una distribución normal, se realizó una prueba t de Student, para comparar dos grupos de datos, y una ANOVA de una vía, seguida de un test post hoc de Bonferroni, para comparar tres o más grupos de datos. En el caso de distribuciones no normales de los datos se aplicó una prueba U de Mann-Withney para determinar la significancia estadística. El nivel de significancia mínimo aceptado ha sido  $p < 0,05$  (\*)  $p < 0.01$  (\*\*).

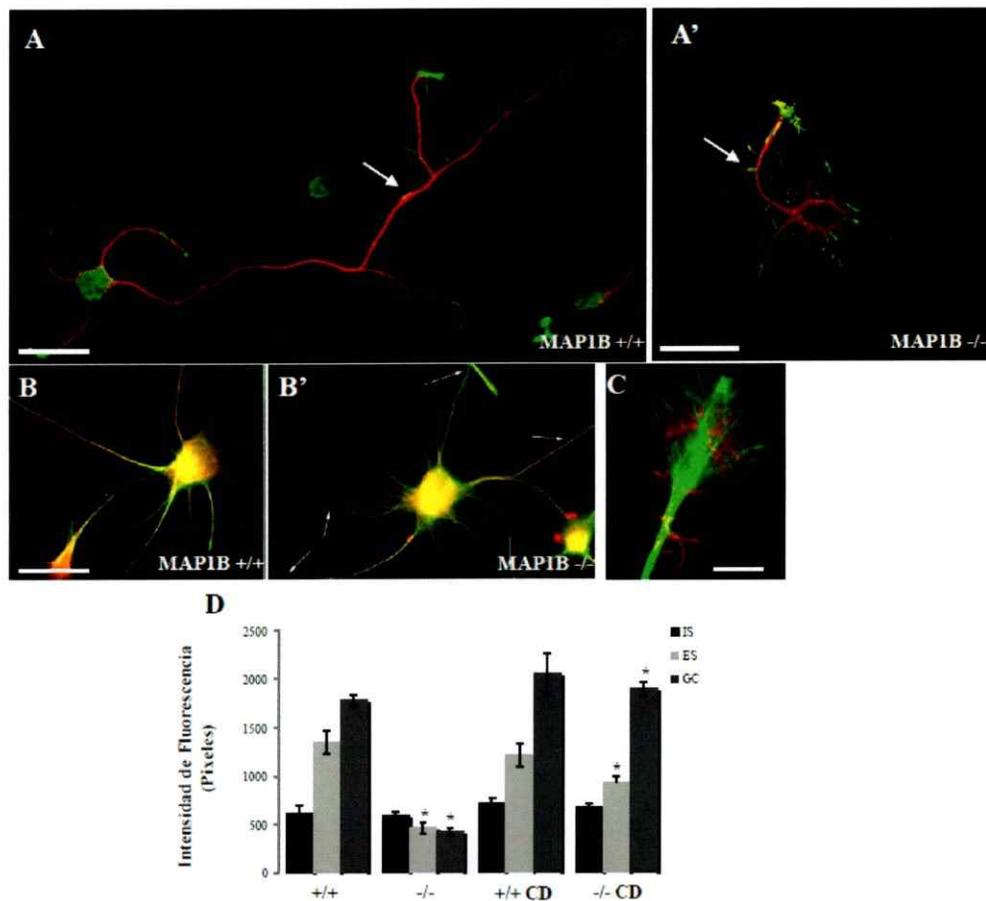
## RESULTADOS

### 1- La disminución en la expresión de MAP1B produce cambios en el remodelamiento del citoesqueleto de actina que impactan sobre la elongación del axón.

Reportes previos de nuestro laboratorio habían demostrado que neuronas hipocampales piramidales provenientes del ratón hipomorfo para MAP1B de 2 días de incubación *in vitro* (DIV) poseían un retraso en el desarrollo axonal. Adicionalmente estas neuronas presentaban numerosas extensiones cortas tipo filopodios y numerosas estructuras tipo cono de crecimiento alrededor del cuerpo celular y a lo largo de las neuritas (Fig 1A'). Esto nos llevó a pensar que la organización del citoesqueleto de actina se encontraba afectada en las neuronas deficientes en MAP1B. Estudios anteriores habían señalado que la MAP1B, además de interactuar con microtúbulos para estabilizarlos, interactuaba también a través de su cadena pesada (HC) y liviana (LC1) con filamentos de actina (Pedrotti et al., 1996). Además, trabajos previos habían demostrado que MAP1B podía unirse a varias proteínas por lo cual tendría funciones de proteína de andamiaje (Riederer et al, 2007). Por lo tanto, para determinar si el retraso en la elongación del axón visto en las neuronas deficientes en MAP1B estaba relacionado con una falla del alto dinamismo del citoesqueleto de actina, necesaria para regular la invasión y ensamblaje de microtúbulos y posterior crecimiento del axón, decidimos analizar la respuesta de las neuronas MAP1B (-/-) al tratamiento con citochalasina D, un inhibidor de la polimerización de actina. Lo que observamos fue que las neuronas WT tratadas por 3 horas y en presencia de 0,5µg/ml del inhibidor extendían múltiples neuritas largas tipo axón (Fig 1B) como había sido previamente descrito (Bradke and Dotti, 1999). Sorprendentemente, observamos el mismo fenómeno en las neuronas MAP1B (-/-) (Fig 1B'). En estas neuronas, a pesar de la ausencia de MAP1B, el tratamiento con citochalasina permitió la elongación de los axones. Más aún, esta elongación axonal inducida por la citochalasina D se acompañó con la presencia de microtúbulos tirosinados

(más dinámicos), que invadieron aquellas áreas desprovistas de filamentos de actina, como el cono de crecimiento (Fig 1C).

Esta observación fue ratificada al realizar la cuantificación de fluorescencia, que indicó un aumento de tubulina tirosinada en los conos de crecimiento de las neuronas MAP1B (-/-) tratadas con citochalasina D (Fig 1D). Por lo tanto, la deficiencia en MAP1B podría inducir cambios en la dinámica de actina, y este comportamiento diferencial sería responsable de la deficiencia en la elongación axonal. El hecho de que la pérdida de función de MAP1B pudiese ser revertida con drogas que modifican la capacidad dinámica de ensamblar filamentos de actina, sugiere que la pérdida de función de MAP1B impactaría directa o indirectamente mecanismos involucrados en el ensamblaje de los filamentos de actina.

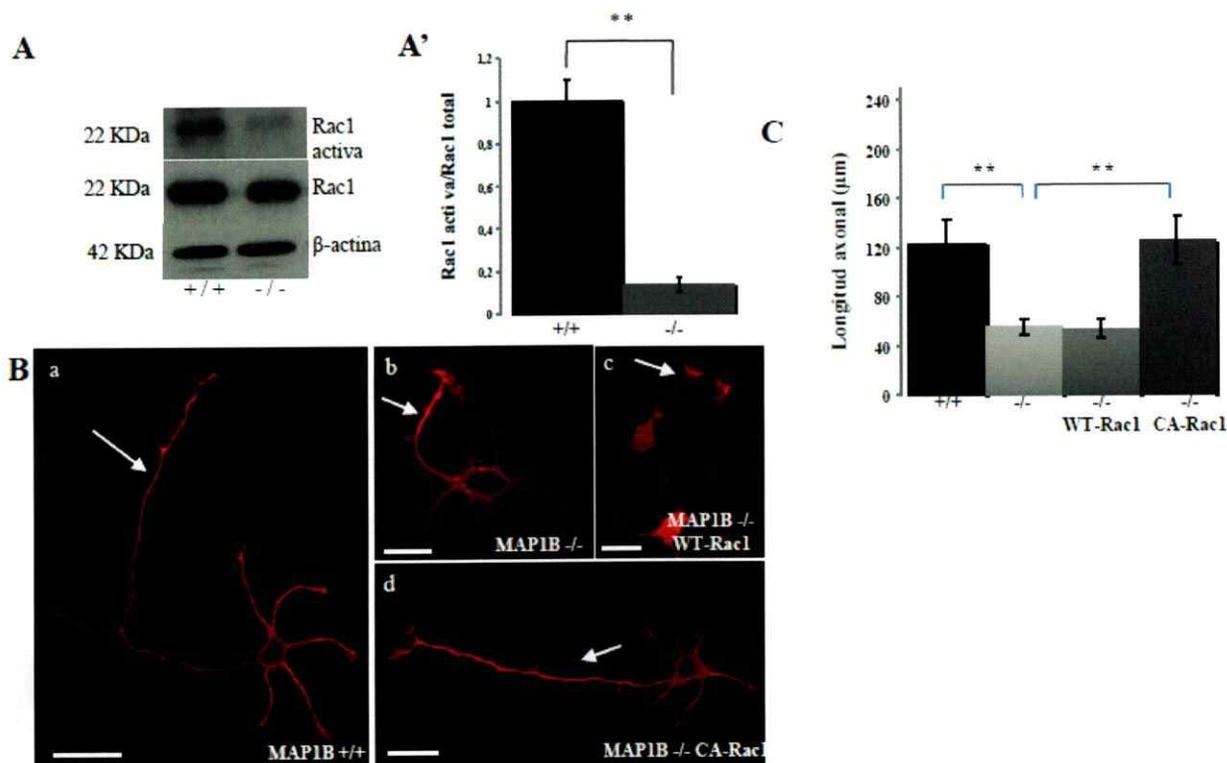


**Figura 1. Citocalasina D restaura la cinética de la elongación axonal y promueve el ensamblaje de microtúbulos en las neuronas MAP1B (-/-).** (A y A') Son imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas WT y MAP1B (-/-), respectivamente, teñidas con  $\alpha$ -tubulina (rojo) y rodamina-faloidina (verde). Nótese que las neuronas WT son capaces de extender un único axón en condiciones normales, mientras que las hipomorfas no. Sin embargo, ambas WT y MAP1B (-/-) fueron capaces de extender varias neuritas tipo axón en respuesta a 0,5 $\mu$ g/ml de citocalasina D (B y B'). (C) Imagen de la morfología del cono de crecimiento de una neurona MAP1B (-/-) en presencia de citocalasina D. La tinción en verde corresponde a tubulina-tirosinada y en rojo a F-actina. El tratamiento induce la penetración de microtúbulos tirosinados en áreas desprovistas de filamentos de actina. Como se puede apreciar en la imagen, los microtúbulos alcanzan el borde exterior de la punta de la neurita (D) Mediciones de cuantificación de fluorescencia de tubulina tirosinada en preparaciones citoesqueléticas de neuronas controles y tratadas con citocalasina D. Las mediciones se llevaron a cabo en el segmento inicial (IS), segmento externo (ES) y en el cono de crecimiento de los axones de células WT o en la neurita más larga de las neuronas MAP1B (-/-) no tratadas. En el caso de las neuronas tratadas, las mediciones se realizaron en todas las neuritas de longitud mayor a 80 $\mu$ m. Se analizaron un total de 50 células por cada condición experimental. Barra: 10 $\mu$ m.\*  $p < 0.05$  (prueba t-student).

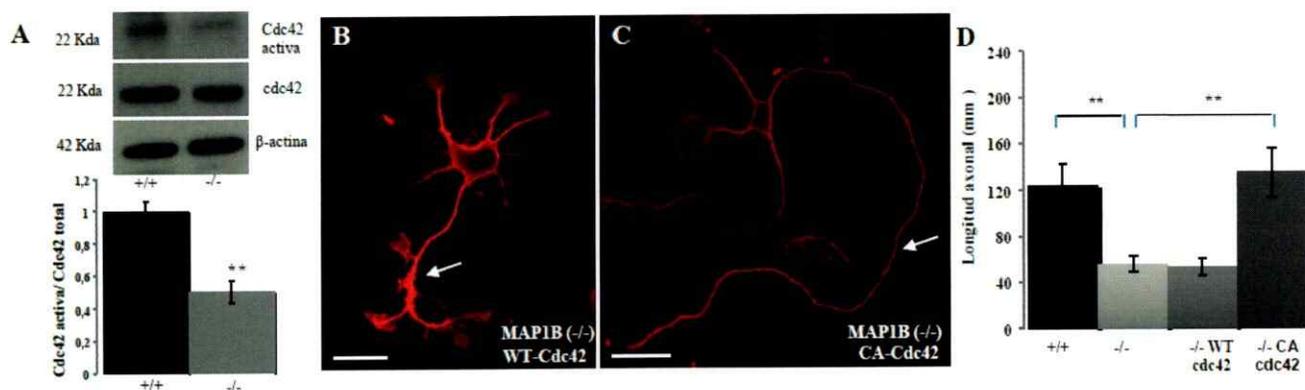
### **La deficiencia de MAP1B modifica la actividad de las RhoGTPasas Rac1 y cdc42.**

El paso siguiente que quisimos abarcar fue determinar si las actividades de las RhoGTPasas "Rac1 y cdc42", moléculas claves en la regulación de los remodelamientos de actina, podrían estar alteradas en las neuronas deficientes en MAP1B. Rac1 y cdc42 son moléculas cuya función está relacionada a la expansión/protrusión de lamelopodios y filopodios, respectivamente (Bishop y Hall, 2000) y son necesarias para la extensión, elongación y ramificación axonal (Liqun Luo., 2000; Ng et al., 2002). Estas proteínas actúan como interruptores moleculares que ciclan entre una forma activa unida a GTP y un estado inactivo unido a GDP. Para determinar si MAP1B está involucrada en la regulación de la actividad de Rac1, se midió la cantidad de Rac1 unida a GTP en cultivos de neuronas hipocampales provenientes tanto de animales WT como hipomorfos para MAP1B de 1 DIV. Para medir la actividad de Rac1 se llevaron a cabo ensayos de *pull down* usando una proteína de fusión a glutatión-S-transferasa (GST) que contiene el dominio de unión a p21 (residuos 67-150) de la proteína efectora de Rac1, la quinasa activada por p21 (PAK1) y que se une con gran afinidad a Rac1-GTP pero no a Rac1-GDP. Lo que observamos fue que los extractos celulares de ratones deficientes en MAP1B poseen una reducción del 90% de la actividad de Rac1, en comparación con los animales WT (Fig 2A y A'). Adicionalmente, experimentos de sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de Rac1 (CA-Rac1) en las neuronas MAP1B (-/-) revirtieron el fenotipo de axones más cortos, ya que las células aún en ausencia de MAP1B, fueron capaces de extender un axón de longitud comparable a las neuronas WT (Fig 2B (b-d)-C). En cambio, la sobre-expresión de la forma "wild type" de Rac1 (WT-Rac1) en células deficientes en MAP1B no produjo ningún efecto en la recuperación de la extensión del axón (Fig 2B (b-c) y 2C). La activación de Rac1 en neuronas requiere de la activación de cdc42 (Nishimura et al., 2005), por lo tanto analizamos también si la actividad de cdc42 estaba disminuida en las neuronas MAP1B (-/-). Lo que observamos fue una disminución del 50% en la actividad de cdc42 en las muestras MAP1B (-/-), en comparación con las silvestres (Fig 3A panel de arriba y abajo). También determinamos que la sobre-

expresión de la forma constitutivamente activa de cdc42 (CA-cdc42) en neuronas deficientes en MAP1B fue suficiente para revertir el fenotipo de axones con menor longitud en los animales hipomorfos (Fig 3C, D), mientras que la sobre-expresión de la forma silvestre (WT-cdc42) no mostró cambios significativos (Figuras 3B, D) en comparación con las neuronas control.



**Figura 2. La deficiencia de MAP1B disminuye la actividad de Rac1.** (A) Western Blot que muestra que los extractos proteicos provenientes de cultivos de neuronas hipocampales de un animal WT posee una mayor cantidad de Rac1-GTP, en comparación, a las obtenidas del animal *hipomorfo*. Como controles de carga se usaron Rac1 total y  $\beta$ -actina (A') Los análisis cuantitativos confirman que la disminución en la actividad de la Rac1 en neuronas MAP1B (-/-) es estadísticamente significativa (\*\*  $p \leq 0,01$ ;  $n=8$ ) (B) Imagen de microscopía confocal de una neurona hipocampal MAP1B (+/+) teñida con  $\alpha$ -tubulina, nótese que la célula exhibe un único axón largo (flecha) (a). (b) Muestra la morfología de una neurona hipocampal MAP1B (-/-), la cual presenta una corta neurita tipo axón y que está teñida con la misma tinción que en (a). El fenotipo de corta neurita tipo axón se asemeja a lo que se observa en las neuronas MAP1B (-/-) transfectadas con WT- Rac1(c). (d) Imagen de microscopía confocal de una célula deficiente en MAP1B transfectada con la forma constitutivamente activa de Rac1 y fijada después de 24 horas de plaqueo. Las células fueron teñidas con un anticuerpo contra c-myc. Barra: 10 $\mu$ m. (C) Análisis cuantitativo, en el cual se observa que las células MAP1B (-/-) transfectadas con CA-Rac1 extienden axones con longitudes similares a las neuronas WT (\*\*  $p \leq 0,01$ ;  $n= 60$  células por condición). La significancia estadística se calculó mediante t-student.

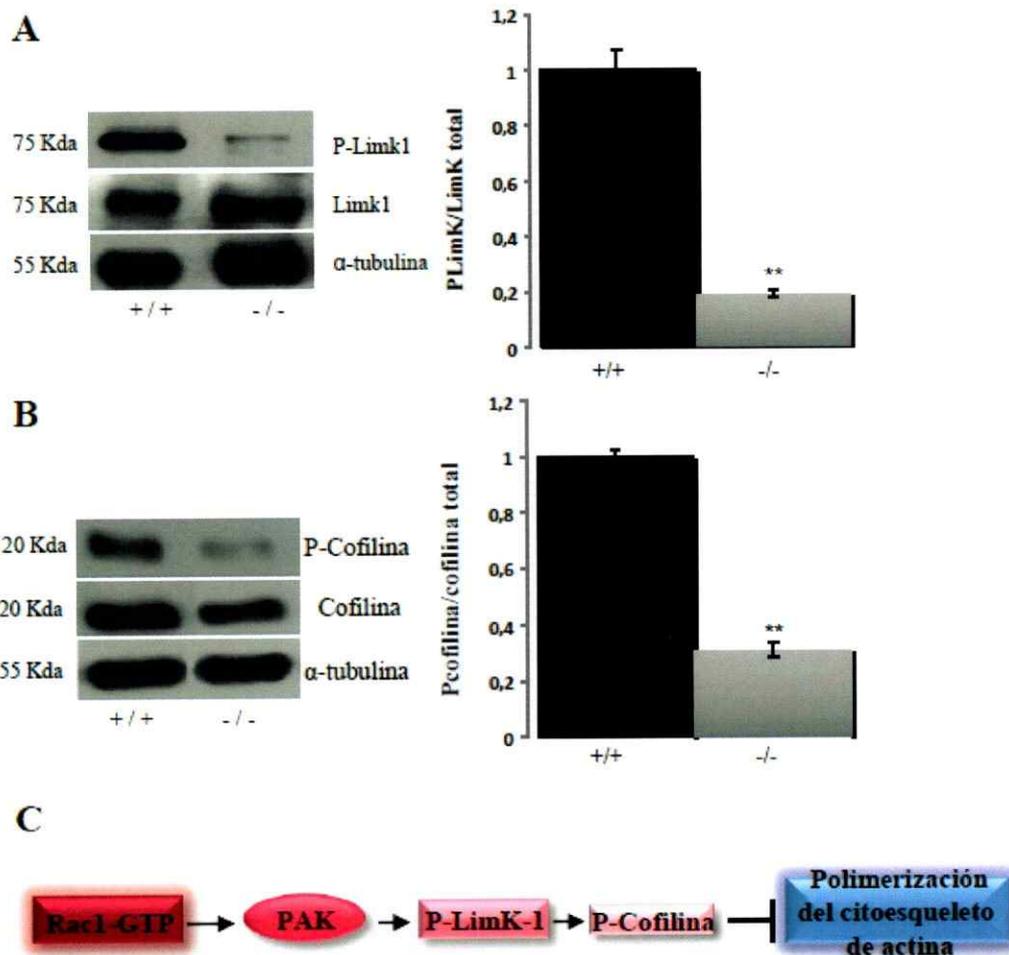


**Figura 3. Las neuronas MAP1B (-/-) muestran una reducción en la actividad de cdc42.** (A panel de arriba y abajo) Western Blot y análisis cuantitativo, que señalan que los extractos de neuronas en cultivo obtenidas de animales WT contienen un 50% más cdc42-GTP, en comparación con los animales hipomorfos (\*\*  $p \leq 0,01$ ,  $n=8$ ).  $\beta$ -actina y cdc42 total se usaron como controles de carga. (B) Morfología de una célula deficiente en MAP1B transfectada con WT-cdc42-myc, fijada a las 24 horas de plaqueo y teñida con un anticuerpo anti c-myc. Nótese que la célula presenta una neurita corta tipo axón (flecha) similar a lo visto en las neuronas MAP1B (-/-). (C) Imagen de microscopía confocal de una neurona MAP1B (-/-) transfectada con la forma constitutivamente activa de cdc42 (CA-cdc42) y teñida como en B. La célula presenta una larga neurita tipo axón (flecha) Barra: 10  $\mu$ m. (D) Análisis cuantitativo que indica que las neuronas deficientes en MAP1B y transfectadas con CA-cdc42 poseen axones de longitud similar a las neuronas WT. \*\* $p \leq 0,01$ ;  $n=60$  células por condición). La significancia estadística se calculó mediante la prueba t-student.

**Las neuronas MAP1B (-/-) poseen una disminución en la cantidad de P-LIMK1 y P-cofilina.**

La vía de señalización canónica de Rac1 y cdc42 en neuronas y otros sistemas celulares incluye la activación de moléculas efectoras que se encuentran río debajo de Rac1. Entre estas, quisimos estudiar la activación de LIMK-1 y cofilina. LIMK-1, es una serina/treonina quinasa que se activa río abajo de Rac1-GTP. Se activa por la fosforilación en un residuo de treonina dentro del loop de activación por la quinasa activada por p21 (PAK1), la cual es una quinasa que pertenece a la familia de quinasas activadas por p-21 y son efectores directos de Rac1 y cdc42 (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998). Una vez que LIMK-1 está fosforilada y por lo tanto activa, fosforila e inactiva a la proteína cofilina, un factor dinamizante de la polimerización de actina (Yang et al., 1998; Fig 4C).

