

UCH-FC
Biotecnología
B666
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE PREGRADO

**Caracterización de la expresión de Septina 8 en sistema
nervioso central y periférico**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular,
por:

FELIPE JOSÉ BODALEO TORRES

Director del Seminario de Título:

Dr. Alejandro Roth Metcalfe

Agosto, 2015

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

FELIPE JOSÉ BODALEO TORRES

“Caracterización de la expresión de Septina 8 en sistema nervioso central y periférico”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Alejandro Roth Metcalfe
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul del Dr. Alejandro Roth Metcalfe.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Cecilia Vergara Montecinos
Presidenta

Firma manuscrita en azul de la Dra. Cecilia Vergara Montecinos.



Dr. Jorge Mpodozis Marín
Evaluador

Firma manuscrita en azul del Dr. Jorge Mpodozis Marín.

Santiago, Agosto de 2015



Nací el 3 de abril de 1986 en Santiago de Chile, mi madre es Claudia Torres Meneses y mi padre Harry Bodaleo Sánchez. Cursé educación básica y media en el Colegio Santa Cruz de Santiago. El año 2004 ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, lugar donde inicié mi formación como científico.

Durante el año 2008 me incorporé al naciente Laboratorio de Neuroglías, con la motivación de aprender conceptos básicos de neurociencia. En aquellos años, mis primeros pasos en la ciencia experimental fueron acompañados con más de algún tropiezo. Sin embargo el trabajo que desarrollé por aquel entonces hoy rinde sus frutos y queda plasmado en las siguientes páginas.

Mirando en retrospectiva, la etapa que culmina con esta tesis fue la que me dio las herramientas básicas para poder desenvolverme en la investigación científica.

Dedicada a mi madre y a mi padre, por
todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al Dr. Alejandro Roth por haber depositado en mí su confianza para llevar a cabo la presente tesis. Agradezco también a los miembros de la comisión evaluadora: Dr. Jorge Mpodozis, y en especial a la Dra. Cecilia Vergara por su dedicación en la corrección de este trabajo.

A mis compañeros en el laboratorio de Neuroglías con los que compartí hace ya bastantes años: Máximo, Severin, Cristian y Gato. También a todas aquellas personas del Rayo, Biología Vegetal y CENEDYN que me brindaron ayuda técnica y teórica durante el desarrollo de esta tesis.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, en particular a mi madre Claudia y a mi padre Harry por apoyarme hasta el día de hoy durante mi carrera científica.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
Células gliales en sistema nervioso central y periférico.....	1
Función y estructura de la vaina de mielina.....	4
La familia de proteínas Septinas	10
HIPÓTESIS	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Materiales y reactivos	19
Extracción ARN total.....	20
Transcripción reversa	20
Generación sonda ARN SEPT8 antisentido.....	22
Hibridación <i>in situ</i>	22
Clonamiento de vectores que codifican proteínas de fusión.....	24
Inducción de expresión bacteriana, SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.....	25

Precipitación ADN plasmidial con etanol.....	26
Transfección transiente de ADN plasmidial.....	26
RESULTADOS.....	28
Diseño de partidores específicos para el ADNc de SEPT8	28
Expresión de SEPT8 en cerebro total y nervio ciático durante etapa adulta determinada mediante RT-PCR.....	31
SEPT8 se expresa en distintas regiones de cerebro adulto y en nervio ciático, determinado mediante hibridación <i>in situ</i>	33
Clonamiento de la proteína de fusión GST-SEPT8	43
purificación de la proteína de fusión y cambiar la estrategia experimental para analizar la localización subcelular de SEPT8.....	45
EGFP-SEPT8 presenta una localización aparente asociada a la membrana plasmática	46
DISCUSIÓN	50
Presencia de ARNm de SEPT8 en fibras mielinizadas.....	50
Mantención de los dominios subcelulares de la mielina: Un posible rol para las Septinas. ...	53
Purificación de la proteína GST-SEPT8 recombinante.....	58
Expresión de SEPT8 en hipocampo, corteza y cerebelo	60
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células mielinizantes en sistema nervioso central y sistema nervioso periférico.....	3
Figura 2. Estructura del axolema y de la vaina de mielina.	6
Figura 3. Ultraestructura de la mielina y composición de sus sub-dominios.	8
Figura 4. Regiones del cerebro de ratón analizadas mediante hibridación <i>in situ</i>	23
Figura 5. Generación de partidores específicos contra la región C-terminal de SEPT8.	29
Figura 6. SEPT8 se expresa en nervio ciático y en cerebro de ratón adulto.....	32
Figura 7. Generación de la sonda de ARN contra SEPT8 utilizada en ensayos de hibridación <i>in situ</i>	34
Figura 8. Expresión del ARNm de SEPT8 en hipocampo de cerebro adulto.....	36
Figura 9. Expresión del ARNm de SEPT8 en corteza de cerebro adulto.	39
Figura 10. Expresión del ARNm de SEPT8 en cerebelo de cerebro adulto.	41
Figura 11. Expresión del ARNm de SEPT8 en nervio ciático adulto.	43
Figura 12. Generación y expresión de la proteína GST-SEPT8.....	45
Figura 13. Localización de EGFP-SEPT8 en células TC620 es asociada a membrana plasmática.	48
Figura 14. Posibles mecanismos de traducción del ARNm de SEPT8.....	52
Figura 15. Citoesqueleto de Septinas funciona como barrera a la difusión manteniendo los dominios subcelulares en células mielinizantes.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Caspr	<i>Contactin-associated protein</i>
CPO	Célula precursora de oligodendrocitos
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
CNPase	<i>2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>
Cnx32	Conexina 32
DEPC	Dietil-pirocarbonato
EUS	Elemento único de Septinas
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GTP	<i>Guanosine-5'- triphosphate</i>
kDa	Kilo Dalton
LPN	<i>Loop Paranodal</i>
MAG	<i>Myelin-associated glycoprotein</i>
MAL	<i>Myelin and lymphocyte protein</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MT	Microtúbulos
N-terminal	Extremo amino terminal
P ₀	<i>Protein zero</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PLP	<i>Myelin proteolipid protein</i>
PSD	<i>Post Synaptic Density</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription PCR</i>
SEPT8	Septina 8
SMC	Sitio de múltiple clonamiento
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico

RESUMEN

Las Septinas son una familia de proteínas GTPasas citoplasmáticas ampliamente distribuidas entre eucariontes y que presentan un alto porcentaje de identidad entre ellas. La presencia de Septina 8 (SEPT8) en proteoma de mielina y su posible función en la barrera a la difusión que mantiene los subdominios de dicha estructura: la mielina compacta y los canales citoplasmáticos, nos llevó a caracterizar su patrón de expresión en sistema nervioso central y periférico. Se generaron partidores específicos para detectar la expresión de ARNm de SEPT8 y no de otros miembros de esta familia de proteínas. Se detectó la expresión del ARNm de SEPT8 en tejido de cerebro entero y nervio ciático de ratón adulto mediante RT-PCR. Ensayos de hibridación *in situ* en cortes de cerebro entero de ratón muestran la distribución de SEPT8 en distintas regiones del hipocampo, corteza y cerebelo, con un patrón de expresión espacial asociado a estructuras fibrilares y a terminales nerviosos, lo que permite proponer que al igual que la proteína básica de la mielina (MBP), SEPT8 se traduciría asociado a la mielina, o al axón mielinizado. De manera similar, observamos que el ARNm de SEPT8 en tejido de nervio ciático también se encuentra asociado a fibras longitudinales. Estudios de sobreexpresión en la línea de oligodendroglioma TC620 con la proteína de fusión EGFP-SEPT8 muestran una localización aparentemente asociada a membrana plasmática. En el presente trabajo hemos descrito el patrón de expresión espacial del ARNm de Septina 8 en sistema nervioso central y periférico, como también en parte su localización subcelular, lo que nos

permite proponer un posible mecanismo en donde SEPT8 participaría en la estructuración de la vaina de mielina.

ABSTRACT

Septins are a cytoplasmic GTPase protein family that is broadly distributed among eukaryotes and present a high percentage of identity between them. The presence of Septin 8 (SEPT8) in the myelin proteome and its possible role in formation of the diffusion barrier that separates the subcellular domains of this structure (compact myelin and cytoplasmic loops) led us to characterize its expression pattern in central and peripheral nervous system. We designed specific PCR primers in order to detect the expression of SEPT8 mRNA and no other members of the Septin family. Using RT-PCR, we detected the expression of SEPT8 mRNA in whole brain and sciatic nerve of adult mice. *In situ* hybridization assays in mouse brain slices revealed that SEPT8 distributes in different regions of the hippocampus, cortex and cerebellum, with a spatial expression pattern associated with fibers and nervous terminals, allowing us to propose that, like the Myelin Basic Protein (MBP), SEPT8 mRNA could be translated associated with the myelin sheath or to the myelinated axon. Similarly, SEPT8 mRNA in sciatic nerve was also detected in longitudinal fibers. Over-expression assays with the fusion protein EGFP-SEPT8 in TC620 oligodendrogloma cell line showed that this protein apparently associates with the plasma membrane. In this work we have described the spatial distribution of SEPT8 in central and peripheral nervous system, and partly its subcellular location. This allows us to propose a possible mechanism by which SEPT8 participates in the structure of the myelin sheath.

INTRODUCCIÓN

Células gliales en sistema nervioso central y periférico.

Las funciones sensoriales, motoras e integradoras ejecutadas por el sistema nervioso en vertebrados se basan en su estructura y en la comunicación que se establece entre sus distintos componentes celulares. Comúnmente, esta funcionalidad es atribuida exclusivamente a las propiedades de sus células eléctricamente excitables, las neuronas. Existe, sin embargo, otra clase de células en el sistema nervioso, las que colectivamente reciben el nombre genérico de glías o neuroglías (Aschner y col., 1999). Estudios recientes de anatomía comparada han determinado que el cerebro humano posee una cantidad similar de neuronas y glías, aproximadamente 90 billones (90×10^9) de cada uno de estos tipos celulares (Herculano-Houzel, 2009). La noción de la existencia de estas células no-neuronales data de mediados del siglo XIX, cuando Rudolph Virchow utilizó por primera vez el término *nervenkitt* o neuroglía, para referirse al tejido conectivo formado por elementos celulares que se encuentra presente en el cerebro (Virchow, 1856; Somjel 1988). Trabajos desarrollados en los años venideros por connotados neurocientíficos, entre los que destacan Santiago Ramón y Cajal y su discípulo Río Hortega, lograron determinar que la neuroglía no eran sino células individuales distintas a las neuronas, e incluso se les llegó a atribuir roles fundamentales en el correcto funcionamiento del sistema nervioso (Somjel, 1988).

En términos generales las glías representan una población heterogénea de células, las que se asocian con neuronas y cumplen diversos roles en el desarrollo, mantención y función del sistema nervioso de vertebrados, donde se han descrito distintos grupos de células gliales: astrocitos, microglías, glías NG2⁺ y células mielinizantes. Este último grupo celular está compuesto por oligodendrocitos en el sistema nervioso central (SNC) y células de Schwann en sistema nervioso periférico (SNP) (Corty y Freeman, 2013). Los astrocitos clásicamente han sido implicados en procesos en el sistema nervioso, como el suministro de soporte metabólico a las neuronas (Allaman y col., 2011), la regulación de la neurotransmisión excitatoria dependiente de glutamato (Volterra y Meldolesi, 2005) y el establecimiento de redes neuronales a través de la mantención y eliminación de contactos sinápticos (Clarke y Barres, 2013). Las microglías comprenden entre el 10-15% del total de células gliales y se consideran como macrófagos mononucleares residentes en el SNC, que regulan la respuesta inmune e inflamatoria en el tejido nervioso (Ransohoff y Cardona, 2010; Nayak y col., 2014). Las denominadas glías positivas para el proteoglicano NG2 (glías NG2⁺), también llamadas ploidendrocitos, se consideran como células progenitoras de oligodendrocitos (CPO), que tienen la capacidad de generar oligodendrocitos en SNC durante el desarrollo y etapas adultas. También se ha descrito que estas células reciben *inputs* sinápticos desde neuronas, encontrándose integradas a circuitos neuronales (Nishiyama y col., 2009). Como se mencionó anteriormente los oligodendrocitos y las células de Schwann son las células encargadas de mielinizar axones en el SNC y en el SNP respectivamente (Mirsky y Jessen, 1999; Bradl y Lassmann, 2010), sin embargo para ambos tipos celulares su morfología, origen durante el desarrollo y sus mecanismos de mielinización son totalmente distintos. Los

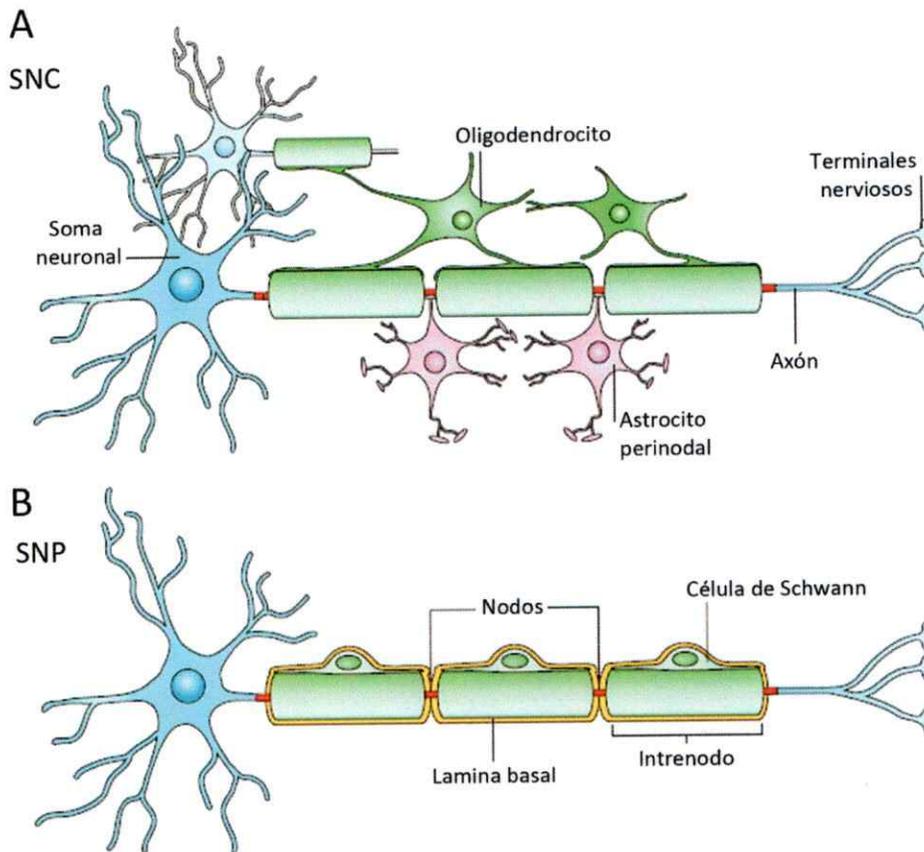


Figura 1. Células mielinizantes en sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. (A) Los oligodendrocitos, las células mielinizantes del SNC, y (B) las células de Schwann, las células mielinizantes en el SNP, envuelven su membrana reiteradas veces sobre el axón. En neuronas mielinizadas del SNC, el nodo es contactado por astrocitos perinodales. En el caso de las células de Schwann en SNP, la mielina está cubierta en toda su extensión por una lámina basal (Modificado de Poliak y Peles, 2003).

oligodendrocitos son las últimas células en ser generadas durante el desarrollo del SNC después de astrocitos y neuronas en etapas embrionarias, donde a partir de las eminencias ganglionares lateral y caudal emanan múltiples olas de producción y migración de CPO que generan la población total de oligodendrocitos en el cerebro (El

Waly y col., 2014). Un pequeño porcentaje de estos CPO embrionarios se mantienen indiferenciados en un estado quiescente durante etapas adultas. En etapas post-natales, en cerebro adulto también ocurre oligodendrogénesis, donde los CPO son continuamente generados en la zona sub-ventricular (Menn y col., 2006; El Waly y col., 2014). Por otro lado, las células de Schwann maduras son generadas una vez que el tubo neural se fusiona, a partir de células de la cresta neural que producen precursores de células de Schwann (PCS) y estas a su vez células de Schwann inmaduras. Todas estos precursores mencionados proliferan rápidamente a diferencia de las células de Schwann maduras, las que una vez que adquieren la capacidad de mielinizar entran en etapa G_0 del ciclo celular (Jessen y Mirsky, 2005). Además, mientras los oligodendrocitos son multipolares y pueden mielinizar múltiples segmentos axonales (llegando a una proporción de hasta 60 axones por cada oligodendrocito), las células de Schwann son bipolares y solo mielinizan a un segmento axonal (proporción 1:1) (Figura 1A y B) (Nave y Werner, 2014).

Función y estructura de la vaina de mielina.

La funcionalidad ejecutada por el sistema nervioso de vertebrados requiere la propagación rápida y eficiente del impulso nervioso, mediante la mielinización de prolongaciones axonales. El surgimiento de la mielina como adaptación evolutiva en la historia de los vertebrados se remonta al periodo devónico aproximadamente 400 millones de años atrás, donde peces mandibulados habrían presentado por primera vez mielina recubriendo los axones de ciertos nervios (Zalc y col., 2008). Desde una

perspectiva eléctrica, el recubrimiento del axón por la vaina de mielina genera una reducción en la capacitancia transversal de la membrana plasmática (Hartline y Colman, 2007). Además, la restricción de potenciales de acción a los nodos de Ranvier, sustenta las bases estructurales de la propagación saltatoria del potencial de acción, la que acelera la conducción nerviosa hasta 100 veces en comparación a axones no mielinizados (Tasaki, 1939; Nave y Werner, 2014).

La comunicación entre neuronas y las células mielinizantes es fundamental para el correcto posicionamiento de la vaina de mielina, y como resultado de este diálogo recíproco tanto axones como células mielinizantes adquieren características estructurales específicas que maximizan la velocidad de la transmisión nerviosa. La primera de estas características a la que se hará mención es la diferenciación de la membrana axonal (axolema) en distintos dominios funcionales y moleculares. Tanto en CSN y SNP estos dominios son los nodos de Ranvier, los paranodos, los juxtapanodos y la región internodal (Figura 2A) (Peles y Salzer, 2000). Los nodos de Ranvier corresponden a pequeñas interrupciones en la vaina de mielina, que están espaciadas unas de otras por intervalos llamados regiones internodales (Poliak y Peles, 2003). El axolema del nodo contiene una alta concentración ($>1200/\mu\text{m}^2$) de canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v), los que son fundamentales para la generación del potencial de acción durante la propagación saltatoria. En adición a los canales, diversas proteínas de interacción con el citoesqueleto (Ankyrin G y spectrin βIV) y de adhesión celular (Neurofascin-186) se han descrito en esta región (Arroyo y Scherer, 2000; Poliak y Peles, 2003). La membrana paranodal se encuentra enriquecida en las proteínas contactin y Caspr (*contactin-associated protein*), que

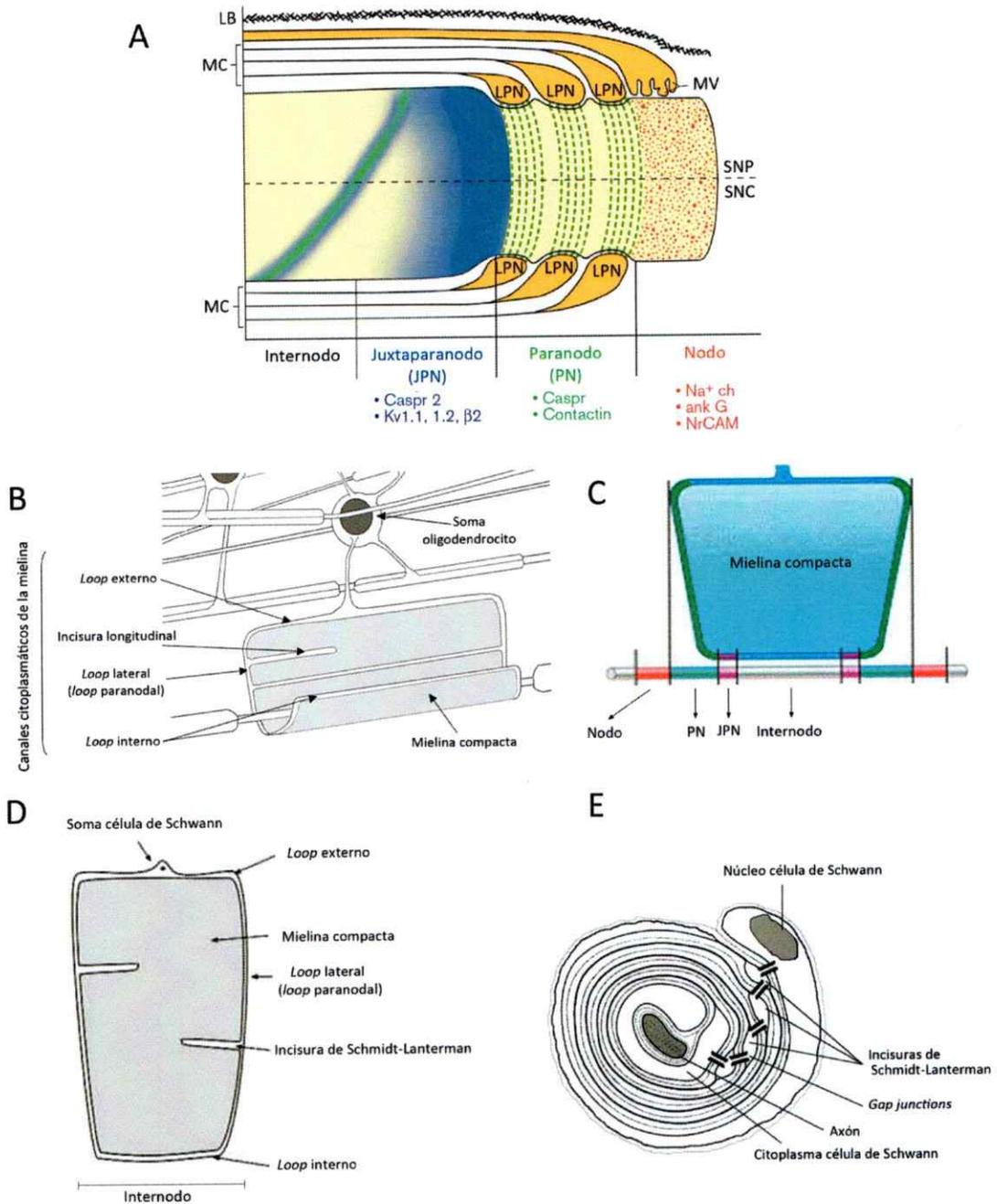


Figura 2. Estructura del axolema y de la vaina de mielina. (A) Dominios longitudinales de axones mielinizados. Representación de la organización y composición de los dominios axonales en relación a su célula glial mielinizante en SNP (porción superior) y en SNC (porción inferior). Se esquematizan el nodo, paranodo (PN), juxtaparanodo (JPN) e internodo, con sus respectivos miembros protéicos representados en mayor proporción. LB, lamina basal; LPN, *loop* paranodal; MC,

mielina compacta; MV, microvellosidades. **(B)** Dominios de la mielina de oligodendrocitos. Mielina compacta no posee citoplasma, mientras que los canales citoplasmáticos, estructuras continuas de citoplasma del oligodendrocito, forman: *loop* externo o mesaxón externo, *loop* interno o mesaxón interno, *loop* lateral que originará los *loops* paranodales, e incisuras longitudinales (modificado de Brahic y Roussarie, 2009). **(C)** Dominios en el oligodendrocito que definen especializaciones del mesaxón (Modificado de Salzer, 2003). **(D)** Dominios de la vaina de mielina de células de Schwann. **(E)** Representación transversal de un axón mielinizado por una célula de Schwann (modificado de Sáez y col., 2003).

participan en la unión axo-glial formada en esta región (Poliak y Peles, 2003). En la región paranodal, la mielina se “abre” para formar una serie de canales citoplasmáticos o *loops* paranodales (LPN) que se encuentran en cercana aposición al axón, generando una serie de uniones que envuelven en espiral al axón (Figura 2A) (Peles y Salzer, 2000). El axolema del juxtapanodo se caracteriza por la presencia de complejos hetro-multiméricos de los canales de potasio dependientes de voltaje de la familia *Shaker*, $K_v1.1$ y $K_v1.2$, como también de la proteína de adhesión celular Caspr2 (Wang y col., 1993; Poliak y Peles, 2003).

Existe una organización mutua y dependiente entre los dominios axonales recién descritos y la vaina de mielina, distinguiéndose también entonces distintos compartimentos con características específicas en SNC y SNP en la mielina propiamente tal. La formación y mantención de la mielina depende del establecimiento de dos dominios estructural y bioquímicamente distintos: a) la mielina compacta, que corresponde capas de membrana plasmática apiladas en una estructura multi-laminar carente de citoplasma, y b) los canales citoplasmáticos, que corresponden a pequeñas regiones de membrana no compactada en las que se encuentra presente el citoplasma

A



B

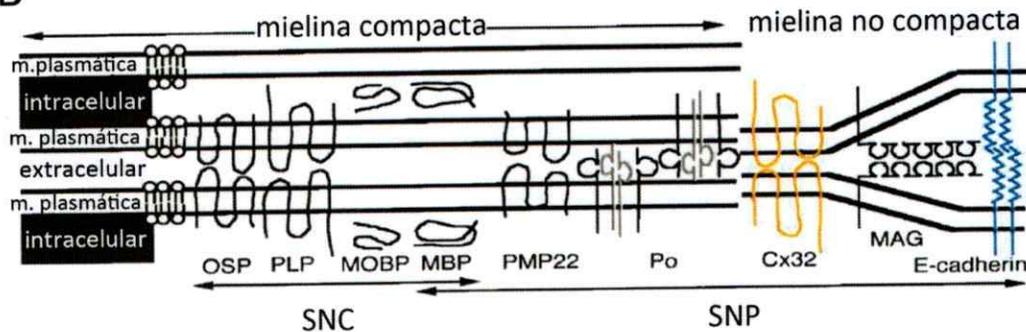


Figura 3. Ultraestructura de la mielina y composición de sus sub-dominios. (A) Ultraestructura de la vaina de mielina en SNC. En el panel izquierdo se pueden distinguir *loops* paranodales (LPN) en directa aposición a la membrana axonal. En el panel derecho se observa la mielina compacta como una región electrón-densa a lo largo del internodo. **(B)** Composición protéica de los dominios de la vaina de mielina. En la mielina compacta del SNC se encuentran: OSP, *oligodendrocyte-specific protein*; PLP, *proteolipid protein*; MOB, *myelin-oligodendrocyte basic protein*; MBP, *myelin basic protein*. En la mielina compacta de SNP se encuentran: MBP; P₀, *protein zero*; PMP22, *peripheral myelin protein 22*. La mielina no-compacta característica de canales citoplasmáticos en SNP está compuesta por: Cx32, *connexin32*; MAG, *myelin-associated glycoprotein* y E-cadherina (modificado de Arroyo y Scherer, 2000).

de la célula glial. En términos generales, tanto en SNC como SNP los canales citoplasmáticos están compuestos por los *loops* externos (mesaxón externo), *loops* internos (mesaxón interno) y *loops* laterales que forman *loops* paranodales, estructuras que bordean a la mielina compacta y se encuentran unidos a la neurona, anclando la

vaina de mielina a la membrana axonal en la región paranodal (Roth y col., 2006; Aggarwal y col., 2011a). En adición, en SNP existen canales citoplasmáticos que interrumpen a la mielina compacta, que reciben el nombre de incisuras de Schmidt-Lanterman (Arroyo y Scherer, 2000). Si bien las incisuras de Schmidt-Lanterman raramente son detectadas en SNC, se ha demostrado su presencia a lo largo de la mielina compacta y se conocen también como incisuras longitudinales (Brahic y Roussarie, 2009; Velumian y cols, 2011) La topografía de la estructura de la mielina y sus canales citoplasmáticos puede verse en la Figura 2A-E, y su ultraestructura en la Figura 3A. La composición protéica de estos sub-dominios es específica y varía entre SNC y SNP, tal como se observa en la Figura 3B. Uno de los componentes elementales de la mielina compacta es la proteína básica de la mielina (*myelin basic protein*, MBP), proteína citoplasmática que actúa como un “colador” que restringe el ingreso de ciertas proteínas a la mielina compacta (Aggarwal y col., 2011b). Por otro lado, la proteína conexina 32 (Cx32) forma parte de la mielina no compacta, específicamente de los *loops* paranodales, donde regularía la homeostasis iónica (Kamasawa y col., 2005). En adición a las proteínas consideradas convencionales que forman parte de la mielina, durante los últimos años diversos trabajos han descrito la expresión de la familia de proteínas Septinas en el proteoma de la mielina.

La familia de proteínas Septinas

El grupo de genes que codifica para la familia de proteínas Septinas fue descrito por primera vez en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) a través de un búsqueda genética en mutantes caracterizados por llevar a cabo una mitosis alterada (Hartwell, 1971). Estos genes fueron denominados *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* y *cdc12* (CDC, *cell division cycle*), y más tarde se demostró mediante microscopía de fluorescencia que sus respectivos productos protéicos localizan en el anillo contráctil generado en el cuello de división entre una célula madre y su célula hija, regulando la citoquinesis (Haarer y Pringle, 1987; Kim y col., 1991). Las septinas han sido encontradas en diversos organismos eucariontes, desde fungi hasta animales incluyendo humanos, pero no en protozoos o en plantas (Kinoshita, 2003). Se ha descrito en mamíferos 13 genes que codifican para Septinas (SEPT1 – SEPT12 y SEPT14, SEPT13 es un pseudogen). Estas proteínas comparten distintos dominios altamente conservados, lo que permite organizar a las Septinas en subgrupos según su porcentaje de identidad entre sus secuencias aminoacídicas. Específicamente en mamíferos existen 4 subgrupos representados por SEPT2, SEPT3, SEPT6 y SEPT7 (Cao y col., 2007; Beise y Trimble, 2011). Desde un punto de vista estructural el peso molecular de las Septinas se encuentra entre 30 – 65 kDa y poseen en su secuencia aminoacídica regiones altamente conservadas: Un dominio GTPasa homólogo al de la familia de las GTPasas pequeñas Ras (Field y Kellogg, 1999; Leipe y col., 2002); Un dominio con un alto porcentaje de identidad entre estas proteínas, denominado elemento único de Septinas (EUS) (Pan y col., 2007), y una región rica en aminoácidos básicos capaz de unirse a fosfoinosítidos (Casamayor y Snyder, 2003). Los extremos amino terminal (N-

terminal) y carboxilo terminal (C-terminal) que flanquean la región central, son divergentes y no conservados entre miembros de esta familia de proteínas, sin embargo en la mayoría de las Septinas el extremo C-terminal se predice que forma estructuras del tipo *coiled coil*, ya que presentan una secuencia de residuos aminoacídicos hidrofóbicos con un patrón repetido entre 3 y 4 veces (Kartmann y Roth, 2001; Versele y Thorner, 2005). Una representación esquemática de los dominios presentes en la secuencias aminoacídicas de las Septinas se observa en la figura 5D. Las Septinas son capaces de polimerizar en complejos protéicos hetero-oligoméricos que a su vez forman filamentos. Las Septinas no solo se ensamblan en filamentos y manojos, sino que también pueden formar anillos y entramados. Además se ha descrito que son capaces de interactuar con el citoesqueleto de actina, microtúbulos (MT) y con membrana celulares. Estas razones han llevado a que actualmente se les consideren como miembros no convencionales del citoesqueleto. Cabe destacar que a diferencia de los microfilamentos de actina y MT, los filamentos de Septinas no presentan polaridad, similar a los observado en filamentos intermedios (Weirich y col., 2008; Mostowy y Cossart, 2012). Se ha determinado que las Septinas solo existen como hetero-hexámeros o hetero-octámeros, sin que se les haya atribuido alguna funcionalidad fisiológica a arreglos de Septinas de menor grado, como por ejemplo dímeros o tetrámeros (Sellin y cols, 2011). En este contexto, el complejo compuesto por SEPT2-SEPT6-SEPT7 es la unidad de ensamblaje básica para las Septinas de mamíferos, donde 2 copias de este trímero se disponen simétricamente para generar hexámeros (Sirajuddin y col., 2007). Sumado a esto, se ha determinado que distintas Septinas son capaces de interactuar para formar octámeros (Sellin y cols, 2011; Kuo y col., 2015). En base a esto se ha propuesto que los complejos de Septinas tienen una alta diversidad combinatoria en su composición, que puede ser relevante en la

ejecución de roles que no pueden ser llevados a cabo por otros componentes del citoesqueleto (Beise y Trimble, 2011; Mostowy y Cossart, 2012).