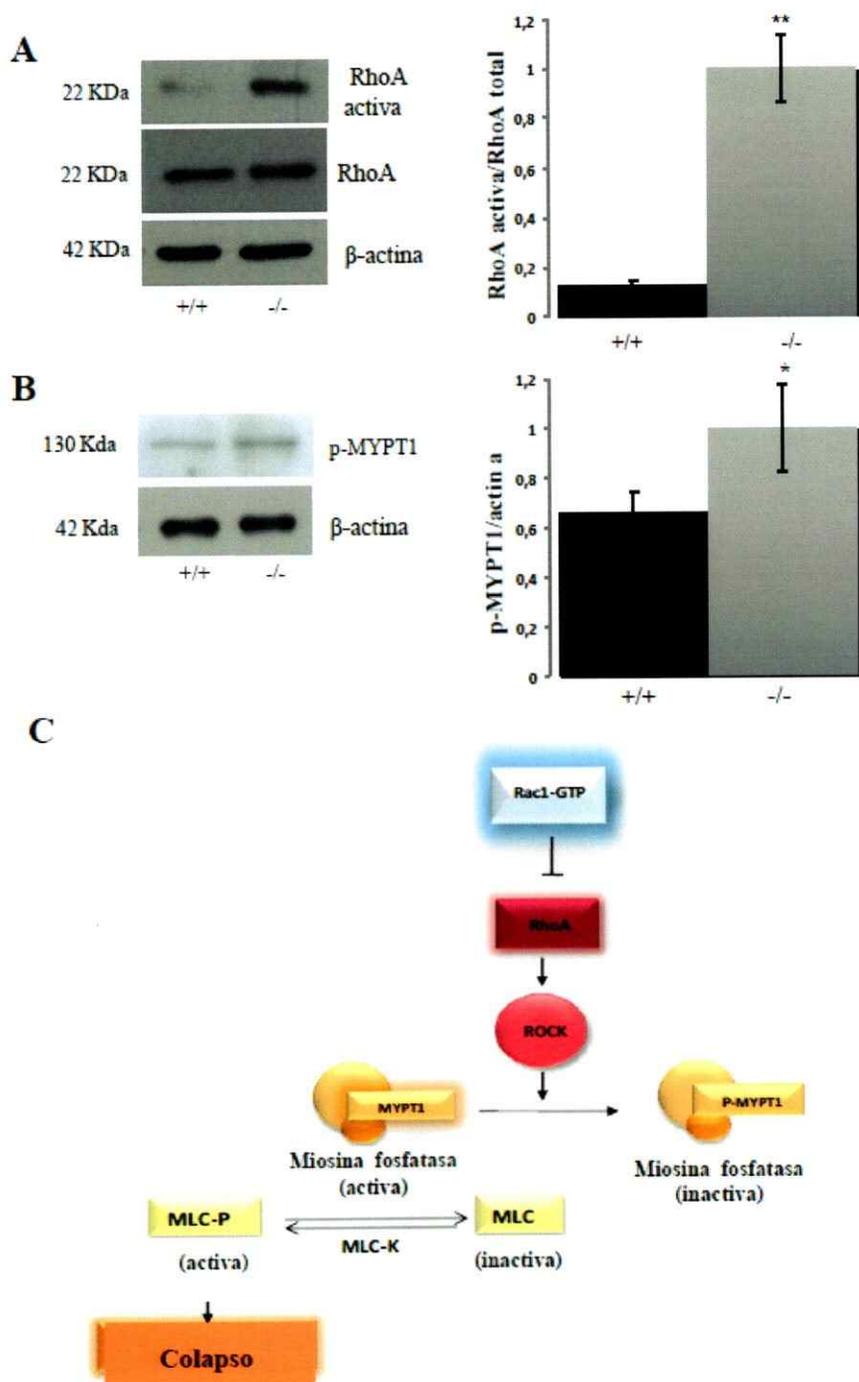
Las transiciones entre las formas fosforiladas y desfosforiladas de cofilina son responsables de los cambios en el contenido de los microfilamentos de actina (Bamburg y Bray, 1987; Bamburg 1999; Sarmiere y Bamburg, 2004). Al analizar los extractos proteicos provenientes de neuronas hipocampales MAP1B (-/-) observamos una disminución en la cantidad de LIMK-1 fosforilada (Fig 4A) y de cofilina fosforilada, al compararlas con las muestras WT (Fig 4B). Estos resultados refuerzan la hipótesis que la pérdida de función de MAP1B, lleva a una disminución en la actividad de Rac1 y subsecuentemente afecta la cascada de señalización que controla la polimerización de actina.



**Figura 4. La deficiencia de MAP1B induce cambios en la fosforilación de LIMK-1 y cofilina.** (A) Western blot que muestra la disminución en los niveles de P-LIMK-1 en extractos de cultivos primarios de neuronas MAP1B (-/-), en comparación a las muestras silvestres (B) Western Blot que señala que las muestras de animales hipomorfos poseen menor cantidad de cofilina fosforilada, en comparación con las WT (\*  $p \leq 0,01$ ,  $n=8$ , prueba t-student) (C) Esquema que muestra los efectores río abajo de Rac1 (Montenegro-Venegas et al., 2010).

**La deficiencia de MAP1B produce un aumento en la actividad de RhoA.**

La familia de las GTPasas monoméricas está dividida en 3 grandes subfamilias: Rac1, cdc42 y RhoA. Y se ha sugerido que la activación de Rac1 podría dar lugar a una disminución de la actividad de RhoA y viceversa (Da Silva et al., 2003; Ik Tsen Heng et al., 2009). RhoA es una GTPasa cuya función ha sido relacionada con la inducción del colapso neurítico (Bishop & Hall, 2000) y por lo tanto quisimos probar si la disminución en la actividad de Rac1 vista en las neuronas MAP1B (-/-) podría dar lugar a un aumento de la actividad de RhoA. Lo que observamos fue que los extractos proteicos de neuronas deficientes en MAP1B presentaron un aumento del 80% en la actividad de RhoA, en comparación con las neuronas WT (Fig 5A izquierda y derecha). La vía de señalización canónica río abajo de RhoA incluye la activación de la serina/treonina quinasa dependiente de Rho, RhoK (Maekawa et al., 1999). Por lo tanto, analizamos los efectos que podría tener la ausencia de MAP1B sobre la fosforilación de MYPT1, sustrato específico de la Rho quinasa (RhoK). Consistente con lo mencionado anteriormente, las neuronas MAP1B (-/-) mostraron un aumento en la cantidad de MYPT1 fosforilada. MYPT1 corresponde a la subunidad de la miosina fosfatasa que se une a miosina (Fig 5B izquierda y derecha). La miosina fosfatasa regula la interacción entre actina y miosina río abajo de vía de señalización de RhoA (Fig 5C), la que inhibe a la miosina fosfatasa a través de la activación de la RhoK. Esta inhibición causa finalmente el acortamiento del axón y el colapso del cono de crecimiento, como lo que se observa en las neuronas deficientes en MAP1B.

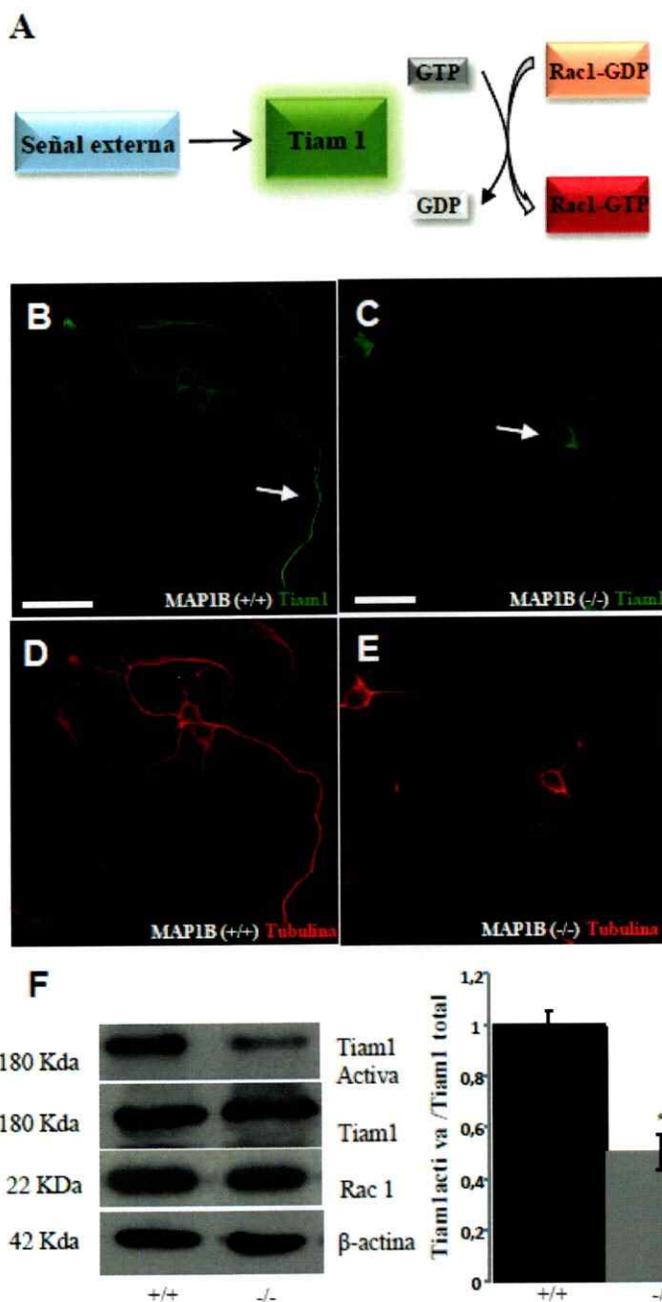


**Figura 5. Las neuronas MAP1B (-/-) muestran un aumento en la actividad de RhoA.** (A) Western Blot que indica que los extractos de neuronas hipocámpicas de hipomorfos (-/-) presentan una cantidad considerablemente mayor de RhoA-GTP, en comparación con las muestras del animal MAP1B (+/+).  $\beta$ -actina y RhoA total se usaron como controles de carga. Los análisis cuantitativos confirman que el aumento en las muestras del hipomorfo es estadísticamente significativo (\*\*  $p < 0.01$ ; prueba t,  $n=8$ ) (B) Western blot que muestra un aumento en la cantidad de p-MYPT1 en los extractos de neuronas MAP1B (-/-). Los análisis cuantitativos indican que esta diferencia es estadísticamente significativa (\*  $p \leq 0,05$ ,  $n=8$ ) (C) Esquema de la vía de señalización de RhoA en la cual MYPT1 está involucrado (Montenegro-Venegas et al., 2010)

**La deficiencia de MAP1B produce una disminución en la interacción de Tiam1 y Rac1.**

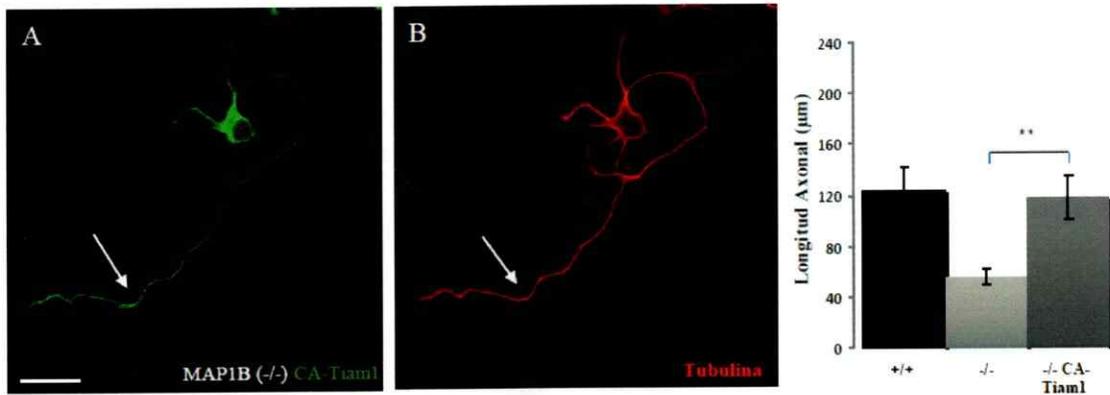
Como vimos que la deficiencia de MAP1B estaba asociada con una disminución en la actividad de Rac1, buscamos el posible mecanismo molecular implicado en esta inactivación. La proteína Tiam1 funciona como un intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) específico para Rac1, estimulando así su actividad (Fig 6A). La actividad de Rac1 no solo depende de la función de Tiam1, ya que se han descrito otras GEFs que contribuyen en polaridad neuronal (Watabe-Uchida et al., 2006) pero nosotros nos centramos en Tiam1 por varias razones: 1) Tiam1 tiene altos niveles de expresión en el cerebro en desarrollo, 2) existe un alto grado de correlación entre su expresión y el desarrollo morfológico del axón, 3) los niveles de la proteína Tiam1 alcanzan un *peak* justo a las 24 horas de cultivo, tiempo al cual comienza la formación del axón, 4) los estudios de inmunofluorescencia muestran que en las neuronas en estadio 3, Tiam1 se localiza preferentemente en el *shaft* axonal y en los conos de crecimiento y finalmente, el punto más relevante es que Tiam1 en cerebro se comporta como proteína asociada a microtúbulos, interaccionando con microtúbulos dinámicos del cono de crecimiento axonal y promoviendo de esta manera la formación del axón en neuronas hipocampales en cultivo (Kunda et al., 2001). Este punto la hace un candidato atrayente para interaccionar con proteínas asociadas a microtúbulos tal como la MAP1B. Por lo tanto, lo primero que hicimos fue estudiar la distribución subcelular de Tiam1 tanto en neuronas silvestres como hipomorfas para la MAP1B. Lo que observamos fue que en las neuronas WT, Tiam1 se encontraba principalmente en la parte distal del axón incluyendo el cono de crecimiento (Fig 6B), en cambio, en las neuronas MAP1B (-/-), se produjo un cambio en la localización sub-celular de Tiam1, y la tinción se localizó fundamentalmente en el soma (Fig 6C). Además, observamos que en los ensayos de *pull down*, la cantidad de Tiam1 unida a Rac1-GTP en las neuronas hipomorfas para MAP1B disminuyó en un 70% en comparación con las WT (Fig 6F). Este cambio no fue dependiente de los niveles de expresión de Tiam1, ya que los niveles de Tiam1 y Rac1 totales en los

lisados de células hipocampales fueron similares entre los 2 genotipos. (Fig 6F). Junto con esto, vimos que al sobre-expresar en las neuronas deficientes de MAP1B, la forma constitutivamente activa de Tiam1, que se localiza en la membrana plasmática (CA-Tiam1, clone C119; Kunda et al., 2001), éstas fueron capaces de extender el axón (Fig 7A) en forma similar a las neuronas silvestres



**Figura 6. La deficiencia de MAP1B altera la distribución de Tiam1 y su unión a Rac1.**

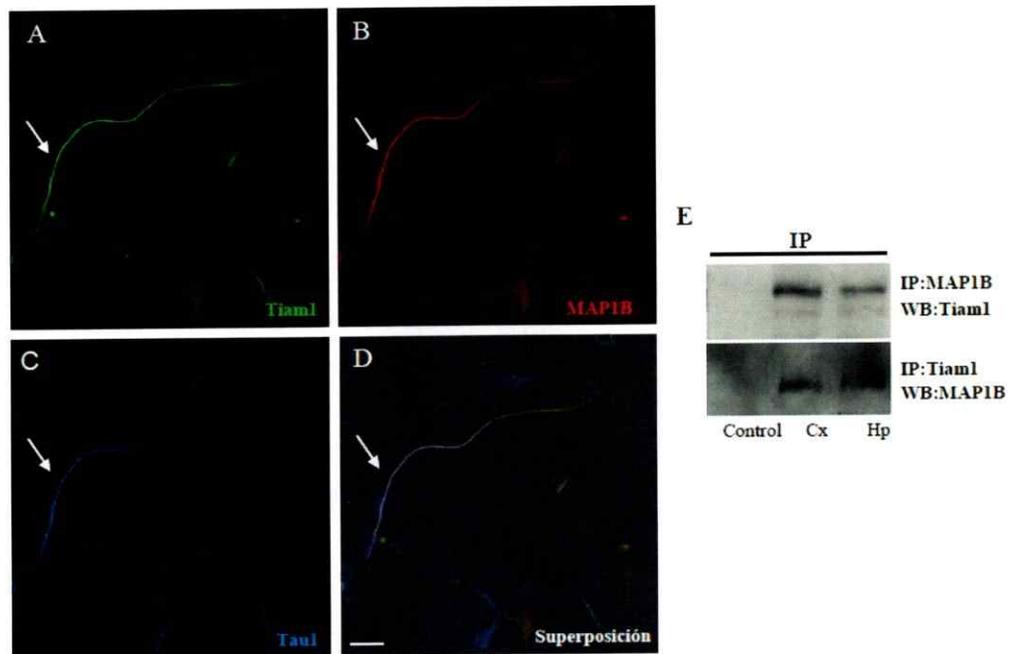
(A) Esquema que muestra como una señal externa activa a Tiam1, la cual facilita el intercambio de GDP por GTP para activar a Rac1 (B y C) Imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas hipocámpales WT y deficientes en MAP1B. Las células se tiñeron con un anticuerpo anti Tiam1 (verde). Nótese que la distribución de Tiam1 en las neuronas WT fue predominantemente en el axón y poco en soma. En contraste, la distribución en las neuronas MAP1B (-/-) fue principalmente en soma. Barra: 10 $\mu$ m (D y E) Imágenes de fluorescencia que muestran la morfología de células MAP1B (+/+) y MAP1B (-/-), respectivamente, teñidas con  $\alpha$ -tubulina. F) Disminución en la interacción de Tiam1-Rac1 en los ensayos de *pull down* usando los sobrenadantes de las neuronas deficientes en MAP1B. Estos cambios no se debieron a cambios en la expresión de Tiam1 o Rac1. Los análisis cuantitativos confirman que la disminución es estadísticamente significativa (\*\*  $p \leq 0.01$ ,  $n=5$ , prueba t-student)



**Figura 7. La sobre-expresión de Tiam1 puede rescatar la cinética de elongación axonal en neuronas MAP1B (-/-).** (A y B) Fotografías de microscopía confocal de las neuronas deficientes en MAP1B transfectadas con CA-Tiam1, la variante constitutivamente activa y que activa eficientemente a Rac1. Las neuronas transfectadas se tiñeron con un anticuerpo anti Tiam1 (izquierda) y anti  $\alpha$ -tubulina (derecha). Note que la célula desarrolló una larga y única neurita tipo axón (flecha en cada panel) Barra: 10 $\mu\text{m}$  (C) Los análisis cuantitativos indican que las neuronas deficientes en MAP1B transfectadas con CA-Tiam1 presentaron axones de longitud similar a las neuronas WT (\*\*  $p \leq 0,01$ ,  $n=60$  células por condición, prueba t-student).

**Tiam1 interacciona con MAP1B.**

Finalmente decidimos probar si la pérdida de localización de Tiam1 en las neuronas deficientes en MAP1B, podría estar asociada a una posible interacción entre ambas proteínas. Esta interacción podría explicar el retraso en la elongación del axón en las neuronas carentes de MAP1B como una consecuencia de la disminución de la actividad de las Rho-GTPasas Rac1 y cdc42. En los estudios de colocalización realizados con anticuerpos anti MAP1B y Tiam1 se observó que Tiam1 colocaliza con MAP1B principalmente en los axones de las neuronas en desarrollo (Fig 8, A-D). Estos resultados fueron confirmados en ensayos de co-inmunoprecipitación, en los cuales se observó que el anticuerpo contra MAP1B fue capaz de co-inmunoprecipitar Tiam1. Más aún, la co-inmunoprecipitación recíproca confirmó la interacción entre las proteínas (Fig 8E). Estos resultados sugieren fuertemente que MAP1B se une a Tiam1 y juega un rol en la regulación de la actividad de Rac1, y de esta forma contribuye a inducir la elongación axonal.



**Figura 8 Tiam1 interacciona con MAP1B (A-D)** Imágenes de microscopía confocal de una neurona WT teñida con anticuerpos contra: Tiam1 (verde **A**); MAP1B (rojo, **B**) y Taul (azul, **C**) (**D**) Imagen combinada de las fotografías de A-C. Note que estas proteínas co-localizan principalmente en el axón (flecha en cada panel). Barra: 10 $\mu$ m. (**E**) Co-inmunoprecipitación (IP) de Tiam1 y MAP1B desde extractos proteicos obtenidos desde corteza (Cx) y hipocampo (Hp) de ratones en estadio P0. Se usaron anticuerpos contra Tiam1 y MAP1B para visualizar las proteínas en los Western Blot.