Las Septinas participan en múltiples procesos fisiológicos, por ejemplo en la citoquinesis de levaduras y células de mamíferos, en el establecimiento y mantención de polaridad celular, migración celular y regulación de la invasión de patógenos, entre otros. Desde un punto de vista molecular, los fenómenos recién mencionados implican funciones específicas de las Septinas como proteínas de andamio y barreras a la difusión de componentes citoplasmáticos. Las Septinas también se han descrito como reguladores de la estabilidad de MT, del tráfico vesicular y de la flexibilidad de la membrana cortical (Kinoshita, 2003; Spiliotis y Nelson, 2006; Fung y col., 2014). Se ha descrito que diversos miembros de la familia de las Septinas se expresan en SNC y en SNP de mamíferos. En particular, mediante la utilización de micro arreglos se determinó la expresión de SEPT2, 3, 4, 5, 7, 8 y 11 en tejido cerebral (Hall y col., 2005), y a través de análisis de proteómica se determinó la presencia de distintas Septinas en densidades post-sinápticas (*post synaptic density*, PSD) (Peng y col., 2004). En este contexto se ha demostrado que SEPT7 y SEPT6 localizan en la base de espinas dendríticas y en puntos de ramificación dendrítica, donde participan de la morfogénesis de las espinas y del desarrollo dendrítico de neuronas hipocampales (Tada y col., 2007; Xie y col., 2007; Cho y col., 2011). Se ha propuesto que filamentos de Septinas conformados por SEPT7 forman una barrera a la difusión en la base de las espinas dendríticas que regula el posicionamiento de receptores de glutamato del tipo AMPA en densidades postsinápticas (Ewers y col., 2014). Por otro lado, la expresión de SEPT7 se ve incrementada en tejido cerebral durante el proceso de formación de memoria espacial en murinos (Engmann y col., 2011). Además, se ha determinado

que SEPT11 regula la arborización dendrítica y la conectividad sináptica en neuronas inhibitorias GABAérgicas (Li y col., 2009). Sin embargo es importante mencionar que animales *knockout* (KO) para las proteínas SEPT3 y SEPT5 presentan un desarrollo neuronal normal, al igual que una liberación de neurotransmisores no alterada, sugiriendo que en SNC existiría redundancia funcional entre distintos miembros de la familia de Septinas (Fujishima y col., 2007; Tsang y col., 2008; Saarikangas y Barral, 2011). Las Septinas también se encuentran presentes y son funcionales en células gliales del sistema nervioso. Por ejemplo en astrocitos se encuentran enriquecidos los ARNm de SEPT4, 5, 7 y 8 (Patzig y col., 2014), y la proteína SEPT2 regula la recaptura de glutamato en astrocitos cerebelares a través de su interacción con el transportador de glutamato/aspartato dependiente de sodio, GLAST (Kinoshita y col., 2004). En microglías se ha detectado mediante inmunocitoquímica la presencia de SEPT7 *in vitro*, como también se han encontrado enriquecidos los ARNm de diversas Septinas, sin embargo ninguna correlación se ha establecido entre la presencia de estas proteínas y algún putativo rol en microglías del SNC (Patzig y col., 2014).

Específicamente en células mielinizantes se ha detectado y caracterizado la presencia de miembros de la familia de proteínas Septinas. En oligodendrocitos, se ha descrito la presencia de Septinas en el proteoma de mielina cerebral purificada (Taylor y col., 2004), y en el subdominio de la mielina compacta (Roth y col., 2006). Estudios complementarios de proteómica de mielina en SNC han determinado la presencia de elementos predominantes como lo son SEPT2, 7 y 8 (Ishii y col., 2009; de Monasterio y col., 2012). El primer reporte que sugiere una funcionalidad para las Septinas en este tipo celular proviene del modelo genético carente del principal componente de la mielina en SNC, la proteína proteolípida (*proteolipid protein*, PLP), donde en este



contexto genético la abundancia relativa de SEPT2, 4 y 8 se ve disminuida en un 50% aproximadamente en el proteoma de la mielina (Werner y col., 2007), de igual manera en animales incapaces de sintetizar galactocerebrosidos, componente altamente enriquecido en la mielina, se observa una disminución en la masa de las misma Septinas previamente mencionadas al analizar el proteoma de la mielina (Fewou y col., 2010). Se ha determinado que el ARNm de SEPT7 y SEPT8, entre otras Septinas, se encuentra altamente enriquecido durante etapas tardías de la diferenciación de oligodendrocitos y durante la mielinización, mientras que por el contrario, el ARNm de SEPT6 y SEPT9 se encuentra incrementado en CPO no diferenciados y luego disminuido en etapas posteriores, sugiriendo fuertemente que cumplen un rol en la diferenciación y proliferación de CPO (Buser y col., 2009). La relevancia de estas proteínas en la conformación y mantención de la estructura de la mielina queda en evidencia al observar el enriquecimiento de Septinas en la mielina del SNC a diferencia de lo que ocurre con α -actina, α -tubulina y filamentos intermedios, que no aumentan e incluso disminuyen sus niveles relativos en fracciones de mielina purificada, lo que permite proponer a las proteínas Septinas como elementos prominentes del citoesqueleto en la mielina madura (Jahn y col., 2013; Patzig y col., 2014).

Se ha determinado en el proteoma de la mielina de las células de Schwann la presencia de SEPT7, 11 y 9 (Patzig y col., 2011). Ensayos de inmunohistoquímica en nervio ciático demostraron la presencia de SEPT2 específicamente en el paranodo, donde co-distribuye con los marcadores paranodales Caspr y ZO-1 (Ogawa y Rasband, 2009). Concordante con esto, los ARNm de SEPT3, 8 y 9 se ven aumentados fuertemente en las etapas post-natales P14 y P21, periodo que corresponde a la máxima actividad mielinizante de las células de Schwann y que se

condice con aumentos en los niveles de las proteínas clásicas de mielina P₀, CNPase, MBP y MAL (*Myelin and lymphocyte protein*) (Buser y col., 2009).

En este contexto, SEPT8 es uno de los componentes de la familia de las Septinas que se encuentra enriquecido y que es detectado de manera sistemática tanto en mielina proveniente de oligodendrocitos en SNC y células de Schwann en SNP. La proteína SEPT8 (llamada con anterioridad KIAA0202) fue descrita como un interactor de SEPT5, expresado predominantemente en cerebro, corazón y plaquetas, (Blaser y col., 2002; Blaser y col., 2003), y en tejido ocular en células fotorreceptoras de la retina de mamíferos (Pache y col., 2005; Hara y col., 2007). Interesantemente SEPT8 se ha descrito como un componente del proteoma sináptico de la corteza visual primaria (Dahlhaus y col., 2011), y se demostró que SEPT8 se encuentra enriquecido en terminales presinápticos de neuronas hipocámpales, donde participa en el proceso de liberación de neurotransmisores a través de su interacción con la proteína VAMP2 (Ito y col., 2009). A partir de ensayos de proteómica en SNC, SEPT8 se ha detectado en el bulbo olfatorio, hipotálamo, corteza prefrontal y cerebro medio (Stelzhammer y col., 2012; Taraslia y col., 2013), sin embargo su patrón de expresión espacial en estas regiones aún no se ha determinado. Finalmente, se ha propuesto que es el complejo SEPT2/7/8 el que predomina tanto en oligodendrocitos como en células de Schwann, reforzando la relevancia de SEPT8 en glías mielinizantes (Buser y col., 2009).

Uno de los principales roles que se les ha atribuido a la familia de proteínas Septinas es la conformación de barreras a la difusión en la membrana plasmática en múltiples contextos celulares, por ejemplo: en el cuello de yemación (*budding neck*) de levaduras en división (Takizawa y col., 2000), en la base del cilio primario de células eucariontes (Hu y col., 2010), y en la base de espinas dendríticas en neuronas

glutamatérgicas (Ewers y col., 2014), lo que permite suponer que las Septinas, en particular SEPT8, podría actuar como barrera a la difusión en oligodendrocitos y/o células de Schwann.

La presencia de SEPT8 en el proteoma de mielina tanto en SNC como SNP (Taylor y col., 2004; Buser y col., 2009; Gopalakrishnan y col., 2013), y el hecho de que no exista una descripción acabada del patrón de expresión espacial de SEPT8 en sistema nervioso, nos permiten proponer la hipótesis de trabajo planteada a continuación.

HIPÓTESIS

Septina 8 (SEPT8) se expresa asociado a células mielinizantes en distintas regiones del cerebro (sistema nervioso central) y en nervio ciático (sistema nervioso periférico) de ratón, donde participaría en la mantención de los subdominios de la vaina de mielina.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el patrón de expresión de la proteína SEPT8 en sistema nervioso central y en sistema nervioso periférico, y su localización subcelular en células mielinizantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Diseñar partidores específicos que discriminen a SEPT8 de los otros miembros de la familia de las septinas. Determinar el patrón de expresión de SEPT8 en cerebro y nervio ciático de ratón mediante RT-PCR semicuantitativo utilizando los partidores generados
- 2) Analizar el patrón de expresión espacial de SEPT8 en distintas regiones de cerebro adulto y en nervio ciático mediante hibridación *in situ*.

- 3) Generar los vectores de expresión de SEPT8 en versiones recombinantes: GST-SEPT8 y EGFP-SEPT8.
- i. Expresar GST-SEPT8 en bacterias y purificar esta proteína para inducir la generación de anticuerpos anti-SEPT8
 - ii. Transformar células TC620 (oligodendroglioma humano) con el vector de expresión de la proteína EGFP-SEPT8.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Reactivo	Empresa de origen
3,5 BCIP / 4,5 NBT	Roche
Acetato de sodio	Winkler
Ácido málico	Sigma
Ampicilina	Merck
Anti-digoxigenin-AP Fab fragments	Roche
Azul de Coomassie	Winkler
Blocking solution	Sigma
CHAPS	Calbiochem
Cloroformo	Merck
Cloruro de sodio	Winkler
DEPC (dietil-pirocarbonato)	Sigma
DNAsa I	Fermentas
dNTPs	Fermentas
E.Z.N.A. RNA probe purification	OMEGA Bio-tek
EDTA	Sigma
Etanol	Merck
Formamida	Merck
Glicina	US Biological
H ₂ O bidestilada	Sanderson
Heparina	Calbiochem
IPTG	Sigma
Isopropanol	Merck
Ligasa T4	Invitrogen
Lipofectamina 2000	Invitrogen
Medio IMDM	Invitrogen
Medio LB	Fermentas
Paraformaldehido	Sigma
pGEM-T Easy	Promega
Poliacrilamida	Merck
PolyFreeze	Sigma
Proteinasa K	Promega
Riboporbe Generation System SP6/T7	Promega
RNAsa	Fermentas
RNASolv Reagent	OMEGA Bio-tek
Suero fetal bovino	Gibco
Sacarosa	Merck

Transcriptasa Reversa ImProm II	Promega
Tris Base	Winkler
Tween 20	Promega
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

Extracción ARN total

Ratones adultos (*mus musculus*, cepa CF1) fueron anestesiados y luego sacrificados mediante dislocación cervical, siguiendo protocolos aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Los animales fueron disecados con el propósito de aislar tejido proveniente de nervio ciático y cerebro entero para extracción de ARN total utilizando el reactivo RNASolv Reagent siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, el tejido fue homogenizado en 1 ml de RNASolv Reagent y luego se agregaron 200 μ l de cloroformo. Las muestras se mezclaron mediante *vortex* y se dejaron en hielo durante 10 min. Luego fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. Se rescató la fase acuosa resultante en un nuevo tubo y se agregó 500 μ l de isopropanol para precipitar el ARN. Las muestras se incubaron durante 10 minutos y posteriormente fueron centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos. El *pellet* resultante fue lavado con etanol 80%, mezclado mediante *vortex* y centrifugado a 7.500 g por 5. El *pellet* fue secado durante 10 minutos a temperatura ambiente para luego ser resuspendido en H₂O DEPC (dietil-pirocarbonato).

Transcripción reversa

Antes de iniciar la reacción de transcripción reversa, 2 μ g del ARN de cada muestra fueron tratados con 1 U de DNAsa I y 10 U de inhibidor de RNAsa, más 1 μ l

de Buffer de DNAsa I (100 mM Tris-HCl pH 7.5; 25 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂). La mezcla fue llevada a 10 µl totales con H₂O DEPC. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos para luego detenerla agregando 1 µl de EDTA 25 mM e incubándola a 65°C durante 10 minutos.

Posteriormente se tomaron 9 µl de la mezcla de ARN y se agregó 1 µl de partidor anterógrado específico a una concentración final de 1 µM para posteriormente incubar a 70°C durante 5 minutos. Para la transcripción reversa propiamente tal, se agregaron a la mezcla de ARN con partidor anterógrado: 25 U de inhibidor de RNAsa; la mezcla de dNTPs a una concentración final de 0.5 mM cada nucleótido; MgCl₂ a una concentración final de 3.0 mM; 5.0 µl de Buffer de Transcriptasa Reversa ImProm II 5x; 1.25 µl de enzima Transcriptasa Reversa ImProm II, y se llevaron a un volumen final de 25 µl en H₂O DEPC. Las muestras fueron incubadas siguiendo el siguiente protocolo en termociclador: 25°C durante 5 minutos (*Annealing*) → 42°C durante 60 minutos (Elongación) → 70°C durante 15 minutos (Inactivación de la Transcriptasa Reversa). El ARN obtenido fue utilizado inmediatamente para reacciones de PCR, o fue almacenado a -80°C hasta el momento de su uso. Como control para la reacción de PCR se amplificó una región del ADNc de la proteína *housekeeping* gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), utilizando los partidores anterógrado GAPDH 5'- TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC -3', y retrógrado GAPDH 5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA -3'.

Generación sonda ARN SEPT8 antisentido.

Utilizando como templado de ADN el vector comercial pYXAsc-Septin8 (Open BioSystems), que codifica para la proteína SEPT8 completa, se realizaron reacciones de PCR en gradiente a distintas temperaturas de *annealing* utilizando los partidores anterógrado 5'- GAA TTC CAG GAC AGT GAC GGT GAC AGC -3' y retrógrado 5'- GCG GCC GCT CAA AAT TTC TTC TTG TCC TTG TCT -3'. El producto de PCR fue purificado con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System y clonado en el vector pGEM-T Easy, siguiendo instrucciones del fabricante. El vector resultante fue linealizado y a partir de este se sintetizó la sonda ARN uracilo-digoxigenina utilizando el kit Riboprobe Generation System SP6/T7. La sonda de ARN generada fue purificada con el kit comercial E.Z.N.A. RNA probe purification, y almacenada a -80°C hasta su utilización

Hibridación *in situ*

Ratones adultos (*mus musculus*, cepa CF1) fueron anestesiados con Ketamina-Xilacina para luego ser perfundidos transcardialmente con suero fisiológico (NaCl 0.9% p/v) y posteriormente con paraformaldehído 4% (PFA). El animal fue eutanasiado siguiendo protocolos aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El cerebro entero fue disecado e incubado en solución de crioprotección (PFA 4%, sacarosa 30% en H₂O DEPC) durante 24-48 horas a 4°C. El tejido fue embebido en PolyFreeze y congelado rápidamente en nitrógeno líquido. El cerebro fue cortado en secciones coronales de 10 – 20 µm de grosor, y el nervio ciático fue cortado longitudinalmente utilizando un criostato (Microm HM525). Las regiones

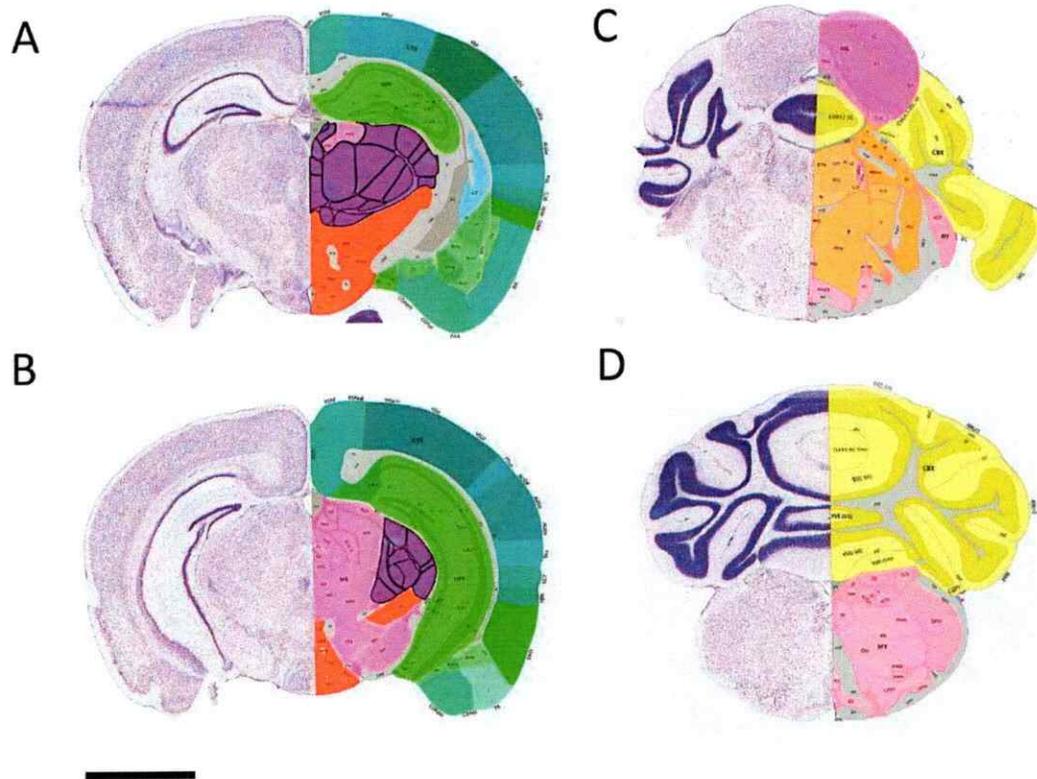


Figura 4. Regiones del cerebro de ratón analizadas mediante hibridación *in situ*. Mapa anatómico de distintas regiones del cerebro de ratón (*mus musculus*) obtenidas desde *Allen mouse brain atlas* (<http://mouse.brain-map.org/>) que representan la posición aproximada donde se realizó el corte coronal de las distintas regiones del cerebro analizadas. **(A)** Región aproximada para cortes de hipocampo, aproximadamente 7.2 mm desde anterior a posterior. **(B)** Región aproximada para cortes de corteza, aproximadamente 8.1 mm desde anterior a posterior. **(C) – (D)** Región aproximada para cortes de cerebelo, desde 10.4 a 13.0 mm aproximadamente desde anterior a posterior. Barra de tamaño 1.6 mm aprox. Todas las mediciones son aproximaciones realizadas en base a la base de datos de *Allen mouse brain atlas*.

cerebrales aproximadas donde se realizaron los cortes coronales se representan en la Figura 4. Las muestras fueron dispuestas en portaobjetos sobre los que se realizó la hibridación de la sonda ARNm SEPT8. Las muestras fueron lavadas con buffer PTw 0.05% v/v Tween 20, en buffer fosfato salino (PBS) y posteriormente incubadas con proteinasa K 10 mg/ml en buffer PTw durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Luego de lavar en buffer PTw, las muestras fueron fijadas por 20 minutos en PFA 4% p/v disuelto en buffer PTw a temperatura ambiente, luego fueron lavadas 3 veces con buffer PTw, y pre-hibridadas por 3 horas a 65°C en buffer de hibridación (formamida 50%; 1X buffer SSC pH 5.3 (150 mM NaCl, 15mM citrato de sodio), 5 mM EDTA; ARNt de esperma de salmón 200 mg/ml; Tween 0.002%; CHAPS 0.005%; Heparina 100 mg/ml). Se agregaron entre 30-60 ng/ml de la a sonda SEPT8 y se incubaron por 16-18 horas a 68°C. Posteriormente las muestras se lavaron con solución A (5X SSC pH 4.5, formamida 50%, SDS 1%) por 30 minutos a 65°C 2 veces, con solución B (2.5 X SSC pH 4.5, formamida 50%, Tween 20 1%) por 3 minutos a 65°C 3 veces, y luego con buffer ácido málico MABw pH 7.5 (100 mM ácido málico; 150 mM NaCl; 0.05 % Tween 20). Las preparaciones fueron bloqueadas en solución de bloqueo (Blocking solution 2%, en MABw) durante 2-6 horas a temperatura ambiente, y luego se incubó el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (anti-digoxigenin-AP Fab fragments) diluido 1/1000 en MABw, durante 12-20 horas a 4°C en cámara húmeda. Las muestras fueron lavadas 40 minutos a temperatura ambiente 5 veces con buffer MABw y se incubaron durante 5 minutos con solución AP de reacción para fosfatasa alcalina (Tris 100 mM pH 9.5; MgCl₂ 50 mM; NaCl 100 mM; Tween 20 1%). El revelado es llevado a cabo agregando el reactivo 3,5 BCIP / 4,5 NBT incubando durante 3-16 horas a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas en microscopio Olympus BX61.

Clonamiento de vectores que codifican proteínas de fusión.

Como templado para la reacción de PCR se utilizó el vector pYXAsc-Septin8 (Open BioSystems). Para generar la proteína de fusión GST-SEPT8 se clonó en el

vector comercial pGEX5.1 (GE Healthcare Life Science) la secuencia correspondiente al extremo C-terminal de SEPT8 amplificada con los partidores anterógrado 5'- GAA TTC CAG GAC AGT GAC GGT GAC AGC -3' (EcoRI) y retrógrado 5'- GCG GCC GCT CAA AAT TTC TTC TTG TCC TTG TCT -3' (NotI). Para generar la proteína de fusión EGFP-SEPT8 se clonó en el vector comercial pEGFP-C1 (Clontech) la secuencia completa de SEPT8 con los partidores anterógrado 5'- AAG CTT CGC AGC TCG CCA TGG C -3' (HindIII) y retrogrado 5'- GAA TTC GTC CTT GTC TTT CCT CAG AGG C -3' (EcoRI). Subrayado se indica la secuencia de corte para las respectivas enzimas de restricción entre paréntesis. Todas las enzimas de restricción fueron adquiridas desde New England Biolabs. Las dobles digestiones de los productos de PCR y de los plasmidios vacíos se realizaron a 37°C durante 2 horas agregando 1 U de cada enzima de restricción. Los productos digeridos fueron ligados con Ligasa T4 a 4°C por 16 horas. Los productos de ligación fueron transformados en bacterias *e.coli* DH5 α para su amplificación.

Inducción de expresión bacteriana, SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie

El vector pGEX5-1-SEPT8, fue transformado en bacterias *e. coli* de la cepa BL21 mediante *shock* térmico. Un inóculo de las bacterias que llevan el ADN plasmidial fue dejado hasta saturación en medio LB con Ampicilina 1 μ g/ml por 16 horas a 37°C en agitación. Posteriormente se incubó una alícuota del inóculo saturado en medio LB fresco con Ampicilina, y se indujo la expresión de proteínas con IPTG (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) por 2 horas a 37°C en agitación. Luego de esto las bacterias fueron centrifugadas y el *pellet* resultante fue resuspendido en H₂O bidestilada e incubado a 95°C por 10 minutos. Las muestras fueron denaturadas en *buffer* de carga

de proteínas. Las proteínas ya denaturadas fueron cargadas en geles de poliacrilamida y separadas por peso molecular en *buffer* de corrida (25 mM Tris Base pH 8.3, 190 mM glicina 0.1% p/v SDS). Los geles fueron teñidos con reactivo de azul de Coomassie, y luego destañados con una solución de ácido acético glacial, metanol y dH₂O.

Precipitación ADN plasmidial con etanol

Al ADN plasmidial producto de MaxiPrep correspondiente a los vectores pEGFPC1 y pEGFPC1-SEPT8 se agregó 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 para posteriormente agregar 3 volúmenes de etanol 100%. La solución se dejó a -20°C durante 16 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, y el *pellet* resultante fue resuspendido en 1 ml de etanol 70% frío y centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado, y el *pellet* correspondiente al ADN plasmidial precipitado fue secado a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente fue resuspendido en H₂O Sanderson estéril para ser utilizado en ensayos de transfección.

Transfección transiente de ADN plasmidial

La transfección de los plasmidios EGFP y EGFP-SEPT8 se realizó en la línea celular derivada de oligodendrogloma humano TC620 siguiendo el protocolo de transfección con Lipofectamina 2000 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, los complejos de ADN plasmidial y Lipofectamina 2000 se formaron en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's) sin suero, para posteriormente ser agregados a las células. La transfección se realizó durante 12 horas en medio de

transfección (IMDM sin suero y sin antibiótico). Luego de este tiempo, el medio se reemplazó por el medio de mantención (IMDM 10 % suero fetal bovino, SFB). El volumen de Lipofectamina 2000 se agregó en una proporción 2 : 1 con respecto a la masa de ADN plasmidial utilizado. Las células fueron fijadas 48 horas post-transfección con PFA 2% p/v en PBS 1X. Las muestras fueron analizadas en microscopio de epifluorescencia Zeiss AxioVert 200M.

RESULTADOS

Diseño de partidores específicos para el ADNc de SEPT8

En el presente estudio se propone analizar el patrón de expresión espacial de la proteína Septina 8 (SEPT8) en sistema nervioso, a través del análisis de la localización del ARNm específico para SEPT8 mediante hibridación *in situ*, y a través de la generación de un anticuerpo específico contra la proteína SEPT8. Como se mencionó anteriormente, las proteínas pertenecientes a la familia de las Septinas poseen un alto porcentaje de identidad tanto al comparar sus secuencias nucleotídicas codificantes como sus estructuras primarias protéicas, lo que dificultaría la distinción entre distintas Septinas, ya que podría existir reconocimiento cruzado entre distintos miembros de esta familia de proteínas al momento de la detección. Es por esto que para la generación de la sonda complementaria de ARNm para SEPT8 que se utilizará en hibridación *in situ*, debió elegirse como molde una región única y específica en la secuencia nucleotídica de SEPT8, que posea un bajo porcentaje de identidad con el resto de las Septinas. De igual manera, el epítipo contra el que se buscó generar el anticuerpo contra SEPT8 posee una estructura primaria distinguible del resto de los miembros de la familia de las Septinas. Para determinar que Septinas poseen el mayor porcentaje de identidad nucleotídica con SEPT8, se llevó a cabo un análisis de alineamiento múltiple de secuencias de ADN utilizando el programa de libre acceso Clustal Omega. A partir de las secuencias de ADNc de las 13 Septinas descritas en

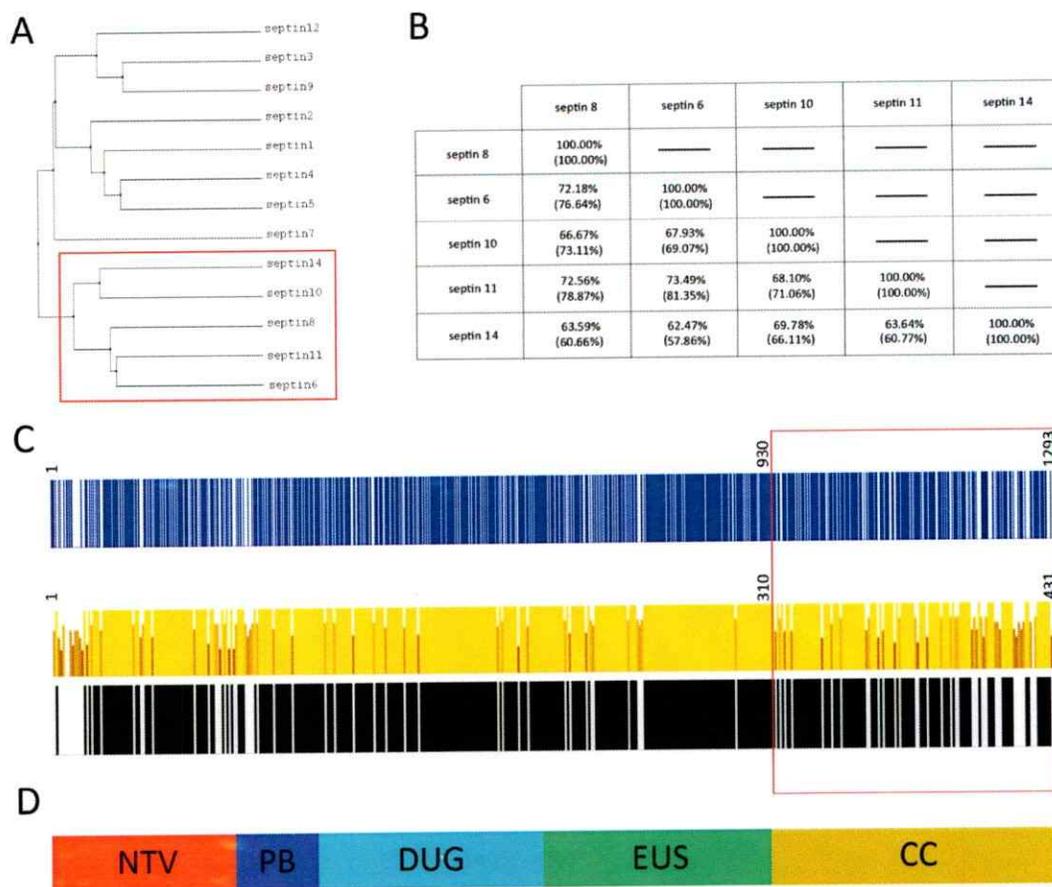


Figura 5. Generación de partidores específicos contra la región C-terminal de SEPT8. (A) Cladograma generado en base al porcentaje de identidad de las secuencias nucleotídicas de la región codificante para los distintos miembros de la familia de las Septinas de ratón. En rojo se destaca el grupo de Septinas que posee un mayor porcentaje de identidad con SEPT8. (B) Tabla resumen donde se muestra el porcentaje de identidad entre SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11 y SEPT14. El valor superior corresponde al porcentaje de identidad de las secuencias nucleotídicas codificantes. El valor inferior entre paréntesis indica el porcentaje de identidad de las secuencias primarias aminoacídicas entre las distintas proteínas. (C) Esquema superior representa el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de ADNc de SEPT8 y SEPT11, donde cada barra azul corresponde a un punto de coincidencia entre nucleótidos de ambas secuencias. Esquema inferior representa el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas SEPT8 y SEPT11, donde en amarillo se esquematiza el grado de consenso entre secuencias de ambas proteínas, el que se determina acorde al grado de similitud electroquímica de los residuos aminoacídicos analizados. Mientras más oscuro sea el color de una barra, menor será la similitud entre residuos. Cada barra negra corresponde a un punto de coincidencia exacta entre aminoácidos en las secuencias de ambas proteínas. (D) Representación de los distintos dominios presentes en la secuencia proteica de las Septinas. NTV,

Dominio N-terminal variable; PB, región de aminoácidos polibásicos; DUG, dominio de unión a GTP; EUS, elemento único de Septinas; CC, dominio *coiled coil*.

ratón (*mus musculus*) se generó un cladograma realizado en base al porcentaje de identidad entre las secuencias de las distintas Septinas (Figura 5A). Se observa que SEPT8 se agrupa junto con las proteínas SEPT6, SEPT10, SEPT11 y SEPT14, y que guarda un mayor porcentaje de identidad con SEPT11, existiendo un 72.56% de identidad entre secuencias nucleotídicas del ADNc, y un 78.87% de identidad entre las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas (Figura 5B). En la literatura se ha descrito que las Septinas se caracterizan por poseer una región central altamente conservada, mientras que tanto los extremos amino terminal y carboxilo terminal son variables y específicos para cada uno de los miembros de esta familia de proteínas. Se diseñaron partidores específicos para amplificar la región correspondiente al extremo C-terminal de SEPT8, que abarca desde el nucleótido 930 hasta el nucleótido 1293, permitiendo de esta manera amplificar una región con un menor número de coincidencias en las secuencias nucleotídicas de los ADNc de SEPT8 y SEPT11 (Figura 5C, panel superior). Cabe destacar que utilizando una herramienta de PCR virtual (*electronic-PCR*, NCBI) se comprobó que los partidores diseñados solo generan un amplicón de 370 pares de bases que es específico para SEPT8, y que no amplifican ningún otro producto inespecífico al realizar el experimento *in silico* sobre la librería de ADNc total de *mus musculus*. El polipéptido codificado por la secuencia de ADNc amplificado, abarca desde el residuo glutamina (Q) 310 hasta el residuo fenilalanina (F) 431 en la estructura primaria de SEPT8, generando un péptido de aproximadamente 14 kDa de peso molecular predicho. Esta región aminoacídica de SEPT8 posee al igual que para la secuencia de ADNc, un bajo porcentaje de identidad con la secuencia de la

proteína SEPT11, tanto a nivel de consenso aminoacídico como a nivel de coincidencia de residuos entre ambas secuencias (Figura 5C, panel inferior). Es importante destacar que la región codificada en la secuencia amplificada de SEPT8 corresponde a un dominio del tipo *coiled coil* en la estructura terciaria de la proteína, y no abarca los dominios de unión a GTP ni el dominio único de Septinas que se encuentran altamente conservados entre los distintos miembros de esta familia de proteínas (Figura 5D).