## 2. MAP1B se localiza en espinas dendríticas y regula su número y morfología.

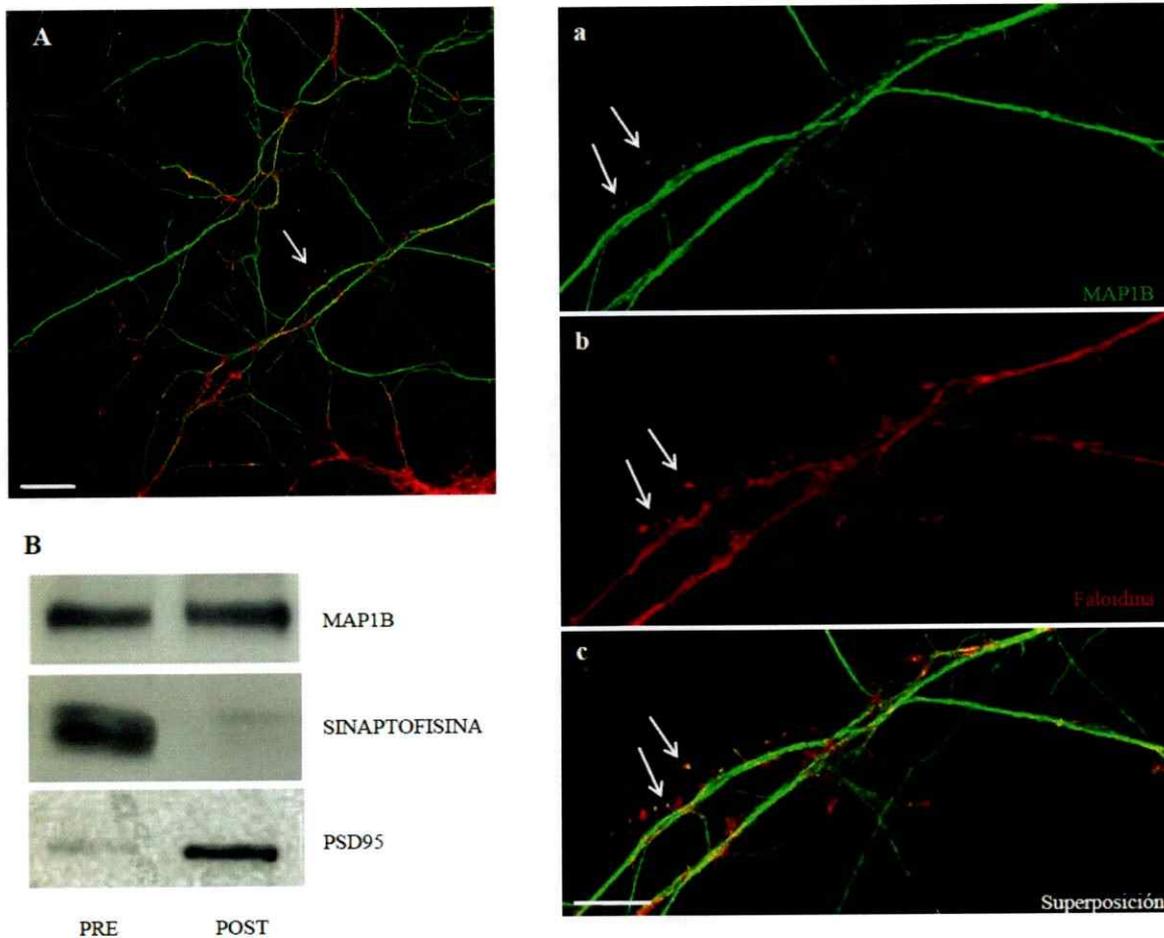
Los resultados de la sección anterior demostraron que MAP1B tenía una nueva función, relacionada con el control de la polimerización de los filamentos de actina. Se demostró que esta función contribuía a explicar el fenotipo neuronal del mutante hipomorfo, caracterizado por la presencia de axones más cortos. La explicación molecular que surgió de los estudios en neuronas en desarrollo, nos hizo pensar que mecanismos moleculares de la misma naturaleza podrían estar regulando funciones importantes en neuronas maduras. Teniendo en cuenta lo planteado en la introducción: a) MAP1B puede interaccionar con filamentos de actina, b) presencia de microtúbulos dinámicos en las espinas dendríticas de neuronas maduras c) MAP1B mantiene elevada su expresión en cerebro adulto en áreas de alta actividad y plasticidad sináptica y d) que aún se sabe muy poco acerca de la función de MAP1B en estadios adultos, decidimos hacer un estudio en neuronas maduras, y más específicamente en estructuras especializadas que regulan la neurotransmisión, tales como las espinas dendríticas.

Por lo tanto, lo primero que quisimos evaluar, fue si la disminución en la expresión de MAP1B podría tener un efecto en la morfogénesis de las espinas dendríticas, derivadas de neuronas hipocampales cultivadas por largo tiempo. Es importante señalar que este tipo de experimento no fue posible de realizar con los ratones hipomorfos adultos, ya que presentan letalidad postnatal temprana. Por lo tanto, para llevar a cabo estos análisis, realizamos co-cultivos de neuronas embrionarias derivadas de los animales WT ó mutantes sobre una monocapa de astrocitos WT, para obtener neuronas maduras y aisladas. El primer análisis, fue estudiar en detalle la distribución subcelular de MAP1B en las dendritas maduras. Para ello, neuronas hipocampales de 21 DIV crecidas en co-cultivo con astrocitos WT fueron teñidas con un anticuerpo contra MAP1B total (N19) y faloidina (F-actina). Aunque la tinción de MAP1B se localizó predominantemente en el *shaft* dendrítico, ocasionalmente encontramos estructuras inmunopositivas para MAP1B en una pequeña fracción de

protrusiones (flecha Fig 9A), que se tiñeron también con Faloidina (Fig 9A, a-c). Estas estructuras, por morfología y morfometría podrían ser espinas dendríticas. Esta fracción fue medida y representa un 1%. Este valor es consistente, con los estudios que muestran que el porcentaje de invasión de los microtúbulos en las protrusiones dendríticas de cultivos fijados es de alrededor de un 1%-4% en condiciones basales (Hu et al., 2008; Jaworski et al., 2009). Por lo tanto estos estudios de colocalización de estructuras positivas para actina polimerizada y MAP1B sugirieron que una parte de las espinas dendríticas podrían contener a la proteína MAP1B.

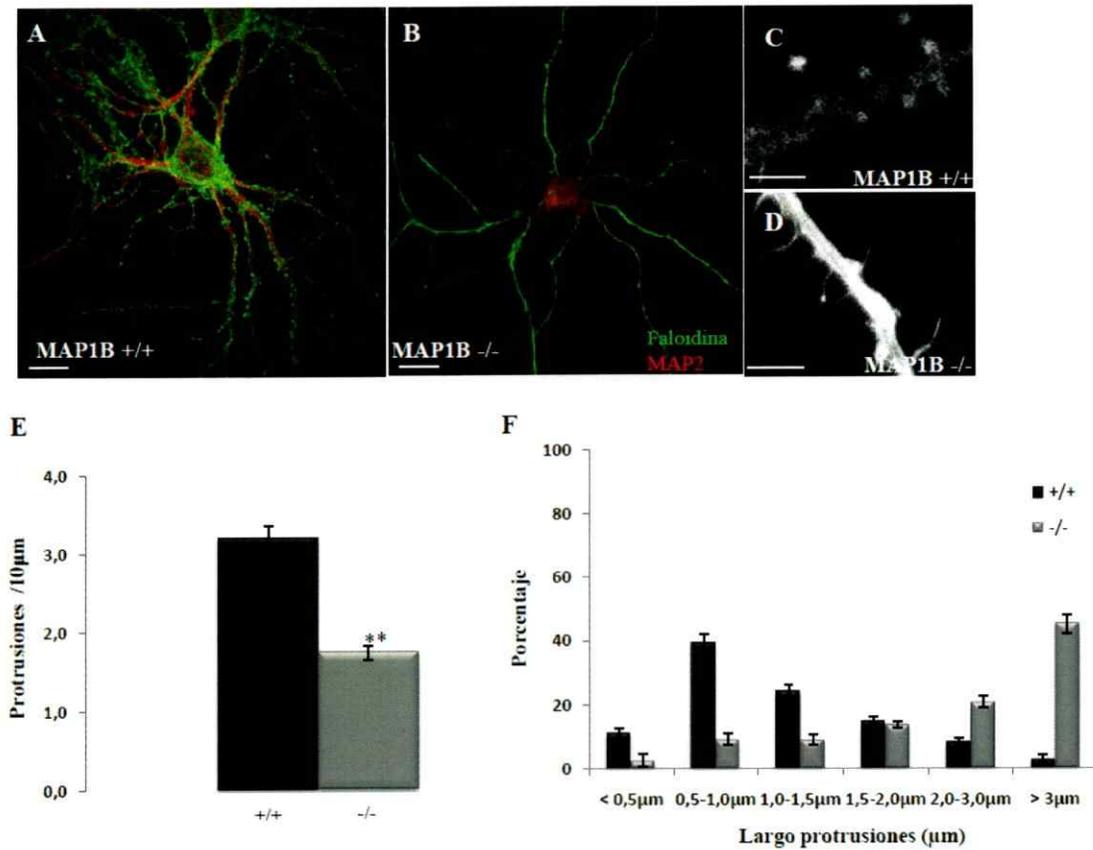
En el siguiente set de experimentos, quisimos estudiar si la MAP1B podría estar presente en compartimientos post-sinápticos, que diesen cuenta de su localización en las espinas dendríticas. Para eso, preparamos fracciones sinaptosomales de origen pre y post-sináptico de ratones adultos de 2 meses de edad (Fig 9C). Observamos que MAP1B se distribuye equitativamente en la fracciones pre- y post-sinápticas. El enriquecimiento de sinaptofisina en la fracción pre-sináptica y de PSD95 en la fracción post-sináptica, respectivamente, confirma que la separación de ambos compartimientos fue exitosa. Estos resultados son consistentes con reportes previos en donde estudios estructurales muestran la presencia de MAP1B en la fracción post-sináptica (Kawakami et al., 2003). El paso siguiente fue analizar la morfología y número de espinas dendríticas presentes en los cultivos de las neuronas WT e hipomorfas. Para ello, las neuronas hipocampales se tiñeron con el anticuerpo contra MAP2 (marcador dendrítico) y faloidina (marcador de protrusiones dendríticas) (Fig 10, A-D). Los análisis cuantitativos de número y longitud de protrusiones dendríticas indicaron que las neuronas hipomorfas poseían una disminución estadísticamente significativa en el número de protrusiones (Fig 10 E) y que la mayor parte de ellas presentó una longitud mucho mayor en comparación con las neuronas silvestres. Éstas corresponden a protrusiones con un largo mayor a  $2\mu\text{m}$ , y de acuerdo a los parámetros morfométricos, serían catalogados como filopodios (Fig 10 F). Con el fin de poder clasificar los distintos tipos de protrusiones

presentes en las dendritas de estas neuronas, realizamos reconstrucciones en 3D. En estas reconstrucciones detectamos que las protrusiones de las neuronas control tienen una morfología predominantemente de espinas maduras tipo “*mushroom*” (cabeza grande y cuello pequeño) (Fig 11A, C, E). En cambio, la mayoría de las protrusiones de las neuronas MAP1B (-/-) fueron del tipo filopodios, caracterizadas como finas protrusiones largas sin una cabeza distinguible (11B, D, E), y que corresponderían a espinas dendríticas inmaduras. Estos resultados se correlacionan con las mediciones de longitud de espinas mencionadas anteriormente.

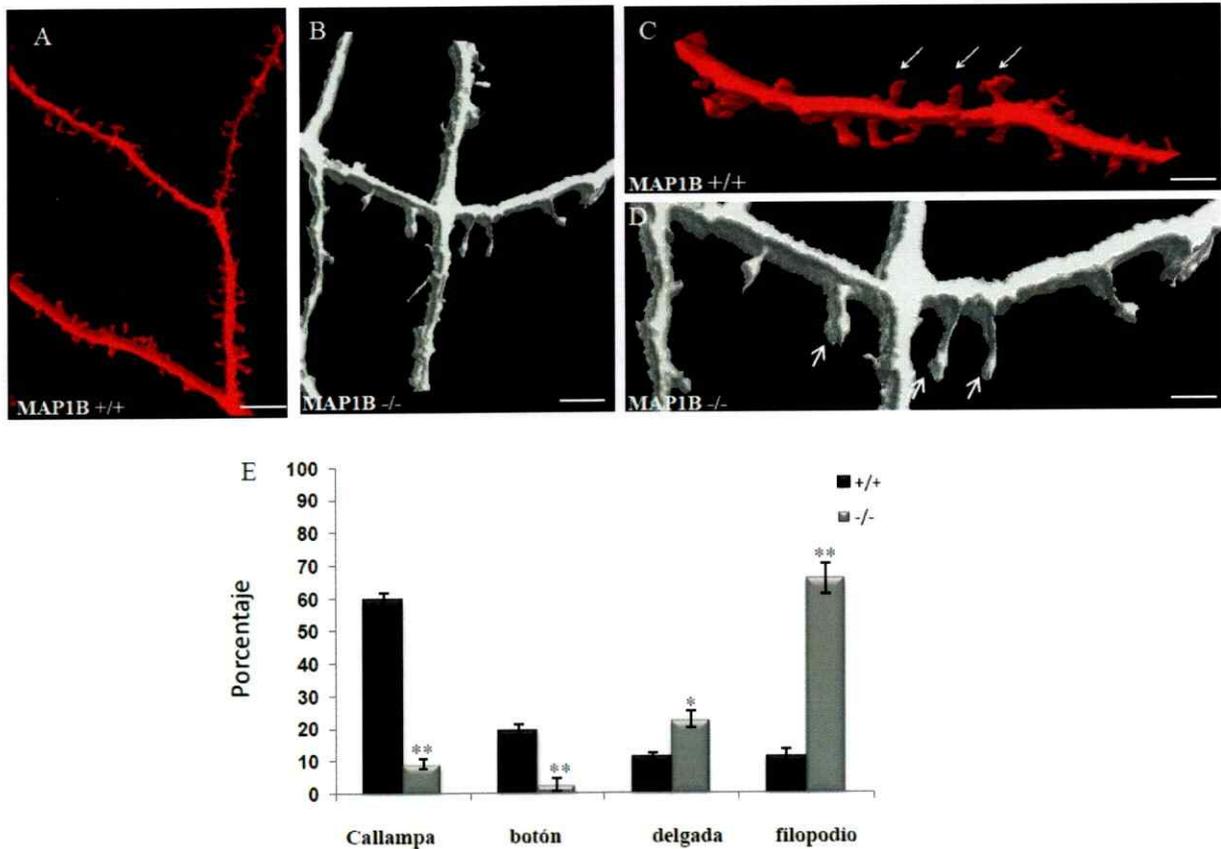


**Figura 9. La MAP1B está presente en las espinas dendríticas y compartimentos post-sinápticos**

(A) Imágenes de microscopía confocal de neuronas hipocámpales de 21 DIV teñidas con falodina (verde) (A.a) y MAP1B total (rojo) (A.b). Se puede apreciar la presencia de MAP1B en algunas espinas dendríticas (flechas), las cuales co-localizan con falodina en la cabeza de las espinas (A.c) Barra: 20 $\mu$ m (A y B), 2 $\mu$ m (a,b,c) espinas B. Western blot que muestra la presencia de MAP1B en la fracción sinaptosomal de un ratón WT adulto (panel superior) Se usaron sinaptofisina y PSD-95 como marcadores de las fracciones pre y post sinápticas, para confirmar el enriquecimiento de estas proteínas en sus compartimentos respectivos (n=3)



**Figura 10. Las neuronas MAP1B (-/-) presentan una disminución en el número de las espinas dendríticas. (A-B)** Imágenes de microscopía confocal de neuronas hipocampales de 21 DIV MAP1B (+/+) (A) y MAP1B (-/-) (B) teñidas con faloidina (verde) y MAP2 (rojo). Barra (20 µm) **C-D.** Ampliaciones para mostrar con mayor detalle que las neuronas WT tienen espinas maduras con una cabeza definida(C), en cambio, las neuronas hipomorfas muestran largas y finas protrusiones tipo filopodios (D) Barra: 2µm. **E** Análisis cuantitativos que indican que las neuronas MAP1B (-/-) exhiben una disminución en la densidad de protrusiones dendríticas (\*\* $p \leq 0,01$ , t-student,  $n=30$  neuronas) **(F)** Análisis cuantitativo del largo de las protrusiones en las neuronas WT e hipomorfas.

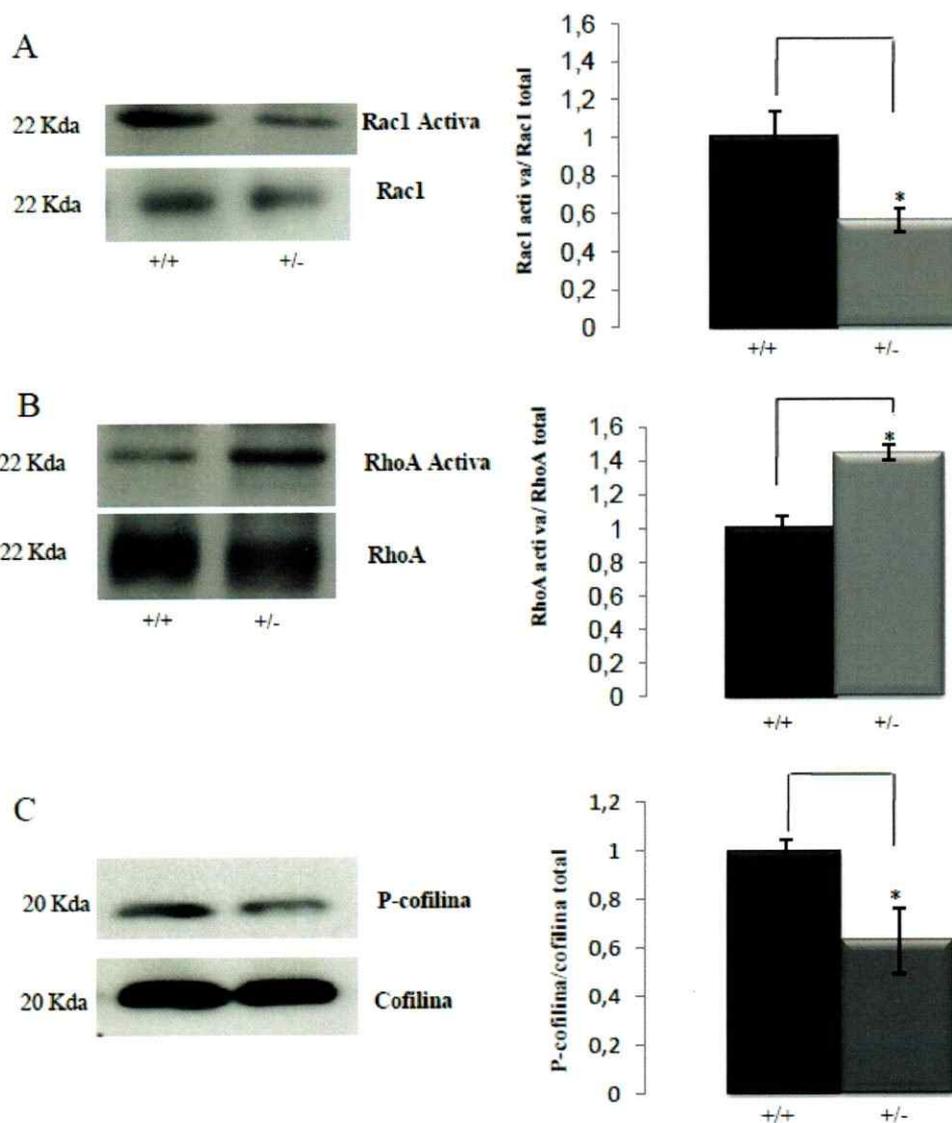


**Figura 11. Reconstrucción en 3D de las espinas dendríticas de neuronas de 21 DIV(A-D).** Imágenes deconvolucionadas de microscopía confocal de neuronas MAP1B (+/+) (A) y MAP1B (-/-). (B) Barra: 5 $\mu$ m. Nótese que las dendritas de las neuronas silvestres poseen diferentes tipos de espinas: *callampas*, las cuales representan la población de espinas maduras (flechas en C), en cambio, las neuronas del animal MAP1B (-/-) mostraron predominantemente protrusiones largas sin una cabeza distinguible “filopodios” (flechas en D) Barra: 2 $\mu$ m. E) Gráfico que muestra el porcentaje de los diferentes tipos de espinas que se encontraron tanto en las dendritas de las neuronas WT como MAP1B(-/-) (\*\* $p \leq 0,01$ ; (\* $p \leq 0,05$ ; Test de Bonferroni)

**La deficiencia de MAP1B produce una disminución en la actividad de Rac1, un aumento en la actividad de RhoA y una disminución de cofilina fosforilada en los compartimentos post-sinápticos.**

Para analizar si el mecanismo molecular por el cual la MAP1B podría tener alguna función en la regulación de la morfogénesis de espinas dendríticas, podría relacionarse con aquel descrito para la participación de MAP1B en el control de la polimerización de actina, y subsecuente efecto en la elongación axonal, medimos la actividad de las Rho-GTPasas en fracciones subcelulares ricas en densidades post-sinápticas de ratones adultos. Estos experimentos se fundamentaron en 1) Nuestra observación previa que demostraba que las neuronas hipocampales de 1DIV del ratón hipomorfo para MAP1B poseían una disminución en la actividad de Rac1 y cdc42 y un aumento en la actividad de RhoA (Montenegro-Venegas et al., 2010) y 2) reportes previos que han demostrado que las Rho-GTPasas son importantes para regular las propiedades dinámicas del citoesqueleto que regulan la plasticidad estructural de las sinapsis excitatorias (Tashiro et al., 2000; Tashiro and Yuste., 2008). Particularmente Rac1 y RhoA son conocidas como moléculas clave en la regulación y dinámica de las espinas dendríticas. Para probar, si la disminución de MAP1B alteraba los niveles y/o la actividad de Rac1 y RhoA en los compartimientos post-sinápticos, medimos la cantidad de Rac1 activa en las fracciones enriquecidas de membranas post-sinápticas tanto de los animales WT como heterocigotos para MAP1B (recordar que los animales homocigotos para la mutación presentan letalidad postnatal temprana). Se encontró que, las muestras provenientes de los animales MAP1B (+/-) presentaban un 40% menos de Rac1 activo, en comparación con las WT (Fig 12A). Por el contrario, al analizar la actividad de RhoA observamos que estaba aumentada en un 45% en las muestras MAP1B (+/-) (Fig 12 B). Estos cambios no se debieron a modificaciones en la expresión de Rac1 y RhoA, debido a que sus niveles totales fueron similares en los ratones WT y heterocigoto para MAP1B. Estos resultados están de acuerdo con trabajos de la literatura que señalan que una forma dominante negativa de Rac1 causa una reducción en la densidad de las espinas dendríticas en

neuronas hipocampales de ratón, junto con una mayor longitud de las espinas y menor desarrollo de la cabeza de éstas (Nakayama et al., 2000; Pilpel y Segal 2004.; Tashiro et al., 2000). Por el contrario, RhoA posee un efecto negativo sobre la formación y mantención de las espinas dendríticas, ya que el uso de la forma constitutivamente activa causa una disminución en la densidad de espinas (Tashiro et al., 2000). El paso siguiente, fue investigar si la actividad de las moléculas que están río abajo de la señalización de Rac1, por ejemplo cofilina, podrían encontrarse alteradas en las muestras de los animales MAP1B (+/-). La cofilina es una molécula que se une a la F-actina y controla el recambio de las subunidades en el polímero, ya que incrementa la despolimerización en los extremos del filamento y fragmenta los filamentos largos en trozos más pequeños. Al ser fosforilada por la proteína quinasa LIMK-1, se inactiva (Gungabissoon y Bamberg, 2003). Esta proteína se encuentra enriquecida en sitios asociados con una rápida reorganización de actina, tales como las espinas dendríticas. Se ha descrito su presencia en las densidades post-sinápticas (Racz y Weinberg, 2006) y su ausencia produce un aumento en la densidad de las espinas dendríticas junto con un incremento en el tamaño de la cabeza de las espinas (Rust et al., 2010). Además, se ha visto que los animales *knock-out* para la LIMK-1 poseen una disminución en la cantidad de cofilina fosforilada (lo cual puede interpretarse también como un aumento en la cofilina total) junto con un aumento en el porcentaje de espinas dendríticas con cabezas más pequeñas (Meng et al., 2002). En base a esto medimos la cantidad de cofilina total y cofilina fosforilada en las fracciones post-sinápticas de los animales MAP1B (+/-) (Fig 12C) y no observamos ninguna diferencia entre los dos genotipos, en la cantidad de cofilina total. Sin embargo, se vio una disminución en los niveles de fosfo-cofilina en las muestras MAP1B (+/-), resultado que es consistente con el fenotipo de las espinas dendríticas encontradas en las neuronas MAP1B (-/-).