Expresión de SEPT8 en cerebro total y nervio ciático durante etapa adulta determinada mediante RT-PCR.

Como primera aproximación para analizar la expresión de Septina 8 en sistema nervioso central (SNC) y en sistema nervioso periférico (SNP) se analizó mediante PCR acoplado a transcripción reversa (RT-PCR) la presencia del ARNm específico de SEPT8 utilizando los partidores previamente generados. El ARN total fue extraído desde tejido de nervio ciático y desde cerebro anterior proveniente de ratones adultos. Posterior a la transcripción reversa, se llevó a cabo PCR utilizando los partidores específicos contra SEPT8 siguiendo el protocolo mostrado en la Figura 6A. Se observa un producto de PCR de aproximadamente 370 pb correspondiente al amplificado de la secuencia de SEPT8 que codifica para el extremo carboxilo terminal de la proteína, tanto en nervio ciático (Figura 6B) como en cerebro total (Figura 6C), lo que se interpreta como que existe expresión a nivel de ARNm de SEPT8 en SNP y en SNC, en ratones adultos.

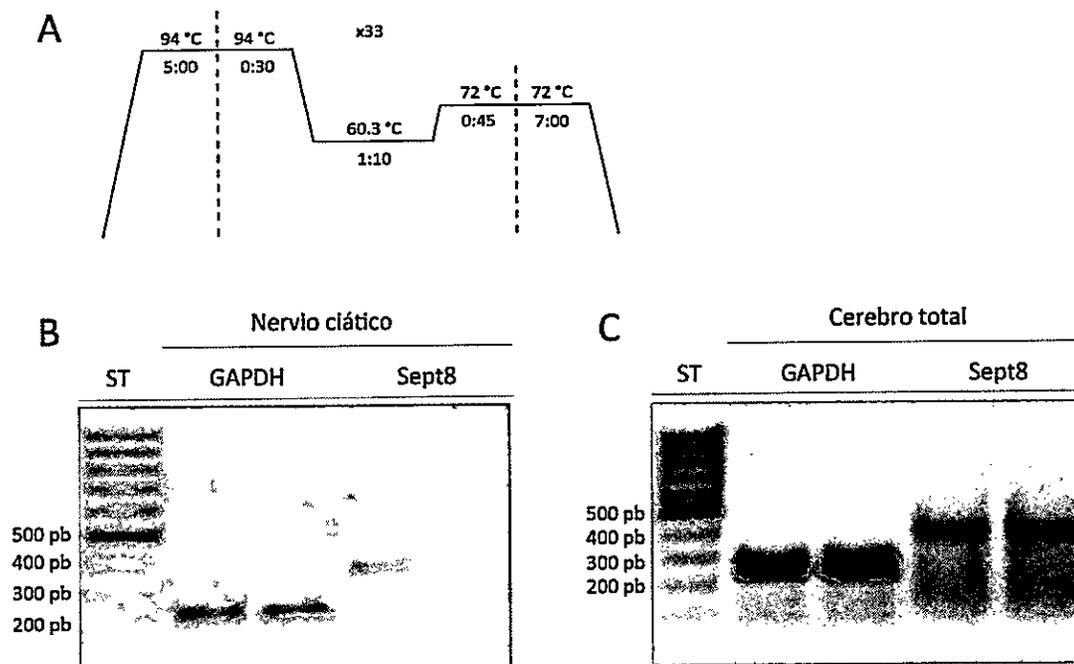


Figura 6. SEPT8 se expresa en nervio ciático y en cerebro de ratón adulto. (A) Diagrama del protocolo de PCR utilizado para la amplificación del producto de 380 pb correspondiente a la región que codifica para el extremo carboxilo terminal de SEPT8. Se utilizó una temperatura de annealing de 60.3 °C durante 70 segundos. RT-PCR utilizando partidores contra SEPT8 y contra GAPDH a partir de ADNc de nervio ciático de ratón adulto **(B)** y de ADNc de cerebro anterior de ratón adulto **(C)**. Cada reacción se muestra por duplicado. Tamaño teórico del amplificado de GAPDH es 237 pb. ST, estándar de peso molecular.

Cabe destacar que como control positivo interno para la reacción de transcripción reversa y de PCR se utilizaron partidores contra una región del ADNc que codifica para la proteína de *housekeeping* gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

SEPT8 se expresa en distintas regiones de cerebro adulto y en nervio ciático, determinado mediante hibridación *in situ*.

Una vez determinada la expresión a nivel de ARNm de SEPT8 durante estadios adultos, nos propusimos determinar su patrón de expresión espacial tanto en tejido cerebral como en tejido de nervio ciático, mediante la técnica de hibridación de ARN *in situ* utilizando una sonda de ARN antisentido específica contra SEPT8, la cual se generó clonando el fragmento amplificado por los partidores específicos de SEPT8 en el vector pGEM-T Easy. Para esto se realizaron reacciones de PCR en gradiente a distintas temperaturas de *annealing*, utilizando como templado de ADN el vector comercial pYXAsc-Septin8 (Open BioSystems), que codifica para la proteína completa, y siguiendo el protocolo esquematizado en la Figura 7A. Se observa que con las tres temperaturas de *annealing* utilizadas se obtiene un amplificado específico de aproximadamente 380 pb correspondiente a SEPT8, el que posteriormente es purificado para continuar con el protocolo de clonamiento (Figura 7B). Se observa que cuatro de los clones obtenidos amplifican para la secuencia de ADN de SEPT8 (Figura 7C). Posteriormente se comprobó la presencia y orientación del inserto mediante secuenciación del clon seleccionado para generar la sonda de ARN antisentido contra SEPT8 utilizada en ensayos de hibridación *in situ*. Se evaluó la expresión del ARNm de SEPT8 en sistema nervioso central, específicamente en hipocampo, corteza y cerebelo. Para esto se realizaron cortes coronales de cerebro entero de ratón adulto, los que fueron incubados con la sonda contra SEPT8 siguiendo el protocolo de hibridación *in situ*.

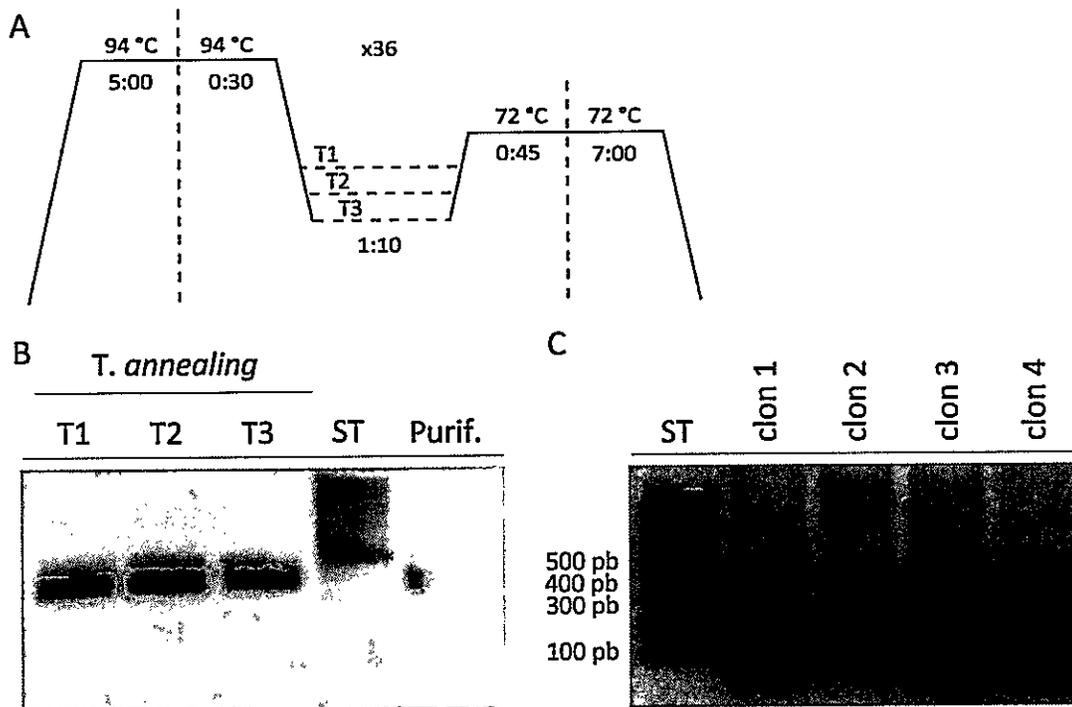


Figura 7. Generación de la sonda de ARN contra SEPT8 utilizada en ensayos de hibridación *in situ*. (A) Diagrama del protocolo de PCR en gradiente utilizado para la amplificación de la secuencia de SEPT8 de 370 pb. Las temperaturas de *annealing* utilizadas en este protocolo son T1 65.3 °C, T2 60.3 °C y T3 58.0 °C, durante un intervalo de 70 segundos. (B) Productos de PCR obtenidos al amplificar con distintas temperaturas de *annealing*. Con asterisco rojo se indica la banda de 500 pb en el marcador de peso molecular. Se observa en el carril Purif, 20 μ l del producto de amplificación purificado utilizado para el clonamiento en el vector pGEM-T Easy. (C) Productos de PCR obtenidos a partir de cuatro clones distintos del vector generado pGEM-T Easy – SEPT8.

Para determinar las distintas estructuras anatómicas distinguibles en el hipocampo se utilizó la base de datos *Allen Brain Atlas: Mouse Brain*, que se encuentra disponible en línea. Se observa marca positiva para la sonda de SEPT8 hipocampo

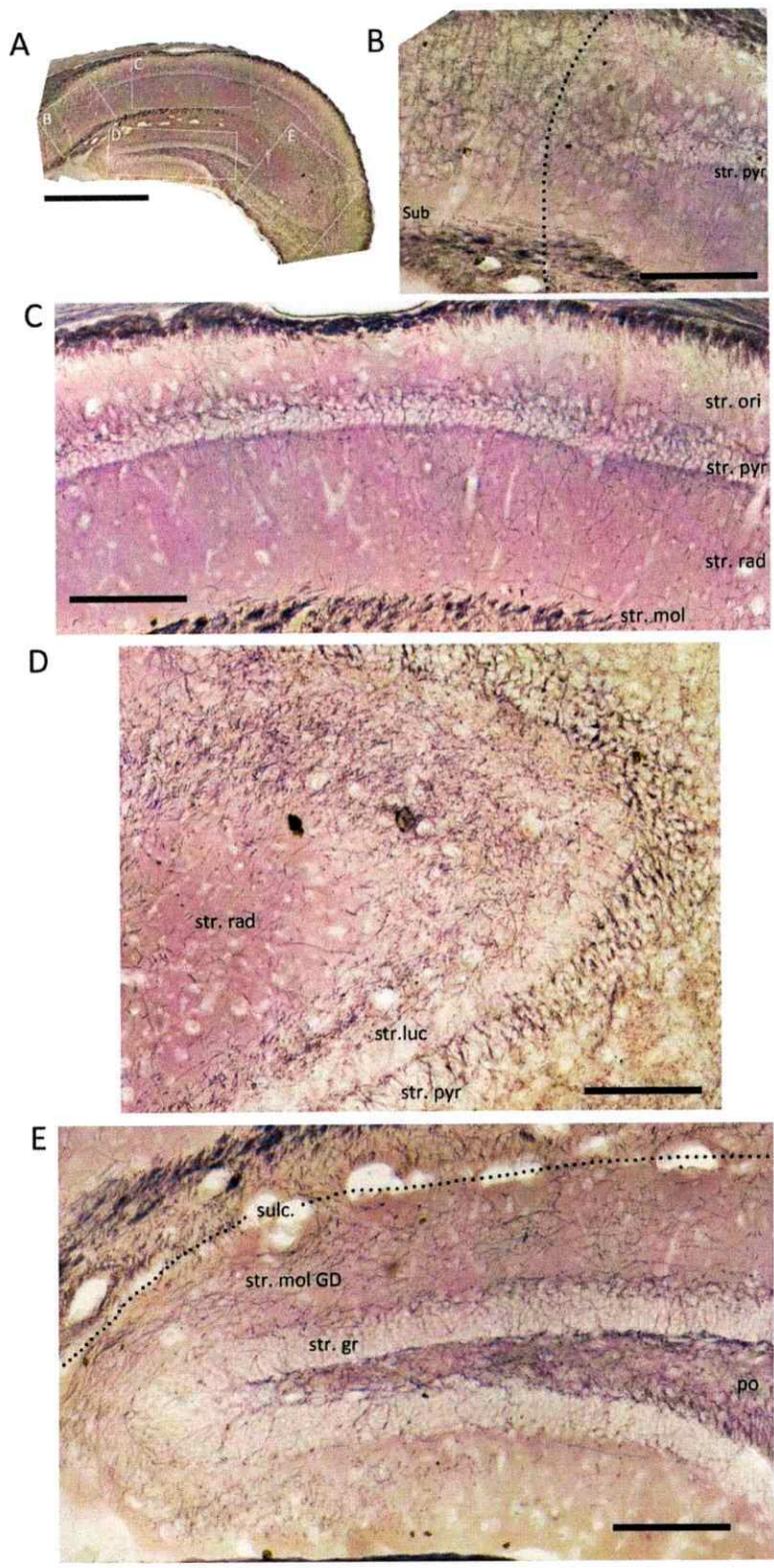


Figura 8. Expresión del ARNm de SEPT8 en hipocampo de cerebro adulto. (A) Imagen representativa de un corte coronal de cerebro de ratón adulto donde se muestra un hemisferio hipocampal incubado con la sonda contra SEPT8. Barra de tamaño 0.5 mm. Se demarcan con cuadros blancos las distintas regiones de la estructura del hipocampo analizadas. **(B)** Inicio de la estructura hipocampal. Con la línea punteada se demarca la interfase entre el *subiculum* (sub) y la región CA1 del hipocampo. **(C)** Región CA1 del hipocampo. **(D)** Región CA2 y CA3 del hipocampo. **(E)** Giro dentado. La línea punteada demarca la interfase (*sulcus*) entre el giro dentado y la región CA1 del hipocampo. Barras de tamaño B – E son de 0.1 mm. Se señalan las siguientes estructuras: *Stratum pyramidale* (str. pyr). *Stratum oriens* (str. ori). *Stratum radiatum* (str. rad). *Stratum moleculare* (str. mol). *Stratum lucidum* (str. luc). *Sulcus* hipocampal (sul). *Stratum moleculare* del giro dentado (str. mol GD). *Stratum granulosum* (str. gr). Capa polimórfica (po).