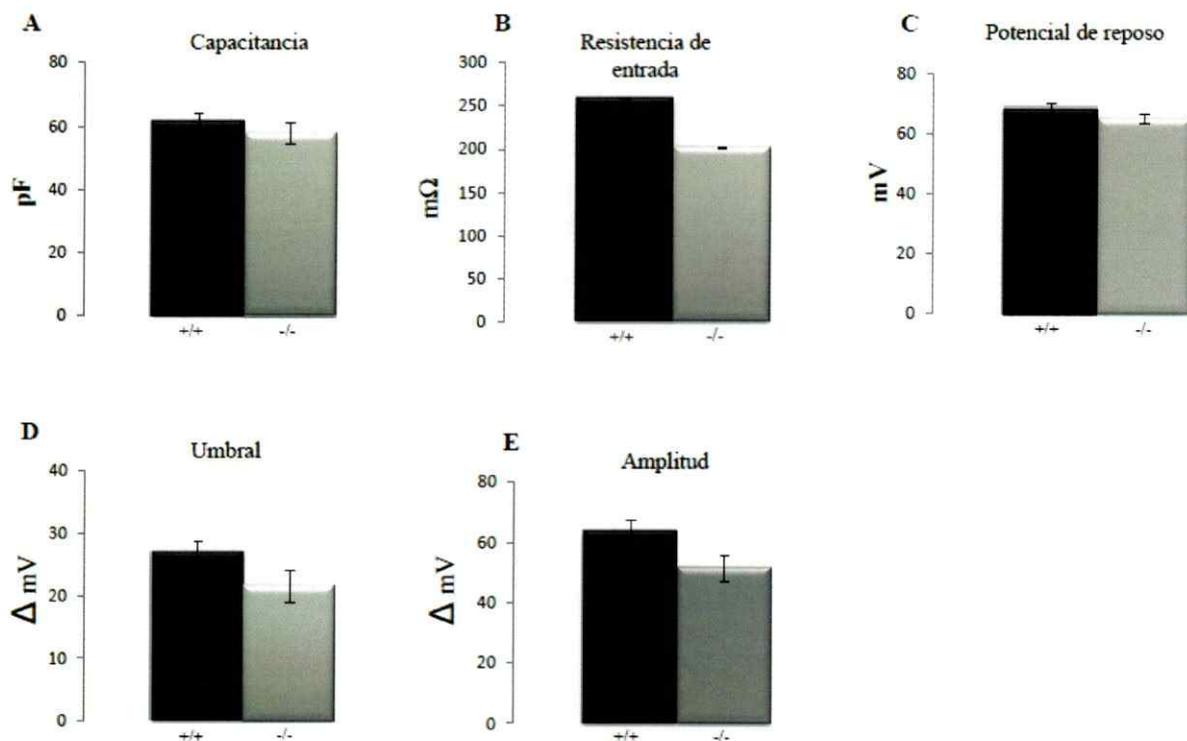


**Figura 12.** Los ratones MAP1B<sup>+/-</sup> muestran una disminución en la actividad de Rac1, un aumento de RhoA y una disminución de p-cofilina en los compartimentos post-sinápticos. (A) Western Blot que muestra que los extractos sinaptosomales obtenidos de animales adultos MAP1B<sup>+/-</sup> contienen menos Rac1-GTP que las muestras equivalentes provenientes de los WT. Los análisis cuantitativos confirman que la diferencia es estadísticamente significativa, n=4 (\*p≤0.05) (B) En contraste, las mismas fracciones sinaptosomales muestran que los animales heterocigotos para la MAP1B poseen una mayor cantidad de RhoA y que esta diferencia es significativa, n=4 (\*p≤0.05) (C) Western blot de las mismas muestras usadas en A y B, en donde se observa que los animales WT poseen más cofilina fosforilada que los heterocigotos. No se observaron diferencias en la cantidad de cofilina total, n=4. (\*p≤0.05, prueba t-student).

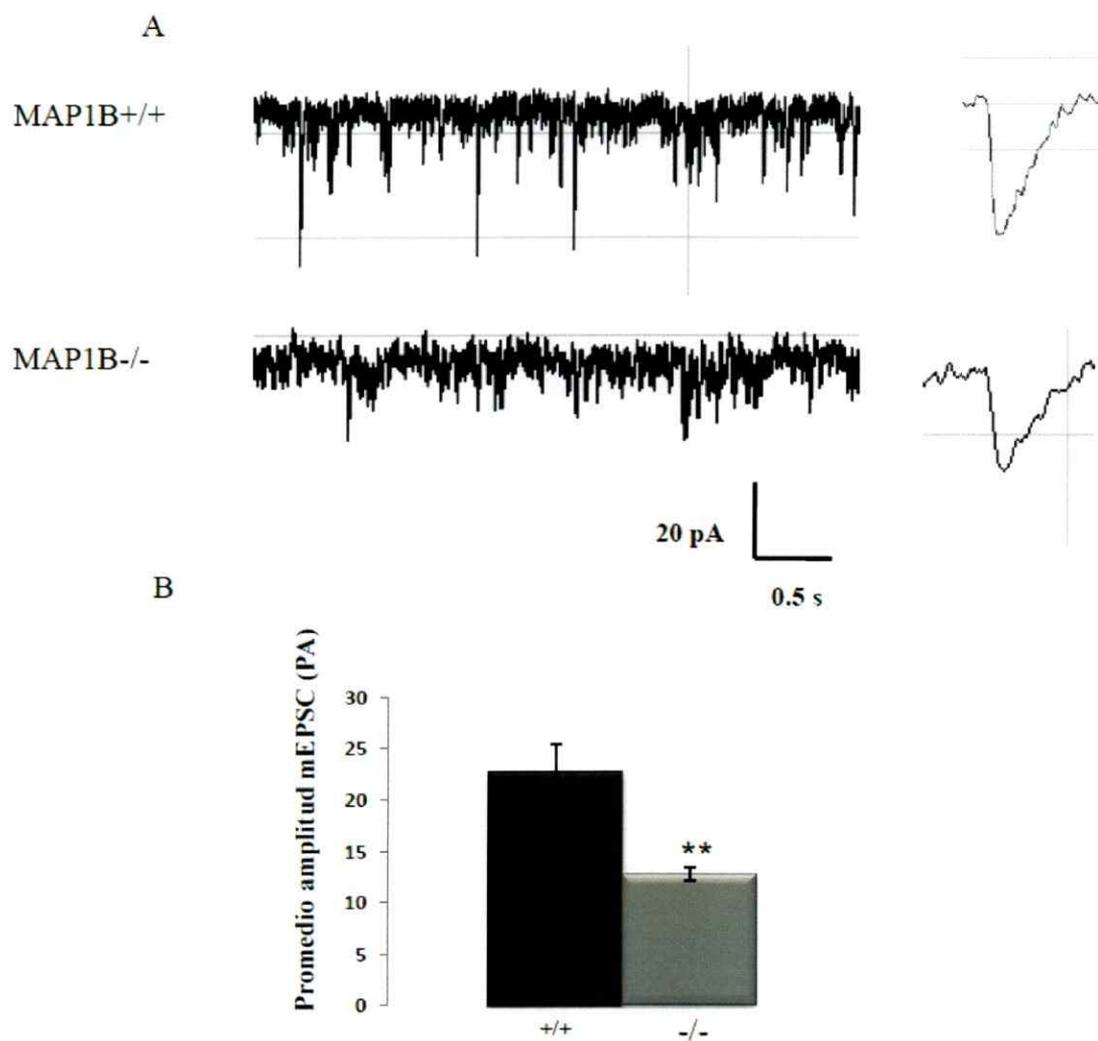
**La disminución en la expresión de MAP1B causa una reducción de la amplitud de las corrientes post-sinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC) mediadas por los receptores AMPA.**

A continuación quisimos estudiar si la disminución en el número de espinas dendríticas maduras en el animal hipomorfo podría impactar en la función sináptica de estas neuronas. Para esto, llevamos a cabo experimentos de electrofisiología. Primero, estudiamos si las neuronas MAP1B (-/-) poseían alguna alteración en las propiedades pasivas de membrana. Para ello, se realizaron registros de célula entera en configuración *current-clamp* a aproximadamente -60mV y se aplicaron pulsos cuadrados crecientes de 50 pA de corriente. Los resultados indicaron que la capacitancia de la membrana (relacionada con la superficie de la membrana celular), la resistencia de entrada y el potencial de membrana de reposo (relacionados con las conductancias iónicas activas en reposo) de las neuronas carentes en MAP1B no arrojaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con las WT (Fig 13 A-C). Más aún, tampoco se encontraron diferencias en propiedades activas como el umbral y la amplitud del potencial de acción, entre las neuronas control y las MAP1B (-/-) (Fig 13 D-E). El paso siguiente fue observar si las neuronas hipomorfas presentaban alteraciones en las propiedades post-sinápticas. Para esto, se registraron las corrientes post-sinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC) mediadas por los receptores AMPA, en configuración *voltage-clamp* a -60mV. Las mediciones se llevaron a cabo en presencia de APV (antagonista del receptor NMDA) y tetrodotoxina (TTX), para prevenir los potenciales de acción. Lo que se observó fue que las amplitudes de las mEPSCs obtenidas de las neuronas hipomorfas fueron significativamente menores en comparación con las neuronas control (Fig 14 A y B). La disminución en la amplitud de las mEPSCs sugiere que el número de receptores AMPA funcionales en la sinapsis se encontraría disminuído en las neuronas del hipomorfo y esto a su vez se correlacionaría con la gran proporción de espinas dendríticas inmaduras vistas en estas células. Adicionalmente, cuantificamos en los compartimientos post-sinápticos los niveles de algunas proteínas y no se observaron cambios en NR1

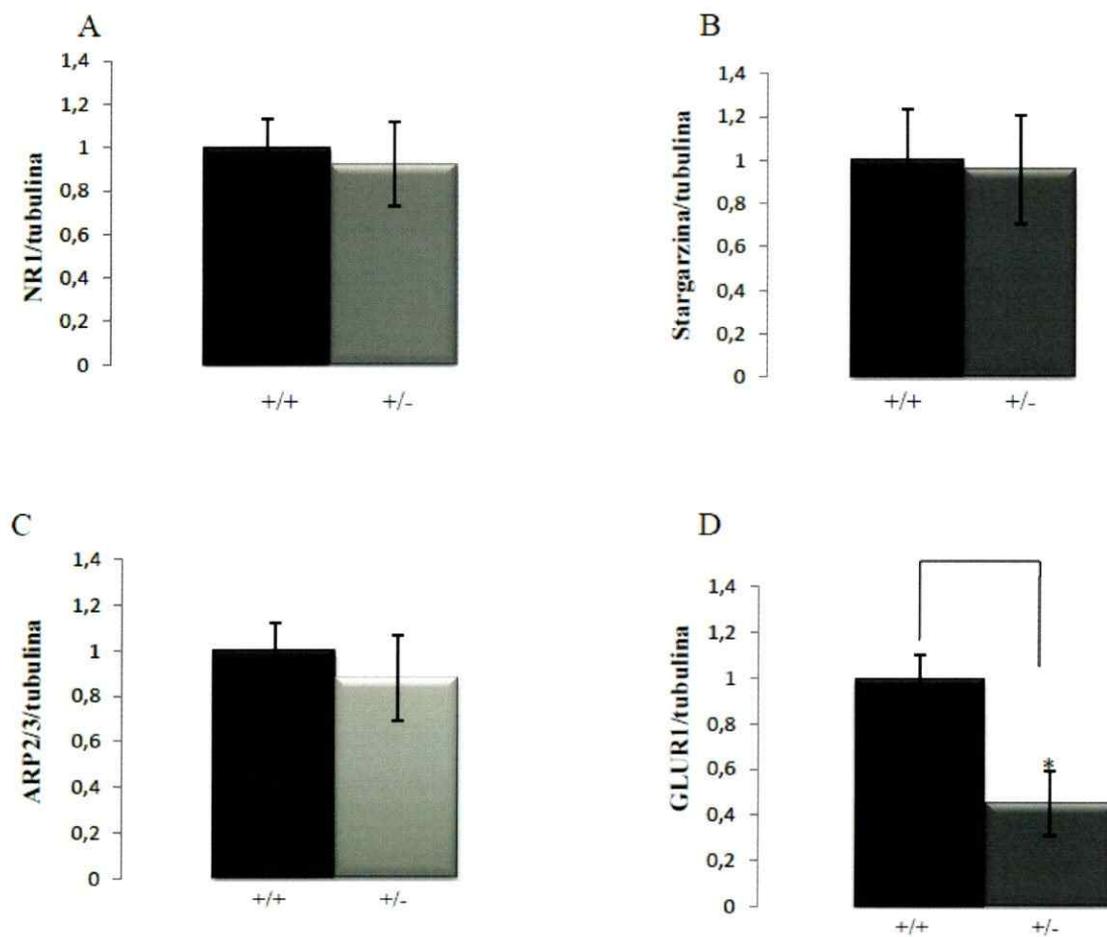
(subunidad receptor NMDA), Stargazina (proteína que interacciona con los receptores AMPA), ARP2/3 (molécula que participa en la nucleación de actina y es importante en la morfogénesis de espinas dendríticas). En cambio, vimos una disminución de un 60% en los niveles de GluR1 (Fig 15) que sería consistente con la disminución en la amplitud de las mEPSC observada en las neuronas MAP1B (-/-).



**Figura 13. La disminución en la expresión de MAP1B no produce alteraciones en las propiedades pasivas y activas de las neuronas (A, B y C)** Análisis de la capacitancia, resistencia de entrada y potencial de reposo, respetivamente, de los registros realizados a -60mV en neuronas control y MAP1B (-/-). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. **(D y E)** Tampoco se observaron cambios en los análisis de umbral y amplitud (propiedades activas) de estas células. n= 25 neuronas. Los análisis estadísticos se realizaron con el test Mann-Whitney (\* $p \leq 0,01$ ).



**Figura 14. Registros de corrientes sinápticas en miniatura (mEPSC).** Mediante la técnica de *patch clamp*, se llevaron a cabo registros de eventos espontáneos de neuronas de 21DIV, a -60mV y en presencia de 100 $\mu$ m de APV y 1 $\mu$ m de TTX. **(A)** Registros representativos (aproximadamente 2 segundos), de neuronas de 21 DIV provenientes tanto del animal silvestre como el hipomorfo. **(B)** Promedio de las mEPSC de AMPA registradas (n= 22 neuronas MAP1B<sup>+/+</sup> y 25 neuronas MAP1B<sup>-/-</sup>). Los análisis estadísticos se realizaron con el test Mann-Whitney (\*\*p<0,01).



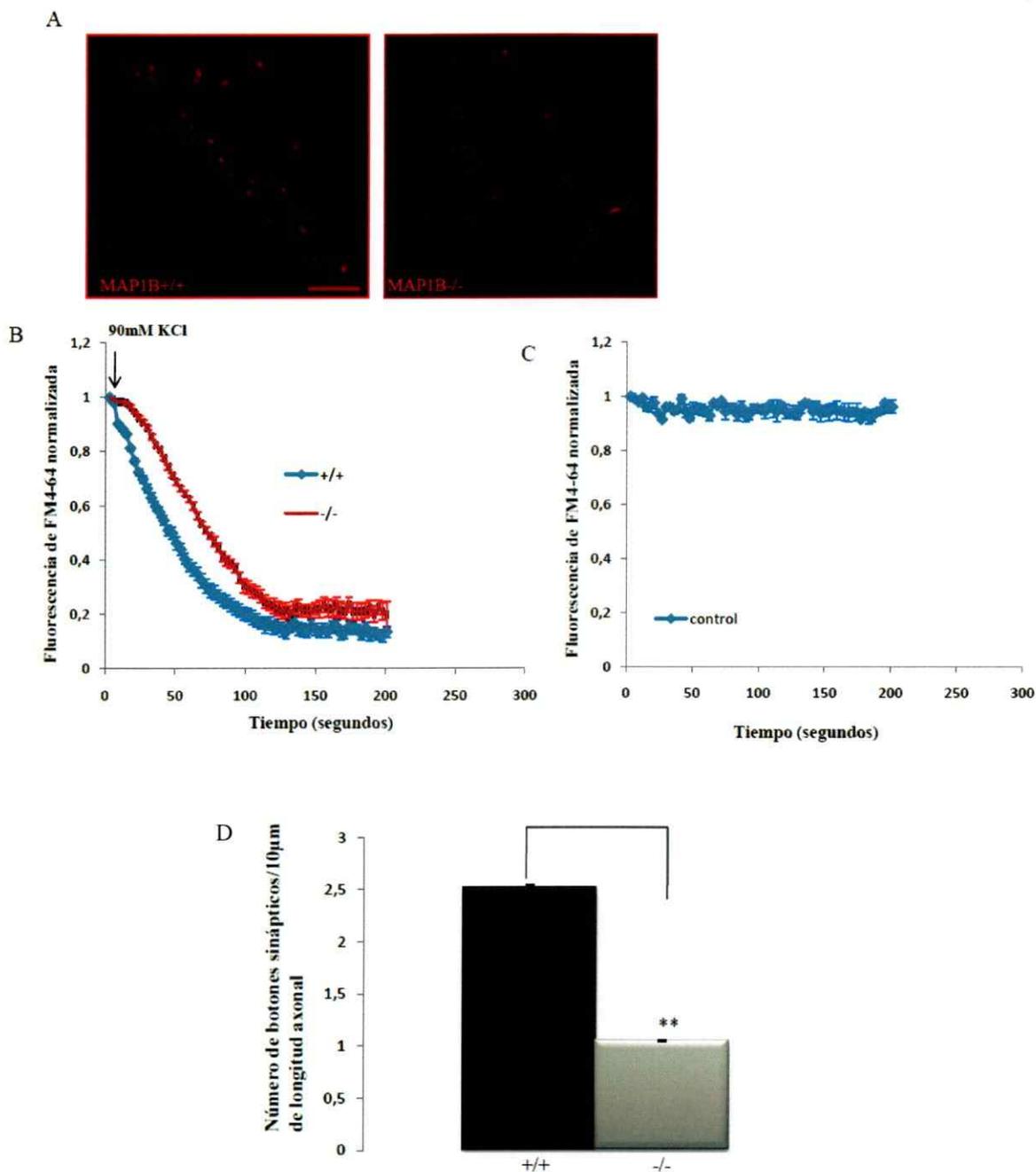
**Figura 15. Los compartimentos post-sinápticos de los animales MAP1B (+/-) poseen menor cantidad de GlurR1.** Gráficos que ilustran las cantidades de proteínas post-sinápticas NR1(A), Stargatzina (B), ARP2/3(C) y GLUR1 (D) presentes en las muestras obtenidas tanto de los animales WT como de los heterocigotos para MAP1B. n=3 (\*p<0.05).

**Las neuronas MAP1B (-/-) presentan una disminución en la tasa de liberación de vesículas sinápticas y en el número de los botones pre-sinápticos.**

Como vimos que las neuronas provenientes de los animales hipomorfos para MAP1B poseen un aumento de espinas dendríticas inmaduras (filopodios) y una disminución en la amplitud de las corrientes post-sinápticas espontáneas mediadas por los receptores AMPA, quisimos estudiar si la deficiencia de MAP1B podría tener un efecto sobre la cinética de liberación de vesículas en la terminal pre-sináptica, en respuesta a la despolarización con KCl. Esto podría explicar, en parte, el efecto que observamos en la membrana post-sináptica de las neuronas MAP1B (-/-). Para ello, las vesículas sinápticas de neuronas de 16 DIV provenientes de animales WT y MAP1B (-/-) se cargaron con 10  $\mu$ M de la sonda fluorescente FM4-64 (Fig 16 A). Una vez que las neuronas estuvieron cargadas con el fluoróforo, se midió la cinética de disminución de la intensidad de fluorescencia inducida por la despolarización con 90 mM de KCl, que representa una medida directa de la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana pre-sináptica y consecuente liberación del neurotransmisor. Como se indica en la Figura 16B, las neuronas MAP1B (-/-) presentan una disminución en la tasa de liberación de la fluorescencia de la sonda atrapada en las vesículas, con una vida media de 50s versus 85s para las neuronas control. A los 200 s los valores de fluorescencia normalizados alcanzan un "plateau" tanto para las neuronas del hipomorfo como para las WT. En paralelo a estos estudios, para verificar que la caída de la intensidad de fluorescencia se debió a la fusión de las vesículas con la membrana pre-sináptica y no a una destrucción irreversible o *photobleaching* de la sonda fluorescente por la radiación de excitación, se realizaron experimentos control. En estos estudios, las neuronas WT cargadas con la sonda FM4-64 se excitaron un número elevado de veces con intervalos de 2s entre cada toma, determinando así si existía alguna variación en el comportamiento de la sonda en ausencia de estímulo. Del gráfico expuesto en la Figura 16 C podemos concluir que bajo este protocolo de estimulación la sonda FM4-64 no es blanqueada en forma apreciable luego

de 150 exposiciones. Por lo tanto, se demuestra que la caída en la fluorescencia en los experimentos de despolarización se debe a eventos de fusión de las vesículas con la terminal pre-sináptica.