proveniente de ratón adulto, lo que se interpreta como expresión específica del ARNm que codifica para esta proteína en esta estructura (Figura 8A). A grandes rasgos se puede apreciar expresión de SEPT8 en las regiones CA1-CA3 (*cornu ammonis* 1 - 3) y en el giro dentado del hipocampo, como también en zonas peri-hipocampales. Es importante destacar que es estas mismas regiones mencionadas donde se ha caracterizado la presencia de fibras mielinizadas en el hipocampo en estadios adultos (Meier y col., 2004; Ye y col., 2013). En el *subiculum* (sub) se observa tinción en fibras verticales y horizontales, sin embargo la señal de SEPT8 no es detectada en cuerpos celulares (somatas) en esta zona. SEPT8 se encuentra presente en fibras de la región CA1 del hipocampo, sin embargo y al igual que en el caso anterior, la señal no marca cuerpos celulares, en particular en el *stratum pyramidale* (str. pyr) (Figura 8B). Cabe destacar que cualitativamente existe una reducción en la densidad de fibras positivas para SEPT8 en la región CA1 hipocampal en comparación al *subiculum* (Figura 8B). La ausencia de del ARNm de SEPT8 en cuerpos celulares se replica en las distintas capas de la región CA1 del hipocampo: *stratum oriens*, *stratum pyramidale* y *stratum radiatum*. Sin embargo se observan fibras positivas para SEPT8 específicamente en

zonas del *stratum oriens*, las que en algunos casos logran proyectar hacia porciones del *stratum radiatum*. Estas fibras podrían corresponder a axones mielinizados de interneuronas GABAérgicas inhibitorias que emergen desde somas ubicados en el *str. oriens* y que proyectan hacia regiones del *str. radiatum* y *str. moleculare* (Maccaferri y col., 2005). También se observa un fuerte marcaje en la región del CA1 correspondiente a *stratum moleculare* (Figura 8C). No se aprecian somas positivos para SEPT8 en las regiones CA2 y CA3 del hipocampo en ninguna de sus capas. Se observa una alta densidad de fibras marcadas con la sonda en la región del *str. radiatum*, las que podrían corresponder a axones que contactan el árbol dendrítico apical de las neuronas piramidales excitatorias que poseen sus somas situados en el *str. pyramidale* de la región CA3 del hipocampo. Se aprecian densas agrupaciones positivas para SEPT8 en el *str. pyramidale*, sin embargo no se logra distinguir de manera certera si este marcaje se encuentra sobre o alrededor de somas neuronales (Figura 8D). En el giro dentado no existe señal positiva para SEPT8 en los somas de las neuronas ubicadas en el *stratum granulosum*, incluso solo pocas fibras son detectadas proyectando hacia esta región o transitando a través de ella. En el *stratum moleculare* del giro dentado y en la capa polimórfica se observa una gran cantidad de fibras positivas para SEPT8. No es evidente la presencia de fibras que traspasen el *sulcus* o fisura hipocampal delimitado con una línea punteada, sugiriendo que las proyecciones entre la región CA1 y el giro dentado no son positivas para SEPT8 (Figura 8E).

Se observa marcaje positivo para la sonda de SEPT8 en distintas regiones que conforman la corteza del cerebro de ratón adulto (Figura 9A). Al igual que para el hipocampo, para determinar las estructuras anatómicas corticales se utiliza como

referencia la base de datos *Allen Brain Atlas: Mouse Brain* disponible en línea. En la corteza retrosplenial (*Retrosplenial cortex*, RSC) la marca de SEPT8 se encuentra excluida de cuerpos celulares, sin embargo se observan fibras positivas para la señal de SEPT8, las que emergen desde el cuerpo calloso. (Figura 9B). En adición a la localización en fibras, SEPT8 también presenta un patrón de expresión espacial punteado en algunas porciones de la corteza retrosplenial, que podrían corresponder a terminales nerviosos presinápticos (*Inset*, Figura 9B). Regiones corticales ubicadas hacia posición dorsal comprenderían entre otras la corteza visual (Figuras 9C y 9D), y la corteza auditiva (Figura 9E). Para el caso de la putativa corteza visual no se puede determinar si las regiones analizadas corresponden a las secciones anteromedial, primaria o anterolateral. La señal de SEPT8 se encuentra ausente de cuerpos celulares en todas las capas corticales. Se observan muy pocas fibras SEPT8 positivas en la capa I, lo que se condice con la baja densidad neuronal característica de esta capa cortical. En la Figura 9C se aprecia que las fibras positivas para SEPT8 en su mayoría no se encuentran presentes en las capas corticales II/III, mientras que si se observan en las capas IV/V. La Figura 9D corresponde a una sección ubicada hacia la región dorsal, y en esta zona si se puede ver que tanto las capas II/III y IV/V se encuentran densamente pobladas por fibras SEPT8 positivas. Se observa un gran número de tractos positivos para SEPT8 en la capa VI, las que en su mayoría son horizontales. Finalmente SEPT8 se observa en una sección que correspondería a la corteza auditiva, ubicada hacia ventral respecto a la corteza visual, con una señal predominantemente presente en fibras en las capas II-VI y prácticamente ausente de la capa I (Figura 9E).

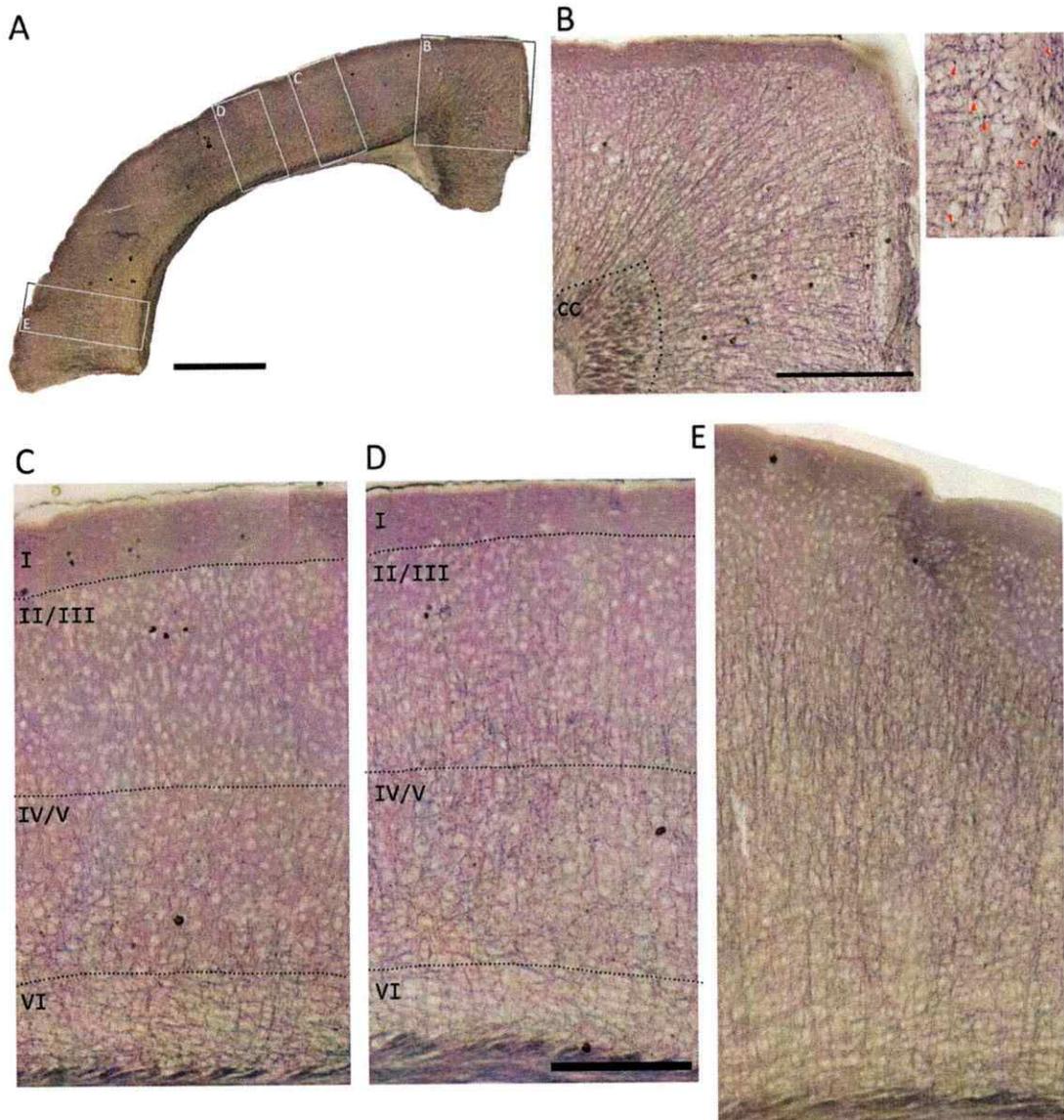


Figura 9. Expresión del ARNm de SEPT8 en corteza de cerebro adulto. (A) Imagen representativa de un corte coronal de cerebro de ratón adulto donde se muestra un hemisferio cortical incubado con la sonda contra SEPT8. Barra de tamaño 1.0 mm. Se demarcan con cuadros blancos las distintas regiones de la corteza analizadas, las que fueron determinadas utilizando la base de datos *Allen Brain Atlas: Mouse Brain*. (B) Corteza retrosplenial y cuerpo calloso, demarcado con línea punteada. Barra de tamaño 0.5 mm. *Inset* muestra patrón de expresión punteado para la marca de SEPT8, el cual es señalado con puntas de flecha roja. (C) y (D) Regiones corticales que abarcarían parte de la corteza visual. Con líneas punteadas se demarcan límites estimados de las distintas capas corticales, abarcando desde la capa I hasta las VI.

Barra de tamaño 0.5 mm. (E) Región cortical que comprendería a parte de la corteza auditiva.

Se evaluó la expresión de SEPT8 en regiones cerebelares en cerebro de ratón adulto. Se observa señal positiva para la sonda contra SEPT8 en los folículos que forman parte de la corteza del cerebelo (Figura 10A). Se observa que en cerebelo se replica el fenotipo observado en hipocampo y corteza, donde la señal de SEPT8 se encuentra ausente de cuerpos celulares en las tres capas analizadas (granular, de células de Purkinje y molecular, Figura 10B). Al analizar la región más interna de la corteza cerebelar, correspondiente a la capa granular, se aprecian fibras positivas para SEPT8 pasando a través de esta estructura y arribando a una región central donde aparentemente convergen. Esta porción central ubicada en la región interna de la capa granular corresponde a materia blanca (Voogd y Glickstein, 1998), por lo que fibras positivas para SEPT8 en esta región podrían corresponder a fibras mielinizadas. Se detecta un marcaje difuso, sin un patrón espacial determinado de la sonda SEPT8 en la capa de células de Purkinje. En la capa molecular, que es donde se ubican los amplios e intrincados arboles dendríticos de las células de Purkinje (Voogd y Glickstein, 1998), se observa una señal fibrilar positiva para SEPT8. Finalmente se observa que entre folículos de la corteza del cerebelo se ubican gruesas fibras positivas para SEPT8 (Figura 10B, cabezas de flecha).

Una vez determinada la expresión de SEPT8 en SNC, queda determinar la localización espacial de esta ARNm en tejido de sistema nervioso periférico (SNP). Para esto se realizaron cortes de nervio ciático proveniente de ratones adultos, los que



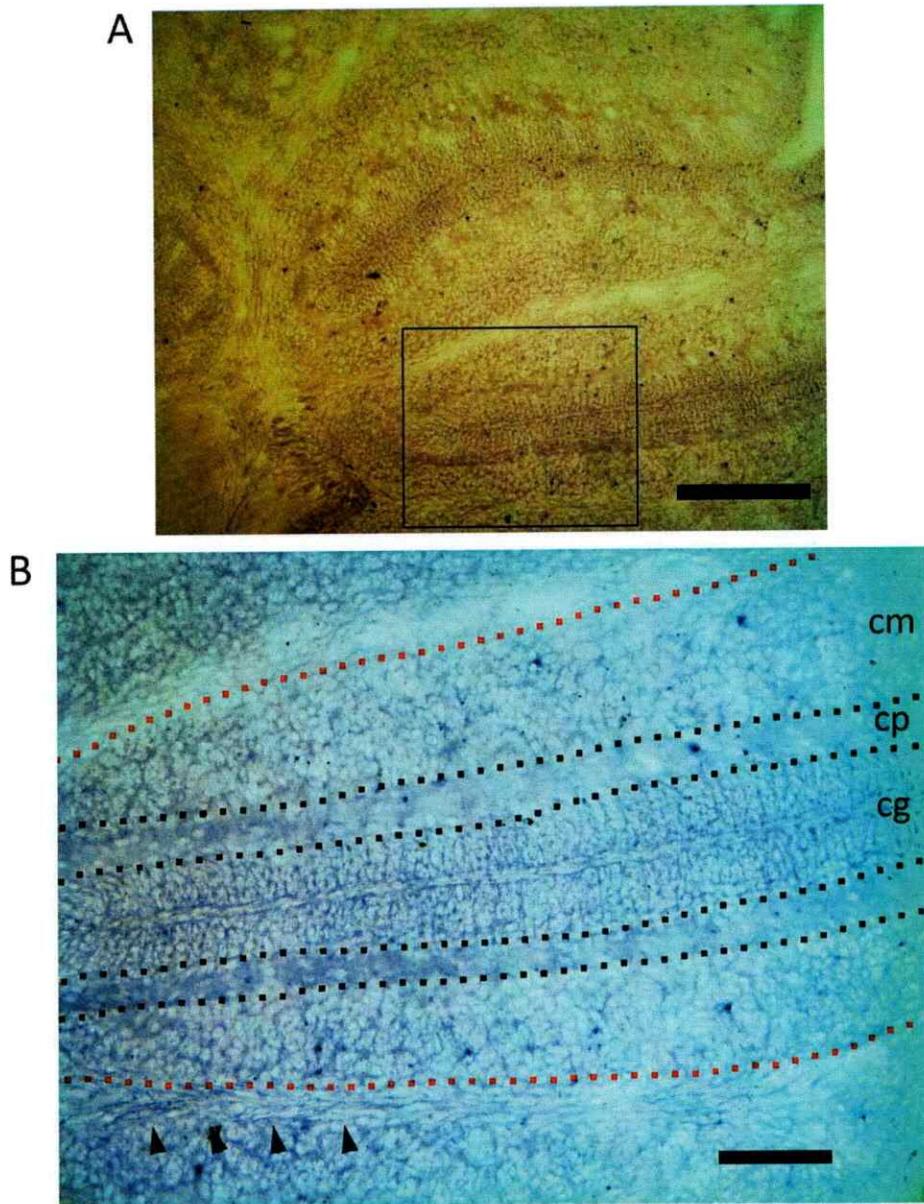


Figura 10. Expresión del ARNm de SEPT8 en cerebelo de cerebro adulto. (A) Imagen representativa de un corte de región cerebelar de cerebro adulto positiva para la sonda de SEPT8. Se demarca una región correspondiente a la corteza cerebelar. Barra de tamaño 200 μm . **(B)** Sección correspondiente a la corteza cerebelar donde se demarcan con líneas punteadas las tres capas que la conforman: capa granular (cg), capa de células de Purkinje (cp) y capa molecular (cm). Cabezas de flecha negras indican tracto positivo para SEPT8 que se ubica entre dos lóbulos de la corteza del cerebelo. Barra de tamaño 100 μm .

fueron incubados con la sonda de ARNm contra SEPT8. Se detecta señal de SEPT8 a lo largo del nervio ciático, la que aparentemente se distribuye de manera fibrilar (Figura 11A). Al analizar la región distal (Figura 11B) y región medial (Figura 11C) del nervio ciático, se confirma la observación realizada previamente, ya que se pueden distinguir fibras positivas para SEPT8 que se ubican de manera longitudinal y paralelas a la extensión del nervio. Dicho patrón de expresión se observa a una magnificación mayor en el *inset* de la Figura 11C. Se ha descrito que células de Schwann se encuentran presentes en nervio ciático y que en este contexto mielinizan fibras nerviosas durante el desarrollo de esta estructura (Martini y Schachner, 1986), por lo que la señal de SEPT8 podría dar cuenta de la expresión de esta proteína en células de Schwann presentes en el nervio ciático. No se observan estructuras positivas para SEPT8 que pudiesen corresponder a cuerpos celulares presentes en el tejido, lo que sugiere que los fibroblastos u otros tipos celulares presentes no expresarían una cantidad elevada de SEPT8.