Finalmente, observamos que la ausencia de MAP1B causa una reducción en la densidad de los botones pre-sinápticos, evaluados como el número de botones que se cargan con el fluoróforo FM4-64 (Fig 16D). Por lo tanto, estos resultados sugieren que probablemente la disminución en la actividad neuronal vista en las neuronas MAP1B (-/-), se deba a la disminución en la tasa de liberación de vesículas sinápticas.



**Figura 16. La disminución de la expresión de MAP1B reduce la exocitosis de vesículas sinápticas de neuronas hipocampales maduras en cultivo. (A)** Imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas de 16 DIV provenientes de animales knockout (derecha) y WT (izquierda) para MAP1B cargadas con 10  $\mu$ M de la sonda FM4-64, marcador de vesículas sinápticas, barra. 5  $\mu$ m **(B)** Gráfico de la fluorescencia de FM4-64 normalizada, en donde se ilustra que las neuronas MAP1B (-/-) muestran una cinética de liberación de vesículas sinápticas disminuida en comparación con las neuronas control (n=30, para cada genotipo) **(C)** Curso temporal de la fluorescencia de neuronas WT cargadas con 10  $\mu$ M de la sonda FM4-64 excitadas aproximadamente 150 veces cada 2 s con 5% de intensidad de láser, sin efectuar ningún estímulo o cambio de medio. Los datos representan el promedio de 8 células. **(D)** Análisis cuantitativo que indica que las neuronas *hipomorfas* para MAP1B poseen una disminución en la densidad de botones sinápticos activos, en comparación con las WT (hipomorfo:  $1,05 \pm 0,07$ ; control:  $2,5 \pm 0,27$ , \*\* $p \leq 0,01$ , prueba t). La longitud total axonal medida que contenían puntos marcados para FM4-64 fue de 6250  $\mu$ m para MAP1B (-/-) y de 6091  $\mu$ m para el control.

### **3. En estadios adultos del desarrollo MAP1B, a través de su cadena liviana “LC1”, interacciona con Snapin, proteína involucrada en los procesos de neurotransmisión.**

Como MAP1B es una proteína que presenta una masa molecular muy grande y se ha señalado que tendría un rol como proteína andamio, debido a su interacción con varias proteínas (Riederer et al., 2007), quisimos averiguar si en estadios adultos del desarrollo, MAP1B participa en la formación de complejos multiproteicos que den cuenta de su participación en el control de la neurotransmisión. Para ello, realizamos un experimento de doble híbrido para identificar nuevos posibles interactores de la MAP1B. Como cebo se utilizó la cadena liviana “LC1” de la MAP1B, ya que pensamos que es la parte regulatoria de la proteína, y la hicimos interaccionar con una genoteca de cerebro de ratón adulto. Los clones que resultaron positivos en el ensayo fueron aquellos que crecieron en medios altamente restrictivos (Fig 17A, izquierda) y que dieron coloración azul al ensayo de  $\beta$ -galactosidasa (Fig 17A, derecha). En la Figura 17B se describen los clones que interaccionaron positivamente con MAP1B, los que fueron secuenciados y caracterizados usando la base de datos BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). De éstos, nos enfocamos en estudiar la proteína Snapin (Snap-associated protein), ya que es una molécula que participa en la regulación de la neurotransmisión. Snapin se une al complejo SNARE (complejo que se forma cuando las proteínas asociadas a vesículas sinápticas, sinaptotagmina I y sinaptobrevina “v-SNAREs”, interaccionan con las proteínas asociadas a la membrana “t-SNAREs”: SNAP-25 y syntaxina) mediante una interacción directa con SNAP-25 y así promueve la unión de la sinaptotagmina I con las t-SNAREs, permitiendo entonces la exocitosis de vesículas y liberación del neurotransmisor (Illardi et al., 1999). Además, se ha descrito que las neuronas *knock-out* para Snapin poseen una disminución en la frecuencia de las corrientes sinápticas en miniatura, una disminución en el tamaño del *pool* de vesículas que está listo para ser liberado (RRP) y en el número de botones pre-sinápticos activos. Junto con esto, se ha reportado que estas neuronas presentan una disminución en el *priming* y en la sincronización de la fusión de las vesículas (Pan et al., 2009).

Tanto MAP1B como Snapin se encuentran expresados en el hipocampo adulto, de acuerdo a datos obtenidos de la base de datos de hibridaciones *in situ* del Atlas Allen (Figura 19C). Por lo tanto, esto nos llevó a pensar que MAP1B podría participar en la regulación de la neurotransmisión a través de su unión a Snapin.

A



número de clones rastreados fue de: 3,6 millones.

-Viabilidad de los diploides:  $3.1 \times 10^5$

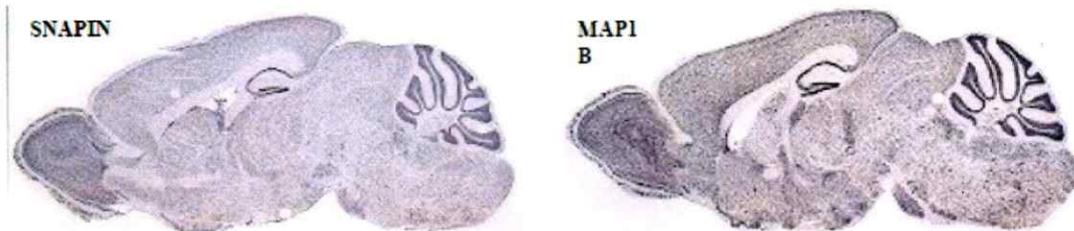
-Viabilidad del cebo:  $3 \times 10^8$  Cfu/ml (unidades formadoras de colonias/ml)

-Viabilidad de la presa:  $1.11 \times 10^7$  Cfu/ml

-% Eficiencia del acoplamiento: 3%

Tabla 3.

Proteína	Gi number	Número de Clon
Snapin (Snap-associated protein)	NM133854.2	3 y 24
Subunidad B1 de Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPasa	NM009721	8,12
CoxII (subunidad II de la Citocromo C oxidasa)	AF378830	1,4,21,18
Lipoma HMGIC fusion partner like protein 4	NM177763	5,11,19

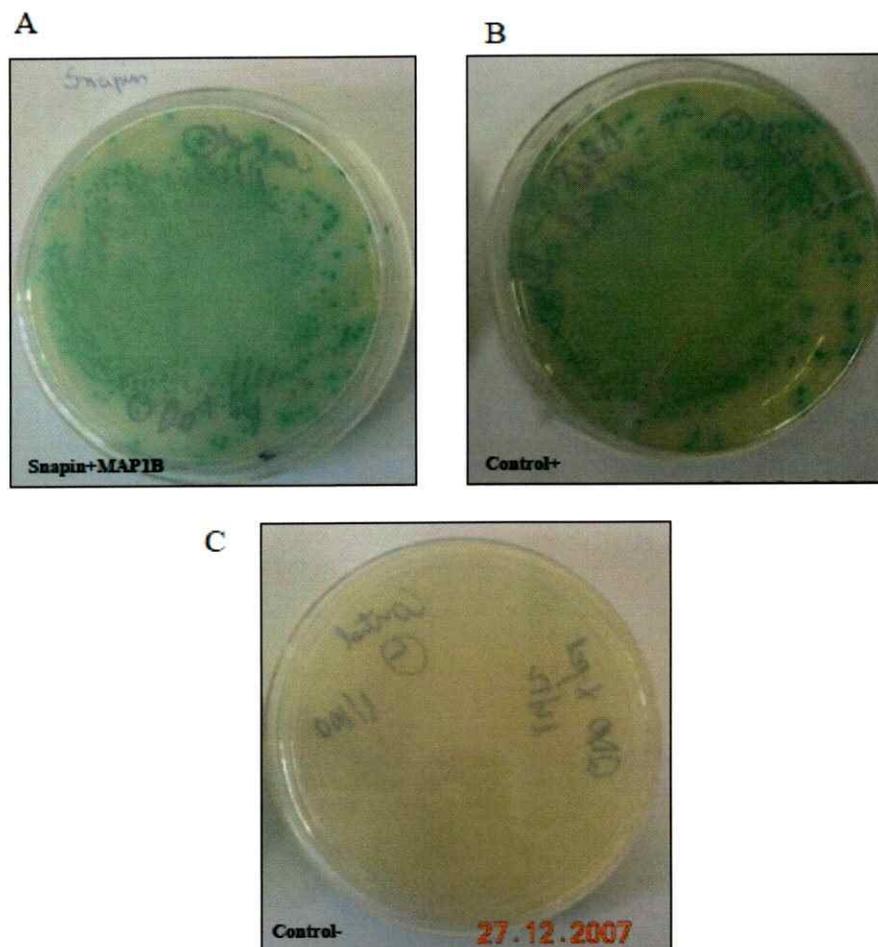


**Figura 17. Ensayo de doble híbrido para detectar los posibles interactores de MAP1B en cerebro de ratón adulto.** (A) Usando como cebo la cadena liviana de la MAP1B “LC1” contra una genoteca de cerebro de ratón adulto, se realizó un *screening* de las proteínas que se unen a “LC1”. Lo que se ilustra son fotografías representativas de las colonias de levaduras crecidas en medios altamente restrictivos (izquierda) y que dieron positivas a la reacción de la  $\beta$ -galactosidasa. (B) Tabla que enumera las proteínas que interaccionaron positivamente con “LC1” en estadio adulto. Estas fueron secuenciadas y caracterizadas usando la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) (C) Fotografías de hibridaciones *in situ* de cortes sagitales de cerebro de ratón adulto de Snapin y MAP1B, tomadas del Atlas Allen. Nótese la correlación de expresión espacial y temporal de ambas proteínas.

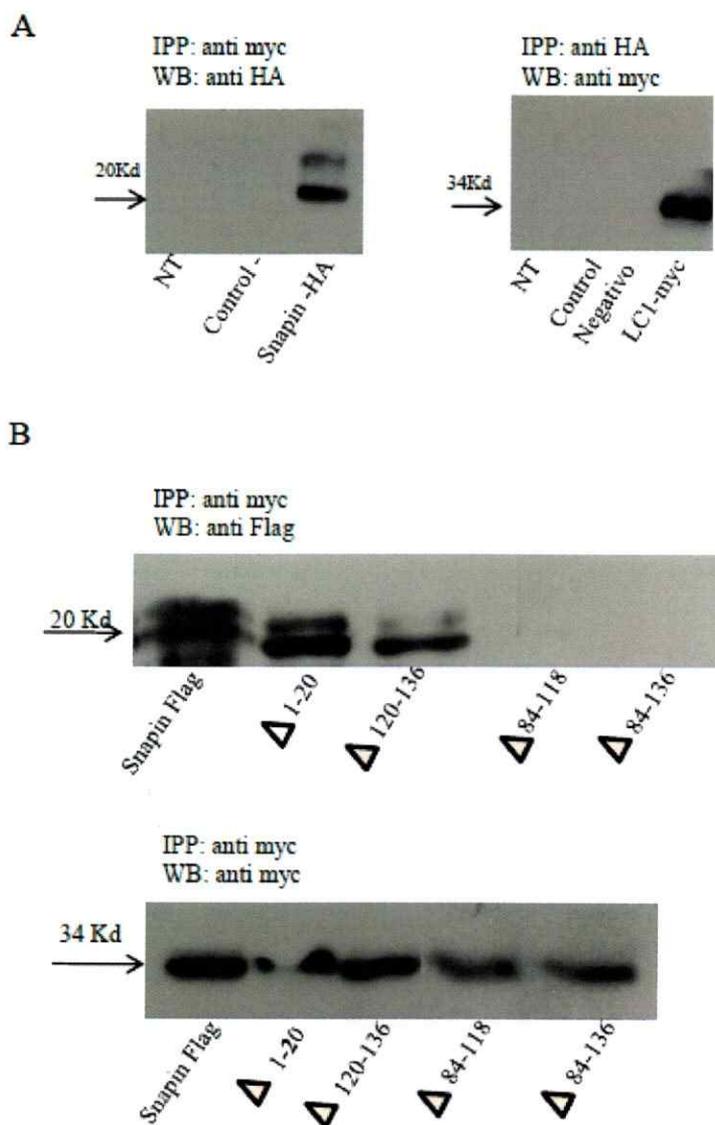
### **Confirmación de la interacción de Snapin y MAP1B-LC1.**

Para confirmar que la interacción entre MAP1B y LC1 corresponde a una interacción específica, co-transformamos en la cepa de levadura AH109 los plasmidios PGDAT7-Snapin y PGBKT7-LC1. Las colonias que dieron positivas, fueron aquellas que crecieron en medios altamente restrictivos, es decir, carentes en los aminoácidos adenina, leucina, triptófano y histidina y que adicionalmente dieron una coloración azul, a la selección por auxotrofia en presencia de X-gal, debido a la expresión de la proteína  $\beta$ -galactosidasa (Fig 18A). Como control positivo se usaron los interactores p53 y antígeno T (Figura 18B) y como control negativo se utilizó el vector pGADT7 vacío, junto al vector que contenía a p53 (Figura 18C). Una vez confirmada la interacción entre MAP1B y LC1 en levaduras, quisimos estudiar si la interacción se reproducía en un sistema heterólogo de cultivo. Para ello se transfectaron células COS-7, las cuales carecen de MAP1B, con los vectores que codificaban para Snapin acoplado a un epítipo HA y para MAP1B-LC1 unido a myc. Los estudios de co-inmunoprecipitación mostraron que el anticuerpo contra myc fue capaz de inmunoprecipitar HA. Adicionalmente, la inmunoprecipitación recíproca mostró que el anticuerpo contra HA inmunoprecipitó a myc (Fig 19 A). Una vez establecida la interacción entre ambas proteínas en las células COS-7, nos abocamos a identificar la zona de interacción de Snapin con LC1. Para ello, expresamos diferentes construcciones de Snapin-FLAG junto a LC1-myc en células COS-7. Los resultados indicaron que el extremo C-terminal de Snapin, específicamente la región comprendida entre los aminoácidos 84-118, es el segmento de esta proteína que se une a la MAP1B-LC1 (Fig 19 B). Se ha descrito que esta región de Snapin interacciona con otras proteínas involucradas en exocitosis, entre las que se tienen EDH1 (Wei et al., 2010) y SNAP-25 (Illardi et al., 1999). EDH1 es una proteína sináptica que afecta negativamente la exocitosis, ya que al unirse a Snapin disminuye la interacción de Snapin con SNAP-25 y Sinaptotagmina I y por ende la liberación de neurotransmisores (Wei

et al., 2010). Por lo tanto, la interacción entre MAP1B-LC1 y Snapin podría tener como función la regulación de la tasa de liberación de vesículas sinápticas.



**Figura 17. Confirmación en levaduras de la interacción de la proteína Snapin con la cadena liviana de la MAP1B “LC1”.** El ensayo de doble híbrido arrojó como posible interactor de LC1 a Snapin, entonces para confirmar tal interacción se co-transformaron en la cepa de levadura AH109 los plasmidios pGDAT7-Snapin y pGBKT7-LC1 (A). Los vectores pGDAT7-T y pGBKT7-p53 se usaron como control (+), ya que se ha demostrado la interacción entre esas proteínas (B). (C) PGDAT7 (sin el interactor) y PGBKT7-p53 fueron usados como control (-). Lo que se ilustra en A, B y C son fotografías representativas de colonias de levaduras crecidas en medio altamente restrictivo “QDO” y que son positivas para el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa en Ay B.

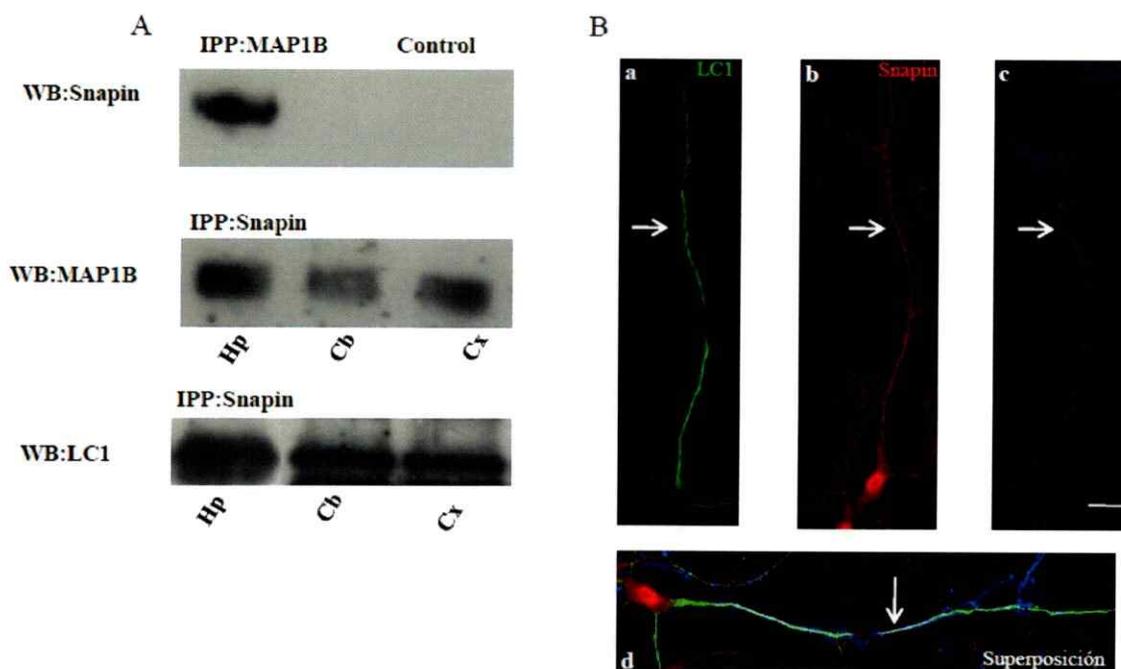


**Figura 19. Snapin interacta a través de su extremo C-terminal con MAP1B-LC1 (A)** Western Blot que indica que los extractos proteicos de células Cos-7 transfectadas con LC1-myc inmunoprecipitan a Snapin-HA (izquierda). A su vez, la inmunoprecipitación recíproca también dio positiva (derecha). **(B)** Western Blot que muestra que el segmento C-terminal de Snapin, específicamente la región comprendida entre los aminoácidos 84 -118, es el que se une a la cadena liviana de MAP1B. (n= 3) NT= sin transfectar.

### **Interacción de LC1 in vivo con Snapin en cerebro de ratón adulto.**

Finalmente, decidimos estudiar si estas proteínas podrían interactuar en neuronas de ratón. Para ello, se extrajeron proteínas de cerebro total de ratón adulto y se llevó a cabo un experimento de co-inmunoprecipitación, en el cual el anticuerpo contra MAP1B inmunoprecipitó Snapin. (Fig 20 A panel superior). Adicionalmente, se extrajeron proteínas desde áreas donde se expresa MAP1B en cerebro adulto como lo son el hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo. Se observó que el anticuerpo contra Snapin inmunoprecipitó a MAP1B (Fig 20A panel medio). A su vez la inmunoprecipitación recíproca mostró que MAP1B fue capaz de inmunoprecipitar a Snapin (Fig 20 A panel inferior), corroborándose el resultado obtenido anteriormente. Estos experimentos de interacción a través de técnicas bioquímicas fueron complementados con experimentos de inmunofluorescencia. Es así que, en neuronas disociadas de 12 días en cultivo, se observó la colocalización de ambas proteínas en el axón (Fig 20B).

Finalmente, estos resultados sugieren que la función de la interacción entre MAP1B y Snapin, sería para participar directa o indirectamente de la maquinaria que media la liberación de las vesículas sinápticas. Probablemente aumentando la asociación de sinaptotagmina I y SNAP-25 a través de Snapin ó contribuyendo a la mantención de un pool estable de Snapin en la zona activa de la membrana pre-sináptica.



**Figura 20. LC1 interacciona in vivo y co-localiza con Snapin en cerebro de ratón adulto.** (A) Western Blot de extractos proteicos de cerebro de ratón adulto en donde se demuestra que MAP1B inmunoprecipita a Snapin (panel superior). Del mismo modo Snapin fue capaz de inmunoprecipitar a MAP1B en los extractos de proteínas provenientes de hipocampo, cerebelo y corteza (panel del medio) Finalmente el panel inferior indica que la inmunoprecipitación recíproca resultó positiva. (B) (a, b, c) Corresponden a imágenes de fluorescencia de una neurona hipocámpal WT de 12 DIV, en las cuales la tinción en verde corresponde a LC1, la roja a Snapin y la azul a Tau1, respectivamente. En d se visualiza la superposición de las 3 imágenes anteriores. Se observa que las proteínas colocalizan en el axón (flecha en cada panel) Barra: 20 $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

### **Rol de MAP1B en la regulación de la elongación axonal**

La reorganización del citoesqueleto en el cono de crecimiento es esencial para la formación del axón, e involucra la expansión y protrusión de un manto de actina que forma los lamelipodios, la activación de las Rho-GTPasas Rac1/cdc42 y la invasión y crecimiento de los microtúbulos (Bradke y Dotti, 1999). Se ha demostrado que la activación localizada de la Rac1-GTPasa contribuye a la rápida elongación del axón mediante el control del citoesqueleto de actina (Da Silva et al., 2005; Nishimura et al., 2005). En este contexto, se ha descrito que existe un complejo de polaridad, constituido por las proteínas de andamio Par3/Par6, que pueden activar a Rac1, ya que Par3 recluta a Tiam1, una GEF específica de Rac1, a la membrana plasmática. Este reclutamiento también puede depender de la activación de cdc42 y de su interacción con Par6. Por lo tanto, la activación espacio-temporal y la señalización de cdc42-Par6-Par3-Tiam1-Rac1 están involucradas en la especificación y crecimiento del axón (Nishimura et al., 2005). En concordancia con esto, las neuronas derivadas del ratón *knockout* para cdc42 poseen una disminución en la elongación axonal y además en este modelo genético la fosforilación de moléculas de señalización localizadas río abajo de cdc42/Rac1, entre las que se tiene a la cofilina, se encuentran alteradas (Garvalov et al., 2007).

En esta tesis se ha demostrado que el retraso en la elongación axonal que se observa en animales hipomorfos para MAP1B, puede ser revertido bajo 3 condiciones que afectan directamente al comportamiento dinámico de los filamentos de actina: a) tratamientos con citocalasina D permiten la elongación de axones en neuronas MAP1B (-/-), y la concomitante invasión de microtúbulos tirosinados (población más dinámica de microtúbulos); b) la sobre-expresión de las formas constitutivamente activas de Rac1 y cdc42 y, c) la sobreexpresión de la GEF específica para Rac1, Tiam1, en su forma dirigida a la membrana plasmática (Montenegro-Venegas et al., 2010). Estas condiciones en todos los

casos permitieron extender los axones de las neuronas MAP1B (-/-) a longitudes equivalentes a las encontradas en las neuronas control. Adicionalmente, las neuronas que poseen deficiencias en la expresión de MAP1B mostraron una disminución en la actividad de moléculas que regulan la polimerización de actina. En concreto, se verificó una reducción en la actividad de Rac1 y cdc42, con el concomitante aumento de la actividad de RhoA (Montenegro-Venegas et al., 2010). Finalmente, los cambios asociados a la actividad de las Rho-GTPasas, que controlan la dinámica de actina, fueron acompañados por cambios en la actividad de los efectores de cada vía. En el caso de la vía de Rac1, los niveles de P-LIMK-1 y P-cofilina-estaban disminuidos. Mientras que en el caso de la vía de RhoA, la cantidad de P-MPYT, sustrato específico de RhoK, estaba aumentada (Montenegro-Venegas et al., 2010). Estos datos sugieren que existe un mecanismo de control cruzado de los microtúbulos sobre las propiedades dinámicas de los filamentos de actina, y que estas interacciones recíprocas entre estos elementos del citoesqueleto son importantes para la especificación, guía y elongación del axón.

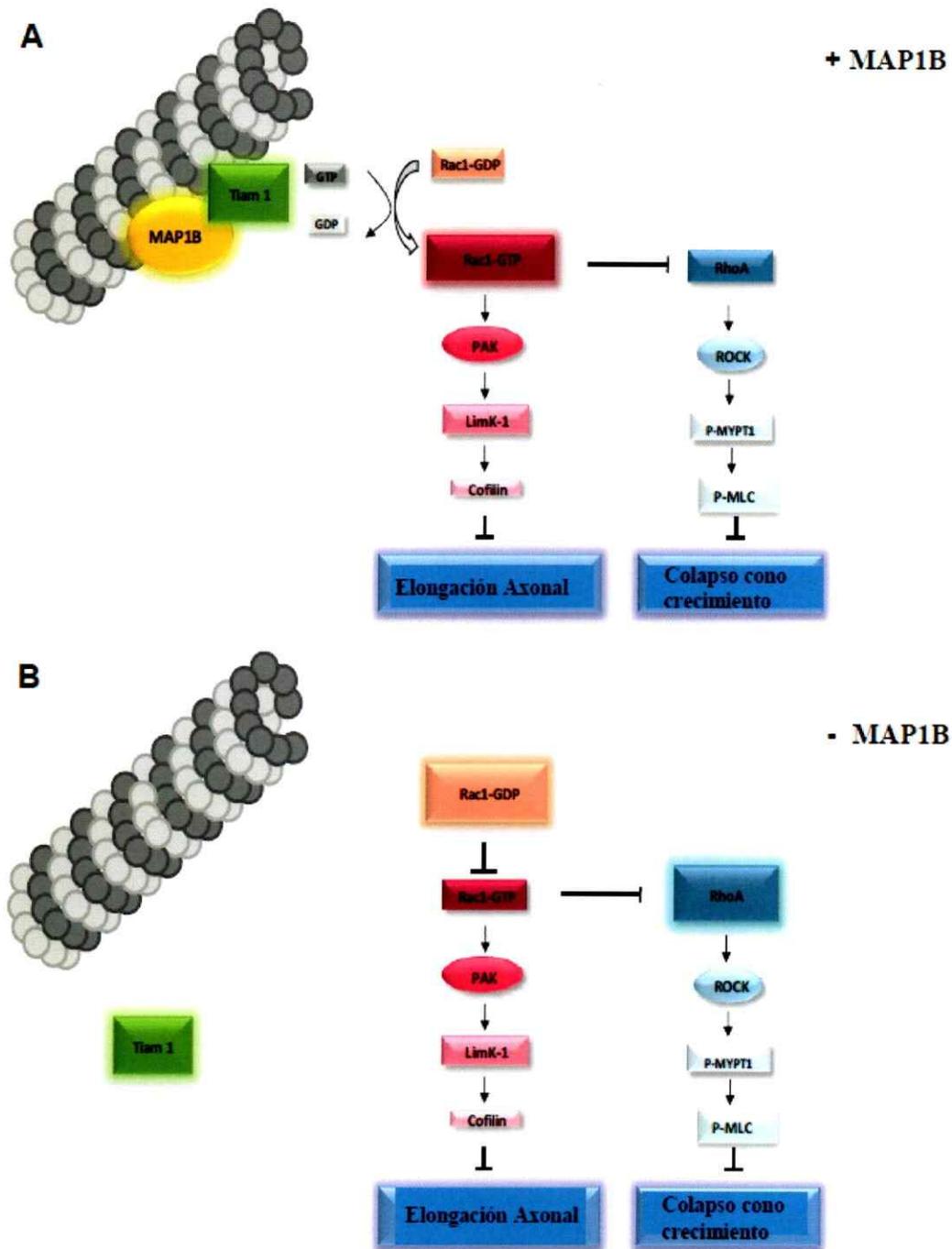
Estos resultados apoyan estudios que indican que los miembros de la familia de Rho GTPasas pequeñas incluyendo RhoA, Rac1 y cdc42 parecen ser moléculas importantes en la regulación de la conversación cruzada entre actina y microtúbulos en neuronas en desarrollo, para la especificación, guía y elongación del axón (revisado en Wittmann y Waterman-Storer, 2001). Más aún, hay evidencias de que durante la polarización celular existe una inter-relación entre actina y microtúbulos a través de las Rho-GTPasas pequeñas. Por ejemplo, IQGAP1, proteína de unión a actina y molécula efectora de Rac1 y cdc42, interacciona directamente con las TIPS+ CLIP-170, APC y CLASP2, las cuales son proteínas que se une al extremo en crecimiento del microtúbulo (extremo +), regulando así la dinámica de los microtúbulos y permitiendo por lo tanto la polarización celular (Fukata et al., 2002; Watanabe et al., 2005; 2009). PAK, otra molécula efectora de Rac1 y cdc42 fosforila a stathmina. Esta proteína se une a microtúbulos y los desestabiliza y la fosforilación bloquea su actividad (Daub et al., 2001; Wittmann et al., 2004). mDia, proteína

efectora de RhoA, también participa en la conversación cruzada entre actina y microtúbulos, ya que su función está relacionada con la formación de microtúbulos estables a través de su interacción con las proteínas EB1 y APC para promover la migración celular (Palazzo et al., 2001; Wen Y et al., 2004) y en la coordinación de la distribución de filamentos de actina y microtúbulos (Ishizaki et al., 2001). En conjunto, todos estos datos indican que varios efectores de Rac1 y cdc42, participan en la regulación de la interacción recíproca entre actina y microtúbulos durante la elongación axonal. Nuestros resultados muestran que la proteína MAP1B unida a los microtúbulos actúa como regulador río arriba de la actividad de Rac1 durante el crecimiento del axón a través de su interacción con Tiam1.

MAP1B podría actuar como una marca para llevar a Tiam1 a un grupo particular de microtúbulos, por ejemplo los microtúbulos tirosinados, que son esencialmente dinámicos (Kunda et al., 2001). Esto contribuiría a la activación espacio-temporal de Rac1 y de esta manera a la rápida elongación del axón. La activación de Rac1 no sólo depende de la función de Tiam1, ya que se han descrito otras GEFs que contribuyen al desarrollo de polaridad neuronal. Entre ellas está DOCK7, que regula la polaridad neuronal a través de la fosforilación local de la proteína desestabilizadora de microtúbulos stathmina/Op18 (Watabe-Uchida et al., 2006). Por lo tanto, se sugiere que este podría ser un mecanismo complementario al propuesto en este trabajo. Sin embargo, en este trabajo de tesis nosotros nos focalizamos en el estudio de Tiam1 por varias razones, siendo la más relevante que Tiam1 se asocia con microtúbulos (Kunda et al., 2001). Eso nos llevó a pensar que podría interactuar con una MAP, tal como la MAP1B. Es importante destacar, que nuestros datos son consistentes con reportes que señalan que la proteína STEF (homóloga de Tiam1) interactúa con la cadena liviana LC1 de MAP1B. Esta interacción STEF1-LC1 es inhibida por la fosforilación mediada por la Rho quinasa (Takefuji et al., 2007). En nuestro modelo, mediante ensayos de *pull down*, observamos un aumento en la actividad de la Rho-GTPasa RhoA. Junto con esto detectamos un aumento en la fosforilación de la subunidad de unión a miosina de la miosina fosfatasa (MYPT1). La miosina fosfatasa regula la interacción de

actina y miosina río abajo de RhoA, la cual inhibe a la miosina fosfatasa a través de la activación de la Rho quinasa. Esta inhibición causa finalmente retracción del axón y colapso del cono de crecimiento. Además, se ha demostrado que la activación de Rac1 inducida por Tiam1 disminuye la señal de RhoA (Van Leeuwen et al., 1997; Sander et al., 1999) y que esta inhibición induce la desestabilización local de los filamentos de actina promoviendo así la axonogénesis (Da Silva et al., 2005). Basándonos en los resultados presentados aquí y en la literatura, nuestro modelo propone que la activación de RhoA podría depender de la inactivación de Rac1. Este modelo explicaría la disminución en la velocidad de elongación axonal en las neuronas deficientes en MAP1B (Fig. 21). Más aún, otras proteínas GEFs, como la GEF-H1 y la Lfc, que son específicas para RhoA y Rac1 respectivamente, interaccionan con microtúbulos (Krendel et al., 2002). Interesantemente, los microtúbulos que se ubican en el extremo distal del axón, incluidas las regiones centrales y periféricas del cono de crecimiento, se encontraron enriquecidos tanto en MAP1B como en Tiam1. En contraste, la activación de las Rho-GTPasas; Rac1 y cdc42, así como la ubicación distal de Tiam1, no se observó en las neuronas carentes en MAP1B. En consecuencia, la deficiencia en MAP1B está asociada con un aumento de la presencia de Tiam1 en el soma neuronal. La distribución de Tiam1 en el axón de una neurona silvestre se correlaciona con la localización de MAP1B fosforilado en modo I en el axón, la cual se concentra en la parte distal de éste, proximal al cono de crecimiento (Black et al., 1994; Boyne et al., 1995; Bush et al., 1996). Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que Tiam 1 se asocie a MAP1B fosforilada en modo I y al estar ausente en los ratones KO, Tiam 1 cambie su localización al soma y por ende no pueda activar en el lugar y momento dado a la Rho-GTPasa Rac1 y promover la elongación del axón. Por otra parte, se ha visto que la disminución en la expresión de MAP1B produce un dramático descenso en el contenido de microtúbulos tirosinados (Gonzalez-Billault et al., 2001). La enzima tubulina tirosina ligasa, responsable de la tirosinación de la alfa tubulina, interacciona con MAP1B en células neuronales sugiriendo que la pérdida de esta interacción puede ser en parte responsable de la

disminución de microtúbulos tirosinados en las neuronas deficientes en MAP1B (Utreras et al., 2008). Las modificaciones postraduccionales de la  $\alpha$ -tubulina son necesarias para la especificación del axón, según indican algunos estudios que muestran un aumento en la acetilación local de los microtúbulos durante la especificación del axón (Witte et al., 2008). Además, estas modificaciones (por ejemplo: destirosinación de  $\alpha$ -tubulina) podrían también afectar la unión de Tiam1 a los microtúbulos. En cualquier caso, las presentes observaciones plantean la posibilidad de que en neuronas en desarrollo, los microtúbulos regulen la actividad de las Rho-GTPasas tal como se propone para la migración de los fibroblastos. Por otra parte, el requerimiento de MAP1B para una efectiva unión de Tiam1 a los microtúbulos, aparece como una nueva y crucial función para esta MAP durante la polarización neuronal.



**Figura 21. Esquema que ilustra el posible mecanismo por el cual MAP1B es importante para la actividad de Tiam1.** En presencia de MAP1B, Tiam1 es capaz de unirse a los microtúbulos. Esta unión se requiere para la activación de cdc42 y Rac1. La activación de la vía de Rac1, resulta en la inhibición de cofilina, lo cual permite la polimerización de la actina y el subsecuente desarrollo del axón. Por otra parte, Rac1 inhibe la vía de RhoA, de este modo evita el colapso del cono de crecimiento. En ausencia de MAP1B, Tiam1 se localiza en el citoplasma y no se activa la vía de Rac1. La inhibición de la vía de Rac1 lleva a la activación de la vía de RhoA y como consecuencia colapso del cono de crecimiento (Montenegro-Venegas et al., 2010).

### MAP1B y desarrollo de las espinas dendríticas

En la sección introductoria, se ha mencionado que MAP1B es la primera de las MAPs en expresarse durante los primeros estadios del desarrollo. Y que esta proteína alcanza sus máximos niveles de expresión durante los primeros días del desarrollo, disminuyendo al llegar a la etapa adulta (Matus et al., 1988; Schoenfeld et al., 1989; Tucker et al., 1988). Sin embargo, la MAP1B en estadios adultos, mantiene elevados sus niveles de expresión en ciertas zonas del cerebro que poseen un alto grado de actividad y plasticidad sináptica como por ejemplo, el hipocampo (Nothias et al., 1996; Schoenfeld et al., 1989; Tucker et al., 1989). Junto con esto, trabajos previos han detectado a través de microscopía electrónica y análisis proteómicos, la presencia de MAP1B en la región post-sináptica de la corteza cerebral de rata (Kawakami et al., 2003; Witzmann et al., 2005). Hasta el inicio de este trabajo se había estudiado ampliamente el rol de MAP1B en la axonogénesis. Mientras que su función en la etapa adulta, particularmente en los compartimentos post-sinápticos, aún no había sido dilucidada. En concordancia con lo previamente descrito en la literatura, en nuestro trabajo detectamos la presencia de MAP1B en sinaptosomas purificados de corteza de ratón, tanto en las fracciones pre- como post-sinápticas. Además observamos mediante microscopía confocal la presencia de MAP1B en un porcentaje pequeño (1-4%) de las espinas dendríticas, en cultivos neuronales de 21 días de incubación *in vitro*. Adicionalmente, se ha demostrado que en una pequeña fracción (en promedio un 4%) de las espinas dendríticas, se ha encontrado la presencia de la proteína EB3 endógena, la cual es una proteína que se une sólo al extremo (+) de los microtúbulos que están polimerizando (Jaworski et al., 2009). Nuestros resultados se relacionan con los datos publicados recientemente, donde se señala que el porcentaje de protrusiones dendríticas en cultivos fijados (20-28 DIV), donde se detectó la presencia de microtúbulos bajo condiciones basales, es de aproximadamente un 1%. El bajo número de protrusiones dendríticas que presentan microtúbulos en un momento determinado puede deberse a la naturaleza dinámica y

transitoria de éstos (Gu et al., 2008). Interesantemente, se ha reportado que la invasión de los microtúbulos en las espinas dendríticas probablemente cumple funciones específicas y no es, por lo tanto, un acontecimiento al azar. El aumento de la actividad neuronal incrementa substancialmente el número de protrusiones que son invadidas por microtúbulos y el tiempo que éstos permanecen en ellas (Hu et al., 2008). Como MAP1B es una proteína que se asocia a microtúbulos y que está implicada en la mantención de una población de microtúbulos dinámicos (Goold et al., 1999; Utreras et al., 2008) junto con interactuar con filamentos de actina, ya sea a través de su cadena pesada y liviana (Cueille et al., 2007, Togel et al., 1998), es razonable pensar que MAP1B podría entrar en las espinas a través de su unión a microtúbulos ó a través de su interacción con filamentos de actina. La entrada de MAP1B en las protrusiones dendríticas sería transitoria, debido al pequeño número de las mismas positivas a la tinción de MAP1B. Se ha descrito que el ingreso temporal de los microtúbulos a las espinas está asociado con cambios morfológicos, tales como formación de protrusiones transitorias, aumento en el ancho de las espinas y disminución de protrusiones tipo filopodios (Hu et al., 2008; Gu et al., 2008; Jaworski et al., 2009). Estos microtúbulos podrían actuar como señal para reorganizar el citoesqueleto de actina y regular el tamaño de la espina. Esto se relaciona con nuestras observaciones, donde las neuronas provenientes del animal hipomorfo para MAP1B muestran una disminución en el porcentaje de espinas dendríticas maduras tipo “*mushroom*” y un aumento en las protrusiones tipo filopodios, en comparación con las neuronas del animal WT. Finalmente, el alto número de protrusiones dendríticas inmaduras presentes en las neuronas MAP1B (-/-) se asocia con la disminución en la amplitud de las corrientes post-sinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC) mediadas por los receptores AMPA, observadas en estas neuronas. Estos resultados sugieren la importancia de MAP1B en la formación de las espinas dendríticas y probablemente en la maduración sináptica. Reportes previos han demostrado que la reducción en los niveles de la proteína EB3, produce un aumento de las protrusiones tipo filopodios y una disminución en el número de espinas maduras tipo “*mushroom*”. Junto con esto, se ha reportado que el uso

de bajas concentraciones de nocodazol, para inhibir la dinámica de microtúbulos en rebanadas de hipocampo en cultivos organotípicos, produce el mismo fenotipo y suprime la potenciación sináptica producida en respuesta a una estimulación de alta frecuencia (Jaworski et al., 2009). Por otro lado, el uso de pequeñas dosis de taxol para promover y estabilizar microtúbulos, en conjunto con BDNF, incrementa el tamaño de la cabeza de las espinas (Hu et al., 2008). Por lo tanto, es probable que la presencia de MAP1B en las protrusiones dendríticas aumente la población de microtúbulos dinámicos a través de su interacción con la tubulina tirosina ligasa (Utreras et al., 2008), regulando así los cambios morfológicos sufridos por estas estructuras. Junto con esto, no podemos descartar que en ausencia de MAP1B haya un retraso en el desarrollo de las espinas dendríticas y por eso posean una morfología más inmadura.

El citoesqueleto de actina juega un rol importante en la dinámica y la morfogénesis de las espinas dendríticas (Ethell y Pasquale, 2005; Sekino et al., 2007; Zhang y Macara, 2008). Numerosas proteínas de unión a actina que se encuentran bajo el control de diferentes vías, tales como las Rho-GTPasas, regulan la dinámica de actina. Nosotros detectamos que en las fracciones sinaptosomales post-sinápticas extraídas de las corteza de los animales adultos MAP1B (+/-), se produce una disminución en la actividad de la Rho-GTPasa Rac1 y un aumento en RhoA-GTP (forma activa). Esto está en estrecha relación con lo que se observa en las neuronas MAP1B (-/-) de 2 DIV, donde se produce un aumento en la actividad de RhoA y una disminución en la actividad de Rac1 y cdc42. Esto se debería (al menos en parte) a la regulación de la actividad de la Rho-GTPasa por parte de MAP1B, a través de su interacción con Tiam1. Hay varias evidencias que implican a Rac1 y RhoA tanto en la formación, como en la maduración de las espinas. En concordancia con nuestros resultados, trabajos previos han mostrado que el uso de un dominante negativo de Rac1 causa una disminución en la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de rebanadas de hipocampo (Nakayama et al., 2000; Pilpel y Segal., 2004; Tashiro et al., 2000). Las

neuronas que expresan el dominante negativo muestran espinas dendríticas notablemente más largas que los controles. Más aún, la inhibición de Rac1 reduce el crecimiento de la cabeza de las espinas. Estas observaciones demuestran el rol de Rac1 en la mantención y maduración de las espinas (Tashiro y Yuste, 2004). En contraste con Rac1, tenemos a RhoA, la cual inhibe la formación y maduración de espinas (Govek et al., 2005). La sobre-expresión de la forma constitutivamente activa de RhoA disminuye la longitud y densidad de espinas, indicando que RhoA tiene un efecto negativo en la formación y mantención de estas estructuras (Nakayama et al., 2000; Pilpel y Segal, 2004; Tashiro et al., 2000). En forma contraria, se ha descrito que la inhibición de RhoA incrementa la densidad y longitud de las espinas en neuronas corticales e hipocampales de ratón (Tashiro et al., 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, las GEFs y las GAPs regulan la actividad de las Rho-GTPasas. Existen varios trabajos que apoyan el rol de las GEFs en la formación y mantención de las espinas. Tiam1 está involucrada en la morfogénesis de espinas y el crecimiento de las arborizaciones dendríticas en respuesta a la activación de los receptores de NMDA (Tolias et al., 2005). Más aún, la disminución de los niveles de Tiam1 mediante RNAi en neuronas hipocampales produce una reducción en la densidad de espinas dendríticas. Tiam1 no es el único caso de una proteína reguladora de GTPasas monoméricas involucradas en el remodelamiento de las espinas dendríticas. Kalirin -7, otra GEF específica para Rac1, regula la morfogénesis de espinas a través de su interacción con CaMKII (Xie et al., 2007). Por otro lado, GEF-H1 es específica de RhoA y es una proteína que se asocia a los receptores AMPA. La inhibición de la actividad de los receptores AMPA promueve la activación de GEF-H1 y ésta a su vez regula en forma negativa el desarrollo de las espinas a través de la activación de la cascada de RhoA (Kang et al., 2009). El uso del dominante negativo y el RNAi de GEF-H1 aumenta la densidad y la longitud de las espinas, posiblemente debido a la capacidad de RhoA de inhibir a Rac1 (Li et al., 2002). La GEF-H1 se puede unir a microtúbulos en su forma inactiva. Cuando los microtúbulos se

despolimerizan, la GEF-H1 se suelta y queda libre en el citoplasma en un estado activo y disponible para promover la unión de GTP a RhoA (Krendel et al., 2002; Chang et al., 2008). Resultados recientes señalan que MAP1B co-inmunoprecipita con la GEF-H1 en cerebro adulto (datos no publicados). Nosotros pensamos que en ausencia de MAP1B o por despolimerización de los microtúbulos, se una menos GEF-H1 a éstos, lo cual permitiría que aumente la cantidad de GEF-H1 activa y consecutivamente la activación de RhoA en las espinas. Esto provocaría una reducción en la actividad de Rac1 y por lo tanto, una disminución en la densidad y número de espinas dendríticas maduras, junto con la disminución en la función sináptica.