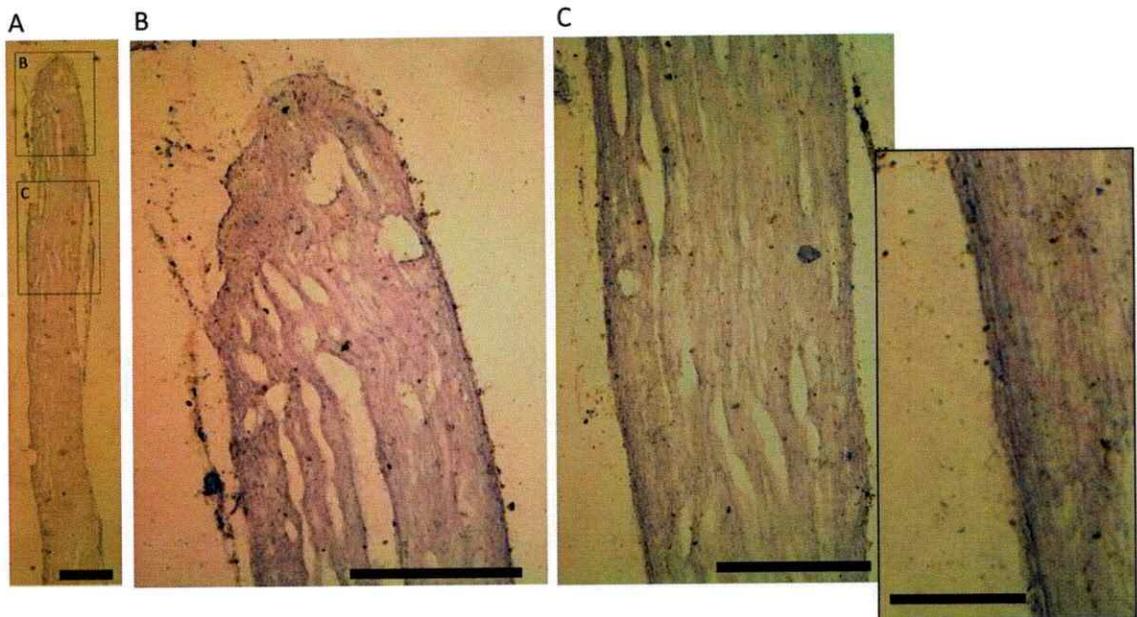


Figura 11. Expresión del ARNm de SEPT8 en nervio ciático adulto. (A) Imagen representativa de un corte longitudinal de nervio ciático incubado con sonda contra SEPT8. Barra de tamaño 0.5 mm. Región distal (B) y región medial (C) de nervio ciático. Barra de tamaño 0.5 mm. *Inset* muestra fibras longitudinales positivas para SEPT8. Barra de tamaño 150 μ m.

Clonamiento de la proteína de fusión GST-SEPT8

Con el propósito de generar la proteína de fusión GST-SEPT8 se propuso clonar la secuencia que codifica para el extremo carboxilo terminal de SEPT8 amplificada con los partidores específicos previamente diseñados, en el vector comercial de expresión bacteriana pGEX5.1 (GE Healthcare Life Science). El vector generado consiste en un promotor bacteriano que comanda la expresión de un fragmento de la proteína glutatión S-transferasa (GST), el que se ubica en la región

amino terminal de la proteína de fusión generada al clonar la secuencia de SEPT8. Los partidores utilizados fueron diseñados de tal manera de otorgar direccionalidad al momento de insertar la secuencia de ADNc de SEPT8, añadiendo un sitio de corte para la enzima de restricción EcoRI en el partidor anterógrado, y un sitio de corte para la enzima de restricción NotI en el partidor retrógrado, permitiendo que la secuencia de Septina 8 se inserte en la dirección apropiada para que posteriormente la proteína de fusión se traduzca íntegramente (Figura 12A). Entre la secuencia codificante para GST y el sitio de múltiple clonamiento (SMC), se encuentra la secuencia de reconocimiento para la proteasa factor $X\alpha$, lo que permite una vez que se obtenga la proteína de fusión purificada, separar mediante corte proteolítico las secuencias aminoacídicas de GST y de SEPT8, produciendo finalmente el dominio carboxilo terminal de SEPT8 purificado (Figura 12A). Tres clones son positivos para la presencia del inserto de SEPT8, por lo que poseen el inserto en la orientación correcta otorgada por los sitios de corte de las enzimas de restricción (Figura 12B). Se seleccionó el clon 2 para la inducción de la proteína de fusión. La expresión de GST en el vector pGEX5.1 se encuentra bajo el control del promotor bacteriano tac, el que es inducible por IPTG (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*). La inducción con 1.0 mM y 10.0 mM de IPTG aumenta la expresión de todas las proteínas observadas en el rango de peso molecular otorgado por el gel de poliacrilamida, incluyendo la banda de 43 kDa que correspondería a GST-SEPT8 (Figura 12C). Sin embargo en ninguna de las condiciones bajo las que se realiza la inducción se observa un incremento específico aparente de los niveles de GST-SEPT8. Considerando esta limitante técnica se decide no continuar con la

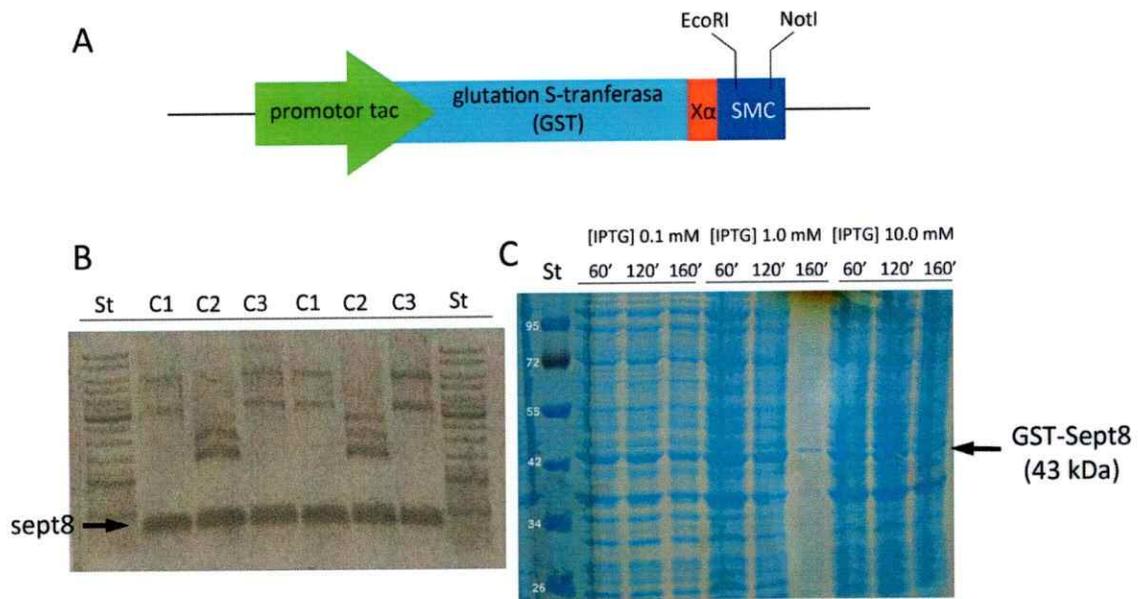


Figura 12. Generación y expresión de la proteína GST-SEPT8. (A) Esquema del vector pGEX5.1 donde se clonó el inserto de SEPT8. X α , sitio de corte para la proteasa factor X α . SMC, sitio de múltiple clonamiento. Se señalan las posiciones estimadas de las secuencias e corte para las enzimas de restricción EcoRI y NotI. (B) PCR contra Septina 8 a partir de tres clones distintos generados y purificados. Reacción se lleva a cabo por duplicado para cada clon siguiendo el protocolo descrito en la Figura 7A, con una temperatura de annealing de 60.3 °C. Con flecha se señala el amplificado correspondiente a SEPT8. (C) Inducción de la expresión de GST-SEPT8 (clon 2) con distintas concentraciones de IPTG (0.1, 1.0 y 10 mM) a distintos tiempos (60, 120 y 160 minutos). Tinción con azul de Coomassie sobre gel de poliacrilamida, donde fueron cargadas las muestras protéicas bacterianas y separadas de acuerdo a su peso molecular siguiendo el protocolo de SDS-PAGE. Con flecha negra se señala la banda de aproximadamente 43 kDa que correspondería a la proteína de fusión GST-SEPT8 (peso molecular de GST es aproximadamente 28 kDa, y peso molecular predicho para la región carboxilo terminal de SEPT8 es aproximadamente 14 kDa).

purificación de la proteína de fusión y cambiar la estrategia experimental para analizar la localización subcelular de SEPT8.

EGFP-SEPT8 presenta una localización aparente asociada a la membrana plasmática

Se decidió clonar el vector que genere la proteína de fusión SEPT8 asociada a la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP). Para esto se utilizó el vector comercial pEGFP-C1 (Clontech), el cual codifica para la proteína fluorescente verde aumentada (*enhanced GFP*, EGFP). Utilizando este vector, la secuencia de GFP quedará ubicada hacia el extremo amino terminal de la proteína de fusión. Se diseñan partidores específicos que amplifican la secuencia completa del ADNc de SEPT8 (1293 pares de bases). Se esquematiza el mapa del vector generado en la Figura 13A. El protocolo de PCR seguido para amplificar la secuencia completa de SEPT8 se muestra en la Figura 13B. Se puede apreciar que a diferencia de los protocolos descritos previamente, en este caso el tiempo de elongación en el ciclo de amplificación es de mayor duración (70 segundos) acorde al mayor tamaño de la secuencia a amplificar. Se observa el vector y el amplificado de SEPT8 completo, ambos doble digeridos con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI, y purificados para ser utilizados en la reacción de ligación (Figura 13C). Los clones seleccionados son positivos para la amplificación de la secuencia de SEPT8 (resultado no mostrado). Para evaluar la localización subcelular de la proteína de fusión generada se realizaron ensayos de transfección utilizando la línea celular TC620, correspondiente a un oligodendroglioma derivado de humano que se ha descrito expresa marcadores correspondientes a oligodendrocitos inmaduros (Kashima y col., 1993). Al transfectar el vector pEGFP-C1 vacío, se observa una señal de fluorescencia ubicua y homogénea en el cuerpo celular de las células transfectadas correspondiente a la señal de EGFP, sin cambios aparentes en la morfología de estas células (Figura 13D). Al transfectar el vector

EGFP-SEPT8 se observa señal de fluorescencia en la proximidad del límite celular, aparentemente asociada a membrana plasmática. La señal de fluorescencia en el citoplasma o núcleo es tenue, y no existen cambios morfológicos aparentes de la células transfectadas (Figura 13E).

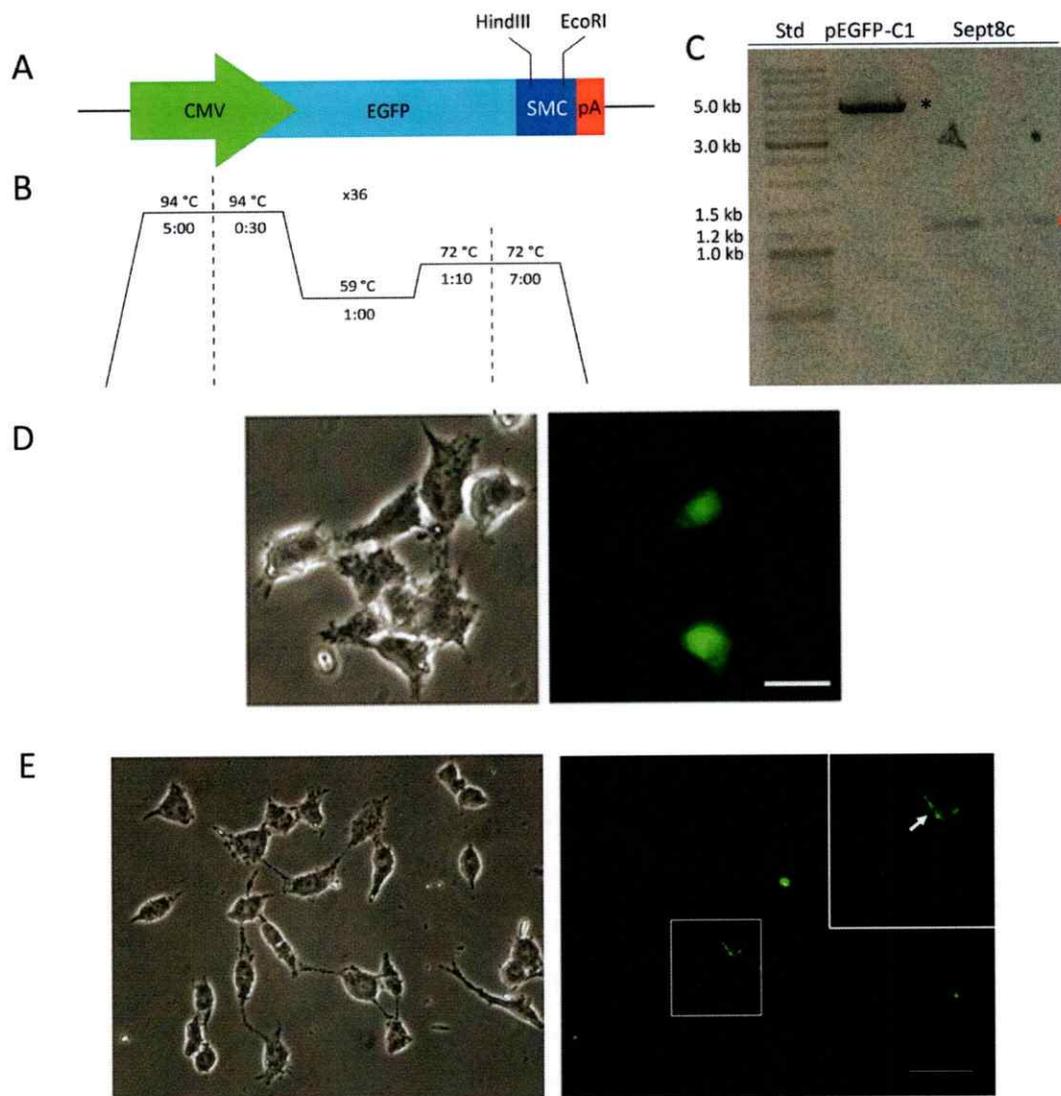


Figura 13. Localización de EGFP-SEPT8 en células TC620 es asociada a membrana plasmática. (A) Esquema del vector pEGFP-C1 donde se clonó el inserto correspondiente a la secuencia codificante completa para SEPT8. CMV, promotor de mamífero con región reguladora derivada de citomegalovirus de humano. EGFP, *enhanced green fluorescent protein*. SMC, sitio de múltiple clonamiento. pA, señal de poliadenilación. (B) Diagrama del protocolo de PCR utilizado para la amplificación de la secuencia de SEPT8 de aproximadamente 1300 pb. (C) Productos doble digeridos con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI, y purificados utilizados en reacción de ligación con Ligasa T4. Carril Std, estándar de peso molecular. Carril pEGFP.C1, vector vacío linealizado de aproximadamente 5 kb (asterisco negro). Carril SEPT8c, secuencia completa de ADNc obtenida mediante PCR de aprox. 1300 pb, mostrada por duplicado (asterisco rojo). (D) Células del oligodendrogloma humano TC620 transfectadas con el vector pEGFP-C1. Panel izquierdo contraste de fase y panel derecho de fluorescencia corresponden al mismo campo visual. Barra de tamaño 10

μm . (E) Células del oligodendroglioma humano TC620 transfectadas con el vector pEGFP-SEPT8. Panel izquierdo contraste de fase y panel derecho de fluorescencia corresponden al mismo campo visual. Barra de tamaño $20 \mu\text{m}$. *Inset* muestra una mayor magnificación de las células dentro del recuadro blanco.