Adicionalmente, detectamos que las fracciones sinaptosomales post-sinápticas provenientes de los animales MAP1B (+/-) poseen una disminución en los niveles de GluR1, en comparación a las muestras provenientes de los animales control. Este resultado se correlaciona con la disminución en la amplitud de las mEPSC dependientes de los receptores AMPA, observadas en las neuronas MAP1B (-/-). La activación de los receptores AMPA por un estímulo glutamatérgico pre-sináptico, regula negativamente la vía de señalización de RhoA, generando un aumento en la densidad de espinas y el fortalecimiento de las conexiones locales con los "inputs" sinápticos (Kang et al., 2009) A través de un mecanismo similar, la vía de RhoA puede ser activada cuando el desarrollo de las espinas se ve limitado debido al bajo nivel de actividad sináptica (Kang et al., 2009). Adicionalmente, se ha descrito que la sobre-expresión de la forma WT y constitutivamente activa de Rac1 induce la agrupación de receptores AMPA, tanto en las espinas dendríticas pre-existentes como las formadas recientemente, lo cual promueve un aumento en la amplitud de las mEPSC. Recíprocamente, el uso del dominante negativo de Rac1 causa el efecto contrario, sugiriendo que Rac1 puede regular la función de las sinapsis excitatorias (Wiens et al., 2005). Como Rac1 es una molécula importante en la polimerización de actina, y la actina es esencial para el anclaje de los receptores postsinápticos de tipo NMDA, AMPA o GABA (Allison et al.,

1998), es probable que Rac1 indirectamente cause un aumento en el número de receptores AMPA en la membrana post-sináptica, a través del aumento de la actina polimerizada (Weins et al., 2005). Además, se ha visto que el aumento de las corrientes mediadas por los receptores de glutamato tipo AMPA, pueden ser inhibidas en presencia del inhibidor de la polimerización de actina, Latrunculina A (Matsuzaki et al., 2004).

Existe una amplia bibliografía en la que se describe la importancia de proteínas relacionadas con la regulación del citoesqueleto de actina, que están reguladas por la ruta de las Rho-GTPasas, en el desarrollo de espinas dendríticas. Se ha visto que proteínas como Arp2/3 (Hotulainen et al., 2009), LimK-1 (Meng et al., 2002) o el complejo ADF/cofilina (Hotulainen et al., 2009) participan en la regulación de la morfología de las espinas dendríticas. La LimK-1 es un efector río abajo común de las Rho-GTPasas y se ha descrito que fosforila e inactiva a la cofilina (Arber et al., 1998; Sumi et al., 1999; Yang et al., 1998). El complejo ADF/cofilina se localiza en la densidad postsináptica (Racz & Weinberg, 2006) y se ha visto que induce el desensamblaje de los filamentos de actina necesarios para mantener una longitud y morfología correcta de las espinas dendríticas (Bamburg et al., 1999; Carlier et al., 1999). Ratones *knockout* para LimK-1 poseen unos niveles de ADF/cofilina normales, mientras que los de cofilina fosforilada se encuentran disminuidos (Meng et al., 2002). Estos ratones tienen una morfología de espinas dendríticas alterada, ya que presentan unas espinas con un cuello más largo y una cabeza más pequeña, al igual que sucede en neuronas deficientes en MAP1B. La disminución en los niveles de fosfo-cofilina encontrados en las fracciones sinaptosomales de los animales heterocigotos para MAP1B se correlacionan con la disminución en la actividad de Rac1. Más aún, la cantidad de cofilina fosforilada en los animales heterocigotos para MAP1B está disminuida sin que haya cambios en la cantidad de cofilina total, como lo que ocurre en ausencia de la proteína LIMK-1.

En resumen, hemos presentado evidencias que sugieren que MAP1B podría estar involucrada en la formación de espinas y en la regulación de la función postsináptica

excitatoria. Es probable que la disminución en los niveles de GluR1 y consecuentemente en la amplitud de las corrientes mediadas por los receptores AMPA, vistas en las neuronas MAP1B (-/-), se deban a una disminución en la cantidad de actina polimerizada, lo cual provocaría una merma en el anclaje de los receptores AMPA en la membrana postsináptica. Futuros experimentos, en los cuales se infecten neuronas adultas y deficientes en MAP1B, con las formas constitutivamente activas de las moléculas involucradas en la polimerización de actina, tales como Rac1, LimK-1-P y cofilina-P, junto con el uso de agentes que favorecen la polimerización de actina (por ejemplo, jasplakinolide), nos ayudarán a entender si MAP1B participa en la regulación de las funciones postsinápticas a través de la regulación del citoesqueleto de actina.

### **MAP1B y neurotransmisión**

MAP1B es una proteína que además de interactuar con microtúbulos y estabilizarlos, tendría un rol como proteína de andamio. De esta manera, podría estar involucrada en una variedad de funciones celulares (Riederer., 2007). Las principales proteínas que interactúan con MAP1B son tubulina y actina, y debido a su largo tamaño, se podría esperar encontrar muchas nuevas proteínas que se unan a ella (Cueille et al., 2007). En concordancia con esto, en nuestro trabajo con la técnica del doble híbrido detectamos nuevos interactores para MAP1B-LC1 en cerebro de ratón adulto. Dentro de las proteínas encontradas en este *screening* se detectó a Snapin (Snap-associated protein). Resultó de nuestro interés la interacción entre MAP1B y Snapin, debido a que esta última es una proteína pre-sináptica que participa en la regulación de la neurotransmisión, lo que a su vez abre la posibilidad de encontrar una nueva función para MAP1B en este proceso y en estadios adultos del desarrollo neuronal.

Los extractos de fracciones sinaptosomales pre-sinápticas extraídas de corteza de ratones adultos mostraron la presencia de MAP1B en dicho compartimento, lo cual potencia la idea

antes mencionada. Snapin es una proteína soluble asociada a vesículas sinápticas y que está implicada en diversos procesos neuronales (Illardi et al., 1999; Tian et al., 2005; Pan et al., 2009; Granata et al., 2008), pero el más estudiado es su rol en la regulación de la exocitosis de vesículas sinápticas a través del complejo SNARE. Este complejo se forma cuando las proteínas asociadas a vesículas sinápticas, Sinaptotagmina I y Sinaptobrevina “v-SNAREs”, interaccionan con las proteínas asociadas a membrana pre-sináptica “t-SNAREs”, SNAP-25 y syntaxina (Wojcik & Browse 2007; Lang & Jahn, 2008). La estabilización del complejo SNARE depende de la unión de SNAP-25 a Sinaptotagmina I (Gerona et al., 2000; Chieragatti et al., 2002). Snapin se une a SNAP-25 y facilita la unión de SNAP-25 a Sinaptotagmina I. Esto ayuda a estabilizar la unión de Sinaptotagmina I al complejo SNARE, después de la despolarización inducida por la entrada de calcio. Snapin actúa como un modulador positivo del paso de “*priming*” de vesículas, ya que incrementa el número de vesículas sinápticas en el estado listo para ser liberado e incrementa su capacidad para una liberación sincronizada y eficiente. Los estudios realizados en el ratón *knockout* para Snapin muestran que su pérdida reduce el tamaño del *pool* de vesículas sinápticas listo para ser liberado y la exocitosis evocada por despolarización (Tian et al., 2005; Pan et al., 2009). Otros estudios señalan que Snapin específicamente estabiliza la unión de Sinaptotagmina I al complejo SNARE vía SNAP-25 durante el estado de fusión en el *priming*, el cual es crítico para maximizar el tamaño del *pool* de vesículas listo para ser liberado y consecuentemente para aumentar la liberación sincronizada de este *pool* (Pan et al., 2009). Por lo tanto, es importante identificar factores que regulan positiva y negativamente la interacción de SNAP-25 y Sinaptotagmina I, dependientes de Snapin. Por ejemplo, la fosforilación de Snapin en serina por la quinasa dependiente de AMPc, PKA, aumenta la interacción entre Sinaptotagmina I y Snap-25, lo cual resulta en un incremento de la probabilidad de liberación de vesículas sinápticas (Chheda et al., 2001; Thakur et al., 2004). En cambio, la proteína sináptica EDH1 compite con SNAP-25 por el mismo sitio de unión a Snapin y por lo tanto impacta negativamente sobre la exocitosis de vesículas sinápticas (Wei et al., 2010).

Nuestros estudios de inmunofluorescencia muestran que MAP1B-LC1 co-localiza con Snapin en el axón de neuronas de 12 días de incubación *in vitro*. En experimentos bioquímicos determinamos que el extremo C-terminal de Snapin, específicamente la región comprendida entre los aminoácidos 84-118, es el segmento de ésta proteína que se une a la MAP1B-LC1. Se ha descrito que esta misma región comprendida entre los aminoácidos 79-136 es la que interacciona con EDH1 y con SNAP-25. Por lo tanto se abren dos posibles escenarios para entender la interacción entre MAP1B y Snapin. En una primera interpretación, es probable pensar que la unión de MAP1B a Snapin sirva para potenciar la interacción de ésta con SNAP-25 y a su vez con Sinaptotagmina I y aumentar así la liberación de vesículas ó alternativamente, MAP1B podría competir con EDH1 por su unión a Snapin. El hecho de que MAP1B pueda potenciar la unión de estas proteínas y así fomentar la liberación de vesículas, se ve reflejado indirectamente en los experimentos de liberación de vesículas sinápticas en las neuronas de 16 DIV derivadas de los animales hipomorfos para MAP1B, ya que ellas mostraron una disminución en la tasa de liberación de vesículas sinápticas, en comparación con las neuronas control. Junto con esto vimos que las neuronas MAP1B (-/-) poseen una reducción en la densidad de los botones pre-sinápticos activos. Esta misma característica se observa en las neuronas de 16 DIV del animal *knockout* para Snapin (Pan et al., 2009). Estos resultados sugieren que MAP1B podría participar en la regulación de la neurotransmisión excitatoria. Futuros experimentos de bioquímica que se efectúen en cultivos de neuronas maduras provenientes del animal MAP1B (-/-), nos ayudarán a responder si MAP1B potencia o no la interacción de SNAP-25 con Sinaptotagmina I, a través de su unión con Snapin. Junto con esto, experimentos de microscopía electrónica de la zona activa de la densidad pre-sináptica con anticuerpos anti Snapin, nos ayudarán a ver como se ubica Snapin en las sinapsis de las neuronas MAP1B (-/-) en comparación con las silvestres. Además, estos estudios nos podrían indicar si existen diferencias en la cantidad y tamaño de vesículas en la zona presináptica. Por lo tanto, desde el punto de vista funcional, la unión de MAP1B a Snapin podría ser un mecanismo adicional que asegure la presencia de

un *pool* estable de Snapin en la zona activa en la membrana pre-sináptica de las neuronas. MAP1B podría actuar de esta forma como una proteína andamio y así, en respuesta a un estímulo, acercar a Snapin a las vesículas de la zona activa que se encuentran listas para la exocitosis y/o potenciar su interacción con SNAP-25, aumentando finalmente la velocidad de liberación de vesículas, una posibilidad que deberá ser explorada en el futuro.

Adicionalmente, se ha descrito la presencia de la cadena liviana de la MAP1A (LC2) en el compartimiento pre-sináptico y el uso de un siRNA contra ella produce una disminución en el número de botones sinápticos activos. La LC2 sería importante para el anclaje de los receptores de calcio activados por voltaje ( $Ca_v2.2$ ) en la superficie de la membrana pre-sináptica. Este proceso es esencial para la entrada de calcio inducida por actividad en las terminales nerviosas, y la subsecuente liberación de los neurotransmisores (Leenders et al., 2008). En este mismo trabajo, se detectó que la cadena liviana de MAP1B (LC1) interacciona con el dominio C-terminal de este canal ( $Ca_v2.2$ ). Sin embargo, no se llevaron a cabo experimentos funcionales que explicaran el motivo de tal interacción (Leenders et al., 2008). La disminución en la expresión de MAP1B podría estar afectando el número de canales  $Ca_v2.2$  en la membrana, lo cual explicaría, en parte, la reducción en el número de botones sinápticos activos vista en las neuronas deficientes en MAP1B. Experimentos de fluorescencia en neuronas maduras MAP1B (-/-) utilizando anticuerpos contra este canal de calcio, nos indicarán si existe una disminución en el número de estos canales en la superficie pre-sináptica.

El aporte de este trabajo de tesis fue demostrar que:

En neuronas jóvenes, el citoesqueleto de microtúbulos, a través de la proteína asociada a microtúbulos (MAP1B), puede regular el dinamismo del citoesqueleto de actina, necesario para una correcta elongación del axón.

En neuronas maduras, MAP1B participa en la regulación de las funciones postsinápticas excitatorias y de neurotransmisión, ya que la deficiencia de MAP1B produce una disminución en 1) el número de espinas dendríticas maduras 2) la amplitud de las corrientes

sinápticas excitatorias mediadas por los receptores AMPA y 3) la tasa de liberación de vesículas sinápticas. Junto con esto, describimos una nueva interacción para MAP1B con la proteína Snapin.

No sabemos aún si el fenotipo observado en las espinas dendríticas de las neuronas hipomorfas para MAP1B se debe a un efecto pre ó postsináptico. Sin embargo, pensamos que al haber una menor tasa de liberación de vesículas sinápticas, tendremos menos neurotransmisores (por ejemplo glutamato) que estimulen un aumento en el número y actividad de receptores en la membrana postsináptica, lo cual provocaría además, un aumento en el número de espinas dendríticas inmaduras. Los futuros experimentos propuestos, nos ayudarán a entender mejor la función de MAP1B en cerebro adulto.

## CONCLUSIONES

En base a los resultados descritos en la sección correspondiente podemos concluir:

MAP1B participa en la regulación de la conversación cruzada entre microtúbulos y filamentos de actina, facilitando el desarrollo del axón en neuronas jóvenes. En cerebro adulto, participa en la regulación de la función sináptica. Esto queda de manifiesto, ya que:

1. La disminución en la expresión de MAP1B produce una disminución en la actividad de las Rho-GTPasas Rac1 y cdc42 y un aumento en la actividad de RhoA en neuronas jóvenes de hipocampo en cultivo primario. De esta manera, se define una nueva función para MAP1B durante el proceso de elongación axonal.
2. MAP1B actúa como regulador de la actividad de Rac1 durante el crecimiento axonal, a través de su interacción con Tiam1.
3. La disminución en la expresión de MAP1B produce una disminución en el número y maduración de las espinas dendríticas. Además, las neuronas maduras presentan alteraciones en la actividad de los receptores AMPA. De esta forma, se define un papel para MAP1B en el compartimiento post-sináptico.
4. MAP1B se encuentra en los compartimentos pre-sinápticos de fracciones sinaptosomales de corteza de ratón adulto. Adicionalmente, interacciona con la proteína Snapin, la cual participa en la regulación de la neurotransmisión. Esta interacción entre Snapin y MAP1B podría regular los procesos de liberación de neurotransmisores.
5. La deficiencia de MAP1B produce una disminución en la tasa de liberación de vesículas sinápticas. Esto le otorga a MAP1B una función en el compartimiento pre-sináptico.

## PROYECCIONES

Las proyecciones de este trabajo de tesis son:

Determinar, mediante experimentos de pull down, si la cadena liviana de la MAP1B "LC1" es la que interacciona con la GEF de Rac1, Tiam1, en cerebro de embriones E18.

Estudiar, através de experimentos de inmunoprecipitación y colocación en cultivos de neuronas jóvenes, si MAP1B forma parte del complejo de polaridad Par3-Par6-aPKC, durante la elongación del axón.

Analizar si el fenotipo de espinas dendríticas inmaduras y disminución en la actividad de los receptores AMPA visto en las neuronas MAP1B (-/-), se debe a una disminución en la polimerización de actina. Esto se llevará a cabo mediante infecciones de las formas constitutivamente activas de algunas moléculas que regulan la formación de actina polimerizada.

Verificar, mediante experimentos de inmunofluorescencia en neuronas maduras, si la disminución en la expresión de MAP1B tiene efecto sobre el número de canales de calcio Ca<sub>v</sub>2.2 en la membrana pre-sináptica.

Estudiar, mediante microscopía electrónica en neuronas adultas, si existe algún cambio en la cantidad y tamaño de las vesículas sinápticas en las neuronas MAP1B (-/-)

Analizar, mediante experimentos de inmunoprecipitación en cultivos de neuronas MAP1B (-/-) maduras, si MAP1B potencia la interacción de Snap-25 y Sinaptotagmina I, através de su unión con la proteína Snapin.

## BIBLIOGRAFÍA

Allen E, Ding J, Wang W, Pramanik S, Chou J, Yau V, Yang Y. 2005. Gigaxonin-controlled degradation of MAP1B light chain is critical to neuronal survival. *Nature*. 438,224-8.

Allison, D.W., Gelfand, V. I., Spector, I. and Craig, A. M. 1998. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J. Neurosci*. 18, 2423-2436.

Amano M, Mukai H, Ono Y, Chihara K, Matsui T, Hamajima Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. 1996 Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science*. 2,648-50.

Arber, S., Barbayannis, F.A, Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., and Caroni, P. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809.

Arimura, N., and Kaibuchi, K. 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature reviews* 8, 194-205.

Avila, J., Dominguez, J., and Diaz-Nido, J. 1994. Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *The International Journal of Developmental Biology* 38, 13-25.

Bamburg, J. R., and Bray, D. 1987. Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* 105, 2817-2825.

Bamburg, J. R. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 185-230.

Banker, G.A., and Cowan, W.M. 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126, 397-342.

Barra HS, Arce CA, Argaraña CE. 1988. Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol Neurobiol*; 2(2):133-53.

Bishop, A. L., and Hall, A. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348(Pt 2), 241-255.

Birkenfeld J, Nalbant P, Yoon SH, Bokoch GM. 2008. Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis? *Trends Cell Biol.* 18, 210-9.

Black, M. M., Slaughter, T., and Fischer, I. 1994. Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. *J. Neurosci.* 14, 857-870.

- Bloom, G.S., Luca, F.C., and Vallee, R.B. 1985. Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of the neuronal cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 5404-5408.
- Bomont P, Koenig M. 2003 Intermediate filament aggregation in fibroblasts of giant axonal neuropathy patients is aggravated in non dividing cells and by microtubule destabilization. *Hum Mol Genet.* 15, 813-22.
- Boyne LJ, Martin K, Hockfield S, Fischer I. 1995. Expression and distribution of phosphorylated MAP1B in growing axons of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 40, 439-50
- Bradke, F., and Dotti, C. G. 1997. Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron* 19, 1175-1186.
- Bradke, F., and Dotti, C. G. 1999. The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283, 1931-1934.
- Bullinski, Jc & Gundersen, G.G. 1991. Stabilization of posttranslational modifications of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays* 13, 285-293.
- Burnette DT, Ji L, Schaefer AW, Medeiros NA, Danuser G, Forscher P. 2008. Myosin II activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Dev Cell.* 15, 163-9.
- Bush MS, Goold RG, Moya F, Gordon-Weeks PR. 1996 An analysis of an axonal gradient of phosphorylated MAP 1B in cultured rat sensory neurons. *Eur J Neurosci.* 8, 235-48.
- Bush MS, Tonge DA, Woolf C, Gordon-Weeks PR. 1996. Expression of a developmentally regulated, phosphorylated isoform of microtubule-associated protein 1B in regenerating axons of the sciatic nerve. *Neuroscience.* 73, 553-63.
- Carrier, M.F., Ressad, F., and Pantaloni, D. 1999. Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 33827-33830.
- Carlin, R.K., D.J. Grab, R.S. Cohen, and P. Siekevitz. 1980. Isolation and Characterization of postsynaptic densities from various brain regions. enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biology.* 86, 831-845.
- Chang YC, Nalbant P, Birkenfeld J, Chang ZF, Bokoch GM. 2008. GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol Biol Cell.* 19, 2147-53.
- Chheda MG, Ashery U, Thakur P, Rettig J, Sheng ZH. 2001. Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat Cell Biol.* 4, 331-8.
- Chieriegatti E, Witkin JW, Baldini G. 2002. SNAP-25 and synaptotagmin 1 function in Ca<sup>2+</sup>-dependent reversible docking of granules to the plasma membrane. *Traffic.* 7, 496-511

- Chowdhury K, Bonaldo P, Torres M, Anastasia Stoykova and P Gruss. 1997. Evidence for stochastic integration of gene trap vectors into the mouse germline. *Nucleic Acid Research*. 25, 1531-1536.
- Collins, M.O., Yu, L., Coba, M.P., Husi, H., Campuzano, I., Blackstock, W.P., Choudhary, J.S., and Grant, S.G. 2005. Proteomic analysis of in vivo phosphorylated synaptic proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 5972-5982.
- Conde Cecilia and Alfredo Cáceres. 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 319-332.
- Cueille, N., Blanc, C. T., Popa-Nita, S., Kasas, S., Catsicas, S., Dietler, G., and Riederer, B. M. 2007. Characterization of MAP1B heavy chain interaction with actin. *Brain Res. Bull.* 71, 610-618.
- Da Silva, J. S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., and Dotti, C. G. 2003. RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol.* 162, 1267-1279.
- Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A., Hall, A. 2001. Rac/ cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J. Biol. Chem.* 276, 1677-1680.
- Dehmelt L, Halpain S. 2005. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6(1):204.
- Del Río JA, González-Billault C, Ureña JM, Jiménez EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simó S, La Torre A, Wandosell F, Avila J, Soriano E. 2004. MAP1B is required for Netrin1 signalling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr Biol.* 25, 840-50.
- Dent EW, Gertler FB. 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron.* 9; 209-27.
- Dent EW, Tang F, Kalil K. 2003. Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist.* 9, 343-53.
- Diaz-Nido, J., Serrano, L., Mendez, E., and Avila, J. 1988. A casein kinase II-related activity is involved in phosphorylation of microtubule-associated protein MAP-1B during neuroblastoma cell differentiation. *The Journal of Cell Biology* 106, 2057-2065.
- Dillon, C., and Goda, Y. 2005. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annual Review of Neuroscience* 28, 25-55.
- Ding J, Liu JJ, Kowal AS, Nardine T, Bhattacharya P, Lee A, Yang Y. 2002. Microtubule-associated protein 1B: a neuronal binding partner for gigaxonin. *J Cell Biol.* 158, 427-33.
- Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, Scita G. 2005. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci.* 62, 955-70
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neuroscience.* 8:1454-68.

Edelmann, W., Zervas, M., Costello, P., Roback, L., Fischer, I., Hammarback, J. A., Cowan, N., Davies, P., Wainer, B., and Kucherlapati, R. 1996. Neuronal abnormalities in microtubule-associated protein 1B mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1270-1275.

Ethell IM, Pasquale EB. 2005. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol.* 75,161-205.

Eyer J & Peterson A. 1994 Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein *Neuron* 12(2):389-405.

Falke LC, Gillis KD, Pressel DM, Misler S. 1989'Perforated patch recording' allows long-term monitoring of metabolite-induced electrical activity and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in pancreatic islet B cells. *FEBS Lett.* 251,167-72.

Fischer, M., Kaech, S., Wagner, U., Brinkhaus, H. and Matus, A. 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* 3, 887-894.

Fleming, I.N., Elliott,C.M., Buchanan, F.G., Downes C.P., and Exton J,H.1999.Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates Tiam1by reversible protein phosphorylation. *J.Biol.Chem* 274, 12753-12758.

Fukata, M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Kuroda S., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., and Kaibuchi K. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* 109, 873-885.

Garcia-Perez, J., Avila, J., and Diaz-Nido, J. 1998. Implication of cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3 in the phosphorylation of microtubule-associated protein 1B in developing neuronal cells. *Journal of Neuroscience Research*52, 445-452.

Garner, C.C., Garner, A., Huber, G., Kozak, C., and Matus, A. 1990. Molecular cloning of microtubule-associated protein 1 (MAP1A) and microtubule-associated protein 5 (MAP1B): identification of distinct genes and their differential expression in developing brain. *Journal of Neurochemistry* 55, 146-154.

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

Gerona RR, Larsen EC, Kowalchyk JA, Martin TF. 2000. The C terminus of SNAP25 is essential for Ca<sup>2+</sup>-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. *J Biol Chem.* 275,6328-36.

Goold, R.G., Owen, R., and Gordon-Weeks, P.R. 1999. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *Journal of Cell Science* 112 ( Pt 19), 3373-3384.

Govek, E.E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & development* 19, 1-49.

Gonzalez-Billault, C., Demandt, E., Wandosell, F., Torres, M., Bonaldo, P., Stoykova, A., Chowdhury, K., Gruss, P., Avila, J., and Sanchez, M. P. 2000. Perinatal lethality of

microtubule-associated protein 1B-deficient mice expressing alternative isoforms of the protein at low levels. *Mol. Cell Neurosci.* 16, 408–421.

Gonzalez-Billault, C., Avila, J., and Caceres, A. 2001. Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol. Biol. Cell* 12, 2087–2098

González-Billault C, Del Río JA, Ureña JM, Jiménez-Mateos EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simó S, Torre AL, Gavin R, Wandosell F, Soriano E, Avila J.2005. A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration. *Cereb Cortex.*15, 1134-45.

Granata A, Watson R, Collinson LM, Schiavo G, Warner TT. 2008 The dystonia-associated protein torsinA modulates synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem.* 283,7568-79.

Gu J, Firestein BL, Zheng JQ. 2008.Microtubules in dendritic spine development. *Journal of Neuroscience* .28,12120-4

Gu, J., and Zheng, J.Q. 2009. Microtubules in Dendritic Spine Development and Plasticity. *The Open Neuroscience Journal* 3, 128-133.

Gungabissoon RA & Bamberg JR.2003. Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem* 51(4) 411-420.

Hall, A .1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.

Hall A and Lalli G. 2010.Rho and RasGTPases in axon growth, guidance and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol*2 (2):a001818.

Halpain S, Dehmelt L. 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.*;7,224.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*391,85-100.

Hammond J.C, Cai D and Verhey K. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.*20, 71-76.

Hammarback JA Obar RA, Hughes SM, Vallee RB.1991.MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N- terminal microtubule-binding protein. *Neuron*, 7:129-139.

Hanley JG, Jones EM, Moss SJ. 2000GABA receptor rho1 subunit interacts with a novel splice variant of the glycine transporter, GLYT-1. *J Biol Chem.* 275,840-6.

Harris, K.M., and Kater, S.B. 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual Review of Neuroscience* 17, 341-371.

Hoogenraad C and F. Bradke.2009, Control of neuronal polarity and plasticity- a renaissance for microtubules? *Trends in Cell Biology* 19, 669-676.

Hirokawa N, Takemura R. 2005 Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci.* 6, 201-14.

Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpää K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P. 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol.* 185,323-39

Hu, X., Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E., and Dent, E.W. 2008. Activity dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *J Neuroscience* 28, 13094-13105.

Ilardi JM, Mochida S, Sheng ZH. 1999 Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. *Nat Neurosci.* 2,119-24.

Ik-Tsen Heng, J., Chariot, A., and Nguyen, L. 2009. Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development. *Cell Press* 33(1), 38-47.

Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., and Kaibuchi, K. 2001. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 781-782.

Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, Furuyashiki T, Kato T, Narumiya S. 2001. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDial. *Nat Cell Biol.* 3,8-14.

Jaffe AB, Hall A. 2005. RhoGTPases: biochemistry and biology *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21,247-69.

Jaworski, J., Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortland, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S.A., Di Stefano, P., Demmers, J., Krugers, H., Defilippi, P., Akhmanova, A., and Hoogenraad, C.C. 2009. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61, 85-100.

Kaech, S., Parmar, H., Roelandse, M., Bornmann, C., and Matus, A. 2001. Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7086-7092.

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

Kang, M.G., Guo, Y., and Huganir, R.L. 2009. AMPA receptor and GEF-H1/Lfc complex regulates dendritic spine development through RhoA signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3549-3554.

Kawakami, S., Muramoto, K., Ichikawa, M., and Kuroda, Y. 2003. Localization of microtubule-associated protein (MAP) 1B in the postsynaptic densities of the rat cerebral cortex. *Cellular and molecular neurobiology* 23, 887-894.

Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K. 1999. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *Journal of cell Biology* 29,1023-38.

- Kitamura Chikara, Shirai Kyoko, Inoue Madoka, and Tashiro Tomoko .2007. Changes in the subcellular distribution of microtubule-associated protein 1b during synaptogenesis of cultured rat cortical neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology* 27:57- 73
- Krendel, M., Zenke, F. T., and Bokoch, G. M. 2002. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 4, 294–301.
- Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K., and Caceres, A. 2001. Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J. Neurosci.* 21, 2361–2372.
- Lang T, Jahn R. 2008. Core proteins of the secretory machinery. *Handb Exp Pharmacol.*184,107-27.
- Leenders AGMiriam,Lin Lin,Huang Li-Dong,Gerwin Claudia,Lu Pei-Huaand Zu-Hang Zheng,2008.The role of MAP1A light chain 2 in synaptic surface retention of Ca<sub>v</sub>2.2 channels in hippocampal neurons.*Journal of Neuroscience.* 28, 11333-11346.
- Li, Z., Aizenman, C.D., and Cline, H.T. 2002. Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo. *Neuron* 33, 741-750.
- Liqun Luo.2000.Rho GTPases in neuronal morphogenesis *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 173–180
- Liqun, L. 2002. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 601–635
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase *Science* 285, 895–898.
- Malenka RC, Nicoll RA. 1999. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science.* 17,1870-4.
- Matsuzaki ; M Honkura, N, Ellis Davies, G.C and Kasai H .2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761-766.
- Matus, A., and Riederer, B. 1986. Microtubule-associated proteins in the developing brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 466, 167-179.
- Matus A. 1988.Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci.* 11:29-44.
- Matus, A. 1991. Microtubule-associated proteins and neuronal morphogenesis. *J Cell Sci Suppl* 15, 61-67.
- Matus, A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science (New York, N.Y)* 290, 754-758.
- Mei X, Sweatt AJ, Hammarback JA 2000b Regulation of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) subunit composition. *Journal Neuroscience Res*, 62:56-64

- Meixner, A., Haverkamp, S., Wassle, H., Fuhrer, S., Thalhammer, J., Kropf, N., Bittner, R. E., Lassmann H., Wiche, G., and Probst, F. 2000. MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* *151*, 1169–1178.
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W.Y., MacDonald, J.F., Wang, J.Y., Falls, D.L., and Jia, Z. 2002. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* *35*, 121-133
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Falls, D.L., and Jia, Z. 2003. Regulation of spine morphology and synaptic function by LIMK and the actin cytoskeleton. *Reviews in the Neurosciences* *14*, 233-240.
- Michiels, F., Habets, G.G., Stam, J.C., van der Kammen, R.A., and Collard, J.G. 1995. A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* *375*, 338-340.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* *1*, 761-772.
- Montenegro-Venegas, C., Tortosa, E., Rosso, S., Peretti, D., Bollati, F., Bisbal, M., Jausoro, I., Avila, J., Caceres, A., and Gonzalez-Billault, C. 2010. MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity. *Molecular Biology of the Cell* *21*, 3518-3528.
- Moreno, F.J., Diaz-Nido, J., Jimenez, J.S., and Avila, J. 1999. Distribution of CK2, its substrate MAP1B and phosphatases in neuronal cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* *191*, 201-205.
- Nakayama, A.Y., Harms, M.B., and Luo, L. 2000. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neuroscience* *20*, 5329-5338
- Nakayama M, Goto TM, Sugimoto M, Nishimura T, Shinagawa T, Ohno S, Amano M, Kaibuchi K. 2008. Rho-kinase phosphorylates PAR-3 and disrupts PAR complex formation. *Dev Cell.* *14*, 205-15.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B. J., and Luo, L. 2002. Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* *416*, 442–447.
- Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M., and Kaibuchi, K. 2005. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42- induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat. Cell Biol.* *7*, 270–277.
- Noble M, Lewis SA, Cowan NJ. 1989. The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J Cell Biol.* *109*, 3367-76
- Nothias, F., Fischer, I., Murray, M., Mirman, S., and Vincent, J.D. 1996. Expression of a phosphorylated isoform of MAP1B is maintained in adult central nervous system areas that retain capacity for structural plasticity. *The Journal of Comparative Neurology* *368*, 317-334.

- Oelz Dietmar, Schmeiser Christian and Small J. Victor. 2008 Modeling of the actin-cytoskeleton in symmetric lamellipodial fragments. *Cell Adhesion & Migration* 2:2, 117-126.
- Paglini G, Pigino G, Kunda P, Morfini G, Maccioni R, Quiroga S, Ferreira A, Cáceres A. 1998. Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth. *J Neurosci.* 18,9858-69.
- Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gundersen GG. 2001.  $\alpha$ -Tubulin mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol.*, 723-9.
- Pan P., Tian J., and Sheng Z. 2009. Snapin facilitates the Synchronization of Synaptic Vesicle Fusion. *Neuron* 61,412-424.
- Pattnaik B, Jellali A, Sahel J, Dreyfus H, Picaud S. 2000. GABAC receptors are localized with microtubule-associated protein 1B in mammalian cone photoreceptors. *J Neurosci.* 20,6789-96.
- Pedrotti, B., and Islam, K. 1996. Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments. *FEBS Lett.* 388, 131-133
- Peng I, Binder LI, Black MM. 1985 Cultured neurons contain a variety of microtubule-associated proteins. *Brain Res.* 361,200-11.
- Peng, J., Kim, M.J., Cheng, D., Duong, D.M., Gygi, S.P., and Sheng, M. 2004. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 21003-21011.
- Pilpel, Y., and Segal, M. 2004. Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *The European Journal of Neuroscience* 19, 3151-3164.
- Poulain F, Sobel A. 2010. The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Molecular and Cellular Neuroscience* 43; 15-32.
- Racz, B., and Weinberg, R.J. 2006. Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience* 138, 447-456.
- Riederer, B. M. 2007. Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res. Bull.* 71, 541-558.
- Rust MB., Gurniak CB., Renner M., Vara H., Morando L., Görlich A., Sassoé-Pognetto M., Banchaabouchi MA., Giustetto M., Triller A., Choquet D., Witke W. 2010. Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J* 29;1889-902.
- Ruthel, G., and Banker, G. 1999. Role of moving growth cone-like "wave" structures in the outgrowth of cultured hippocampal axons and dendrites. *J. Neurobiol.* 39, 97-106.

- Ruthel G, Hollenbeck PJ. 2000. Growth cones are not required for initial establishment of polarity or differential axon branch growth in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 15,2266-74
- Sander, E. E., ten Kooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. 1999. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell Biol.* 5, 1009–1022.
- Sarmiere, P. D., and Bamberg, J. R. 2004. Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *J. Neurobiol.* 58, 103–117.
- Schmidt A, Hall A 2002. Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: turning on the switch *Genes Dev.* 16,1587-609.
- Schoenfeld, T.A., McKerracher, L., Obar, R., and Vallee, R.B. 1989. MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J Neurosci* 9, 1712-1730.
- Sekino, Y., Kojima, N., and Shirao, T. 2007. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry International* 51, 92-104
- Seog Dae-Hyun .2004. Glutamate-receptor interacting protein 1 protein binds to the microtubule-associated protein. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1808-1810.
- Sheng M, Hoogenraad CC. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem.*76, 823-47.
- Sosa, L., Dupraz, S., Laurino, L., Bollati, F., Bisbal, M., Caceres, A., Pfenninger, K. H., and Quiroga, S. 2006. IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* 9, 993–995.
- Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y., and Nakamura, T. 1999. Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *The Journal of Cell Biology* 147, 1519-1532.
- Tada, T., and Sheng, M. 2006. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current opinion in neurobiology* 16, 95-101.
- Thakur P, Stevens DR, Sheng ZH, Rettig J. 2004 Effects of PKA-mediated phosphorylation of Snapin on synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 24,6476-81.
- Takefuji, M., Mori K, Morita Y, Arimura N, Nishimura T, Nakayama M, Hoshino M, Iwamatsu A, Murohara T, Kaibuchi K, Amano M. 2007. Rho-kinase modulates the function of STEF, a Rac GEF, through its phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 788–794.
- Takei, Y., Kondo, S., Harada, A., Inomata, S., Noda, T., and Hirokawa, N. 1997. Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J. Cell Biol.* 137, 1615–1626.

- Takei, Y., Teng, J., Harada, A., and Hirokawa, N. 2000. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *The Journal of Cell Biology* 150, 989-1000.
- Takemura R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. 1992 Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci.*103,953-64.
- Tashiro, A., Minden, A., and Yuste, R. 2000. Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex*10, 927-938.
- Tashiro, A., and Yuste, R. 2004. Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Molecular and Cellular Neurosciences* 26, 429-440.
- Tashiro, A., and Yuste, R. 2008. Role of Rho GTPases in the morphogenesis and motility of dendritic spines. *Methods in enzymology* 439, 285-302.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. The molecular biology of axonal guidance. *Science*. 15,1123-33
- Tian J., Wu Z., Unzicker M., Lu L., Cai Q., Li C., Schirra C., Matti U., Stevens D., Deng C., Rettig J and Sheng Z. 2005. The Role of snapin in neurosecretion: snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells. *Journal of Neuroscience* November 9; 25(45): 10546-10555.
- Togel, M., Wiche, G., and Propst, F. 1998. Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *The Journal of cell biology* 143, 695-707.
- Tolias, K.F., Bikoff, J.B., Burette, A., Paradis, S., Harrar, D., Tavazoie, S., Weinberg, R.J., and Greenberg, M.E. 2005. The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron* 45, 525-538.
- Tucker, R.P., Binder, L.I., and Matus, A.I. 1988. Neuronal microtubule-associated proteins in the embryonic avian spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 271, 44-55.
- Tucker, R.P., and Matus, A.I. 1988. Microtubule-associated proteins characteristic of embryonic brain are found in the adult mammalian retina. *Developmental biology* 130, 423-434.
- Tucker, R.P., Garner, C.C., and Matus, A. 1989. In situ localization of microtubule associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron* 2, 1245-1256.
- Tymanskyj, S.R., Lin, S., and Gordon-Weeks, P.R. 2010. Evolution of the spatial distribution of MAP1B phosphorylation sites in vertebrate neurons. *Journal of anatomy* 216, 692-704.
- Ulloa, L., Avila, J., and Diaz-Nido, J. 1993a. Heterogeneity in the phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during rat brain development. *Journal of Neurochemistry* 61, 961-972.

- Ulloa, L., Diez-Guerra, F.J., Avila, J., and Diaz-Nido, J. 1994. Localization of differentially phosphorylated isoforms of microtubule-associated protein 1B in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 61, 211-223
- Utreras, E., Jimenez-Mateos, E. M., Contreras-Vallejos, E., Tortosa, E., Perez, M., Rojas, S., Saragoni, L., Maccioni, R. B., Avila, J., and Gonzalez-Billault, C. 2008. Microtubule-associated protein 1B interaction with tubulin tyrosine ligase contributes to the control of microtubule tyrosination. *Dev. Neurosci.* 30, 200-210.
- Vallee, R.B. 1982. A taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs). *The Journal of Cell Biology* 92, 435-442.
- Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development* 11, 2295-2322.
- Van Leeuwen F,N, Kain H, Van der Kammen Rob A, Michiels F, Kranenburg and J G.Collard.1997.The Guanine Nucleotide Exchange Factor Tiam1 affects neuronal morphology: Opposing roles for the small GTPases Rac and Rho.The Journal of Cell Biology.139,797-807.
- Vecino, E., and Avila, J. 2001. Distribution of the phosphorylated form of microtubule associated protein 1B in the fish visual system during optic nerve regeneration. *Brain Research Bulletin* 56, 131-137.
- Viereck, C., Tucker, R.P., and Matus, A. 1989. The adult rat olfactory system expresses microtubule-associated proteins found in the developing brain. *J Neuroscience* 9, 3547-3557.
- Watabe-Uchida, M., Keisha, J., Janas Justyna, A., Newey, S. E., and Van Aelst, L. 2006. The Rac activator Dock7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron* 51, 727-739.
- Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K.2005. Roles of IQGAP1 in cell polarization and migration. *Novartis Found Symp.* 2005;269:92-101; discussion 101-5, 223-30.
- Watanabe T, Noritake J, Kakeno M, Matsui T, Harada T, Wang S, Itoh N, Sato K, Matsuzawa K, Iwamatsu A, Galjart N, Kaibuchi K.2009. Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3beta regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *J Cell Science*15: 2969-79.
- Waterman-Storer, C. M., Worthylake, R. A., Liu, B. P., Burridge, K., and Salmon, E. D. 1999. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 1, 45-50.
- Wei S., Xu Y., Shi H., Wong S., Han W., Talbot K., Hong W., Ong W.2010.EDH1 is a synaptic protein that modulates exocytosis through binding to snapin. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2010 Dec; 45(4):418-29.
- Wen Y, Eng CH, Schmoranzler J, Cabrera-Poch N, Morris EJ, Chen M, Wallar BJ, Alberts AS, Gundersen GG. 2004.EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 6,820-30.

- Wiens KM, Lin H, Liao D. 2005 Rac1 induces the clustering of AMPA receptors during spinogenesis. *J Neurosci.* 25,10627-36.
- Witzmann FA, Arnold RJ, Bai F, Hrnairova P, Kimpel MW, Mechref YS, McBride WJ, Novotny MV, Pedrick NM, Ringham HN, Simon JR. 2005. A proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes. *Proteomics.* 5, 2177-2201.
- Witte, H., Neukirchen, D., and Bradke, F. 2008. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J. Cell Biol.* 180, 619-632.
- Wittmann, T., and Waterman-Storer, C. M. 2001. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.* 114, 3795-3803.
- Wittmann, T., Bokoch, G. M., and Waterman-Storer, C. M. 2004. Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1. *J. Biol. Chem.* 279 (7), 6196-6203.
- Wojcik SM, Brose N. 2007. Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: speed and accuracy matter. *Neuron.* 55,11-24.
- Xie Z, Srivastava DP, Photowala H, Kai L, Cahill ME, Woolfrey KM, Shum CY, Surmeier DJ, Penzes P. 2007. Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron.* 56,640-56.
- Xue F, Deanna M. Janzen, and David A. Knecht.2010. Contribution of Filopodia to Cell Migration: A Mechanical Link between Protrusion and Contraction. *International Journal of Cell Biology* 1-13.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., and Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 393, 809-812.
- Yang, N., Higuchi, O., and Mizuno, K. 1998. Cytoplasmic localization of LIM-kinase 1 is directed by a short sequence within the PDZ domain. *Experimental Cell Research* 241, 242-252.
- Zhang, H., and Macara, I.G. 2008. The PAR-6 polarity protein regulates dendritic spine morphogenesis through p190 RhoGAP and the Rho GTPase. *Developmental Cell* 14, 216-226.