DISCUSIÓN

Presencia de ARNm de SEPT8 en fibras mielinizadas.

En el SNC, los principales componentes protéicos de la mielina compacta son las proteínas PLP (*Myelin proteolipid protein*) y MBP (*Myelin basic protein*) (Aggarwal y col., 2011a). PLP es una proteína altamente hidrofóbica de transmembrana, que es traducida por ribosomas en el retículo endoplásmico para luego ser transportada a la membrana de la mielina, a través de una serie de pasos que involucran ciclos de exo- y endocitosis (Trajkovic y col., 2006; Laursen y col., 2011). Por otro lado, se ha descrito la presencia del ARNm de MBP y de polirribosomas libres en la mielina purificada (Colman y col., 1982), y posteriormente se comprobó que la traducción de MBP en oligodendrocitos ocurre asociada a la mielina, en un proceso que involucra el transporte a través de microtúbulos (MT) del ARNm de MBP asociado a gránulos de polirribosomas desde el soma hacia la vaina de mielina (Ainger y col., 1993; Ainger y col., 1997; Muller y col., 2013). La síntesis protéica de MBP ocurre específicamente en sitios de contacto axo-glial, y es mediada por la activación de la kinasa Fyn e integrinas (White y col., 2008), sin embargo no se ha determinado el compartimento citoplasmático donde este fenómeno ocurre, abriéndose la posibilidad de que ocurra en *loops* paranodales o en el mesaxón interno del oligodendrocito, por ejemplo. En el presente estudio se demostró mediante hibridación *in situ* la presencia del ARNm de SEPT8 en aparentes fibras mielinizadas, y no en somas celulares en distintas regiones de cerebro y en nervio ciático, pudiendo entonces suponer que la traducción de SEPT8 en oligodendrocitos y en células de Schwann podría ocurrir asociada a la mielina,

similar a lo observado para MBP (Figura 14A). Sin embargo, siguiendo la metodología ya mencionada, no es posible discernir si el ARNm de SEPT8 se encuentra en la célula glial, o en el axón de la neurona que está siendo mielinizada. Si el ARNm fuese de naturaleza axonal, emerge la posibilidad de que el ácido nucléico, en conjunto con la maquinaria de traducción, estuviese siendo transferido desde la célula glial hacia la neurona, siguiendo un mecanismo de comunicación celular basado en el traspaso de elementos a través de exosomas (Figura 14B). Los exosomas, vesículas de 50 - 100 nm de diámetro contenidas en endosomas multivesiculares que liberan su contenido al medio extracelular (They y col., 2009), contienen ARNm y microARN que pueden ser transferidos horizontalmente de una célula a otra, manteniendo su funcionalidad en su nueva locación, fenómeno que recibe el nombre de "lanzamiento de ARN exosomal" (*exosomal shuttle RNA*, esRNA) (Valadi y col., 2007). Se ha demostrado que tanto oligodendrocitos en SNC y células de Schwann en SNP, liberan exosomas cargados con proteínas y ARNs, que son incorporados por los axones mielinizados contribuyendo así a la integridad neuronal (Lopez-Berilli y col., 2013; Fruhbeis y col., 2013). Si bien en la actualidad no existe una librería de los ARNm presentes en exosomas de células mielinizantes, una posibilidad es que el ARNm de SEPT8 sea transferido vía exosomal de una glía hacia un axón, donde se traducirá localmente. Es importante destacar que no se ha descrito la presencia de ARNm o péptido de algún miembro de la familia de las Septinas en exosomas. Solo se ha detectado en modelos que no involucran sistema nervioso la presencia de SEPT2, 9 y 11 en otro tipo de vesículas extracelulares, llamadas *shed microvesicles* (Xu y col., 2015).

Una tercera alternativa es que el ARNm de SEPT8 sea de origen neuronal, y que la traducción local ocurra en el axón de manera célula-autónoma (Figuras 14C). Se

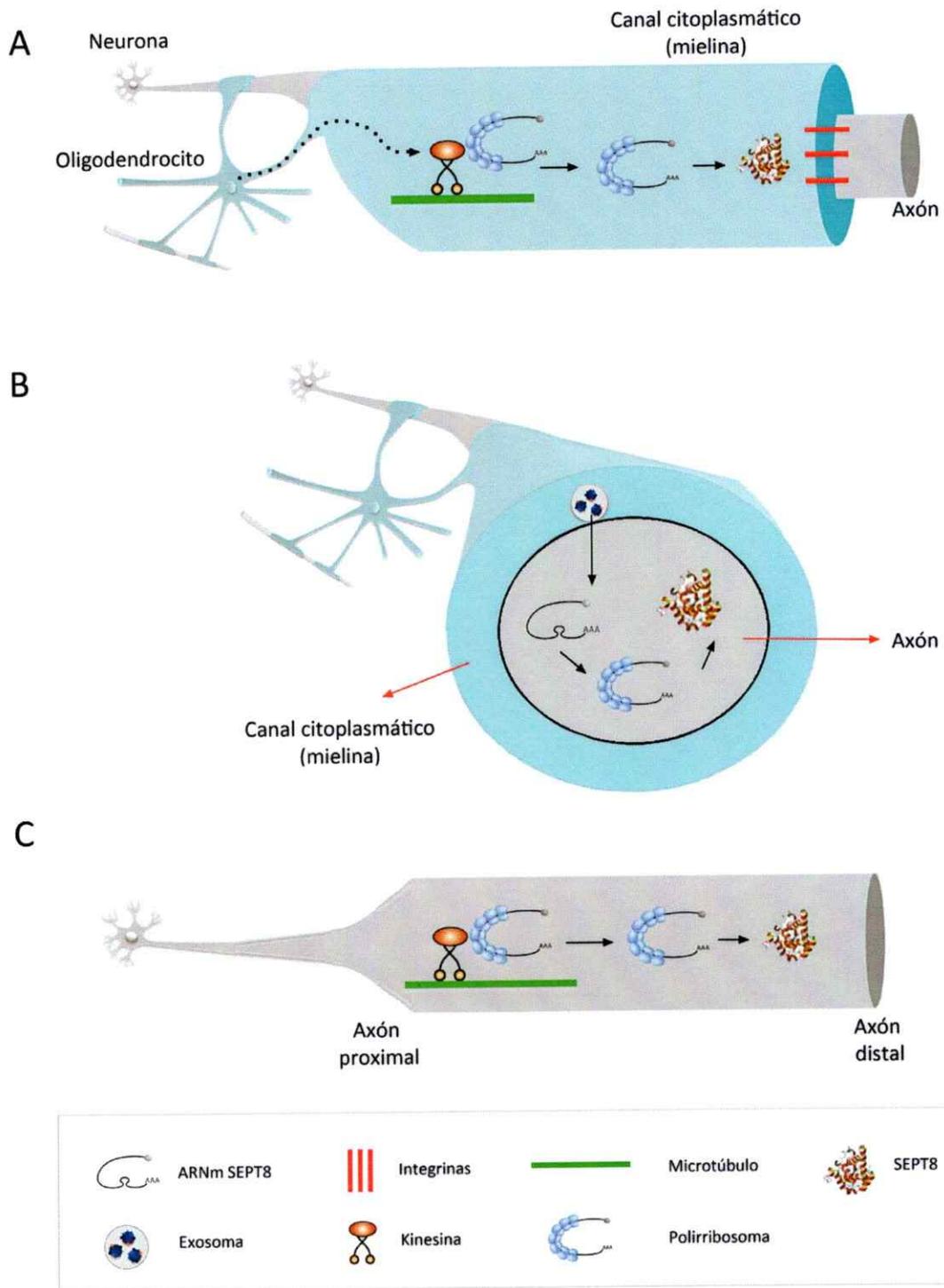


Figura 14. Posibles mecanismos de traducción del ARNm de SEPT8. (A) El ARNm de SEPT8 es transportado desde el soma del oligodendrocito hacia la mielina, donde es traducido en regiones de contacto axo-glial, similar a lo que ocurre con la proteína

MBP. **(B)** EL ARNm de SEPT 8 es transferido a través de exosomas desde las células mielinizantes hacia la neurona, donde finalmente es traducido. **(C)** El ARNm de SEPT8 es de origen neuronal, y es transportado a través de microtúbulos a lo largo del axón, donde es finalmente traducido de manera local (Modificado de Bassell y Warren, 2008, y Fruhbeis y col., 2013).

ha descrito que en axones del SNP se encuentran enriquecidos los ARNm de diversas proteínas citoplasmáticas, junto con la maquinaria de traducción (Minis y col., 2014). Además, se ha reportado traducción local en axones de neuronas del SNC, sin embargo este fenómeno ocurre predominantemente durante etapas tempranas del desarrollo neuronal (Lin y Holt, 2008). Esto sumado al hecho de que múltiples miembros de la familia de las Septinas han sido detectado en neuronas, donde se les ha atribuido funcionalidad, da sustento a la posibilidad de la traducción local de SEPT8 en axones.

Independiente del mecanismo de traducción, el hecho de que el ARNm de SEPT8 se encuentre altamente enriquecido en oligodendrocitos y células de Schwann durante la mielinización y no en etapas anteriores de la diferenciación celular (Buser y col., 2009), permite suponer que la traducción de SEPT8, ya sea a nivel glial o axonal, está íntimamente relacionada con el establecimiento y mantención de la vaina de mielina.

Mantención de los dominios subcelulares de la mielina: Un posible rol para las Septinas.

La localización diferencial de proteínas, lípidos y organelos en las células mielinizantes, permite que se generen y mantengan sus distintos dominios

subcelulares: la mielina compacta y los canales citoplasmáticos. Esta compartimentalización, es posible en parte a la función de: a) proteínas de andamio o *scaffold*, que otorgan una superficie de reclutamiento para la integración localizada del citoesqueleto y distintas vías de señalización, y a b) las barreras a la difusión lateral, que restringen el movimiento de (glico) proteínas y lípidos en el plano de la membrana plasmática, estableciendo dominios estructural y funcionalmente diferentes (Saarikangas y Barral, 2011; Trimble y Grienstein, 2015). Como se mencionó en la introducción, las Septinas conforman barreras a la difusión en la membrana plasmática en: el cuello de yemación (*budding neck*) de levaduras en división (Takizawa y col., 2000), en la base del cilio primario de células eucariontes (Hu y col., 2010), y en la base de espinas dendríticas en neuronas glutamatérgicas (Ewers y col., 2014), lo que abre la posibilidad de que las Septinas, en particular SEPT8, actuaría como barrera a la difusión en la mantención de los subdominios de la vaina de mielina en oligodendrocitos y/o células de Schwann, como también en el axolema de la neurona mielinizada.

En células mielinizantes (TC620) observamos que EGFP-SEPT8 presenta una localización subcelular aparentemente asociada a la membrana plasmática, que se condice con el hecho de que las Septinas, a través de su dominio poli-básico, pueden interactuar con membranas (Casamayor y Snyder, 2003). Esta interacción ocurre específicamente con el lípido PIP2 (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*), y parece ser necesaria y fundamental para la función de las Septinas como barreras a la difusión, puesto que al depletar de PIP2 la membrana plasmática, se pierde el anillo contráctil formado por cdc-10 en el cuello de yemación en levaduras (Rodríguez-Escudero y col., 2005), como también los filamentos formados por SEPT4 que regulan



la citoquinesis en células de mamíferos (Zhang y col.,1999). Esta interacción entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de Septinas es bidireccional, ya que PIP2 regula el ensamblaje de los filamentos de Septinas (Bertin y col., 2010), y a su vez los filamentos de Septinas regulan la curvatura y morfología de liposomas *in vitro*, sugiriendo un rol para las Septinas en la morfogénesis cortical (Tanaka-Takiguchi, y col., 2009; Bridges y Gladfelter, 2015). Si bien no se ha demostrado la interacción directa entre SEPT8 y la membrana plasmática, la secuencia poli-básica de interacción con PIP2 se encuentra en la región conservada entre Septinas, lo que permite suponer que la localización de EGFP-SEPT8 en la región sub-cortical celular se debe a la interacción con la membrana plasmática a través de este dominio poli-básico de aminoácidos. Esta asociación a membrana abre la posibilidad de que SEPT8 en células mielinizantes funcione como una barrera a la difusión que restrinja o regule la movilización desde la mielina compacta hacia los canales citoplasmáticos, y viceversa. En particular, se ha detectado en fibras nerviosas del nervio ciático (SNP), la presencia de SEPT8 y otros miembros de las Septinas en células de Schwann, específicamente en la región adyacente al nodo de Ranvier y en las denominadas bandas de Cajal (ver Buser y col., 2009 Figura 6F). Si SEPT8 se ubica en los *loops* paranodales, podría funcionar como barrera a la difusión subcortical, tal como la proteína MBP que impide el paso de proteínas que posean un dominio citoplasmático mayor a 20-30 aminoácidos, como Neurofascin-155, Tmem10 y MAG, desde el citoplasma del *loop* paranodal hacia la mielina compacta (Aggarwal y col., 2011b; Simons y col., 2012), Si bien MBP y SEPT8 son proteínas citoplasmáticas, siguiendo este mecanismo podrían regular la transición de proteínas tanto de transmembrana como solubles desde un compartimento a otro (Figura 15A). En otros canales citoplasmáticos, como las incisuras de Schmidt-Lanterman o los *loops* citoplasmáticos interno y externo, existen

uniones estrechas o "*tight junctions*", conformados por la proteína claudin-19, que actúan como barreras a la difusión aislando a la mielina compacta de los canales citoplasmáticos (Miyamoto y col., 2005; Simons y col., 2012). Ya que SEPT8 interactuaría con la membrana plasmática en bandas de Cajal (Buser y col., 2009), podría actuar como barrera a la difusión entre la mielina compacta y otros miembros de los canales citoplasmáticos (Figura 15B). Finalmente, SEPT8 podría tener una funcionalidad en la unión axo-glial, donde existe una segregación estereotipada de componentes moleculares que definen las distintas regiones del axoplama: nodo, paranodo, yuxtaparanodo e internodo (Pedraza y col., 2001). Donde los *loops* paranodales se unen a la membrana axonal, se genera una barrera a la difusión definida por la interacción entre la célula mielinizante y el axón. Esta unión axo-glial está formada por Caspr y contactin en el axón, y por Neurofascin-155 en la glía, y se ha demostrado que en ausencia de Neurofascin-155 no se genera ni la adhesión paranodal axo-glial, ni el complejo protéico característico del nodo (Sherman y col., 2005; Simons y col., 2012). SEPT8 en conjunto con otros miembros de las Septinas, podría formar parte de esta barrera a la difusión, por ejemplo en la formación de *clusters* de proteínas, a través de la interacción con la membrana axonal y con miembros del citoesqueleto, puesto que la estructuración de las Septinas en células de Schwann depende del citoesqueleto de actina (Roth y col., 2013), con el que interactúan, al igual que con microtúbulos (Kremer y col., 2005; Mavrikis y col., 2014) (Figura 15C).

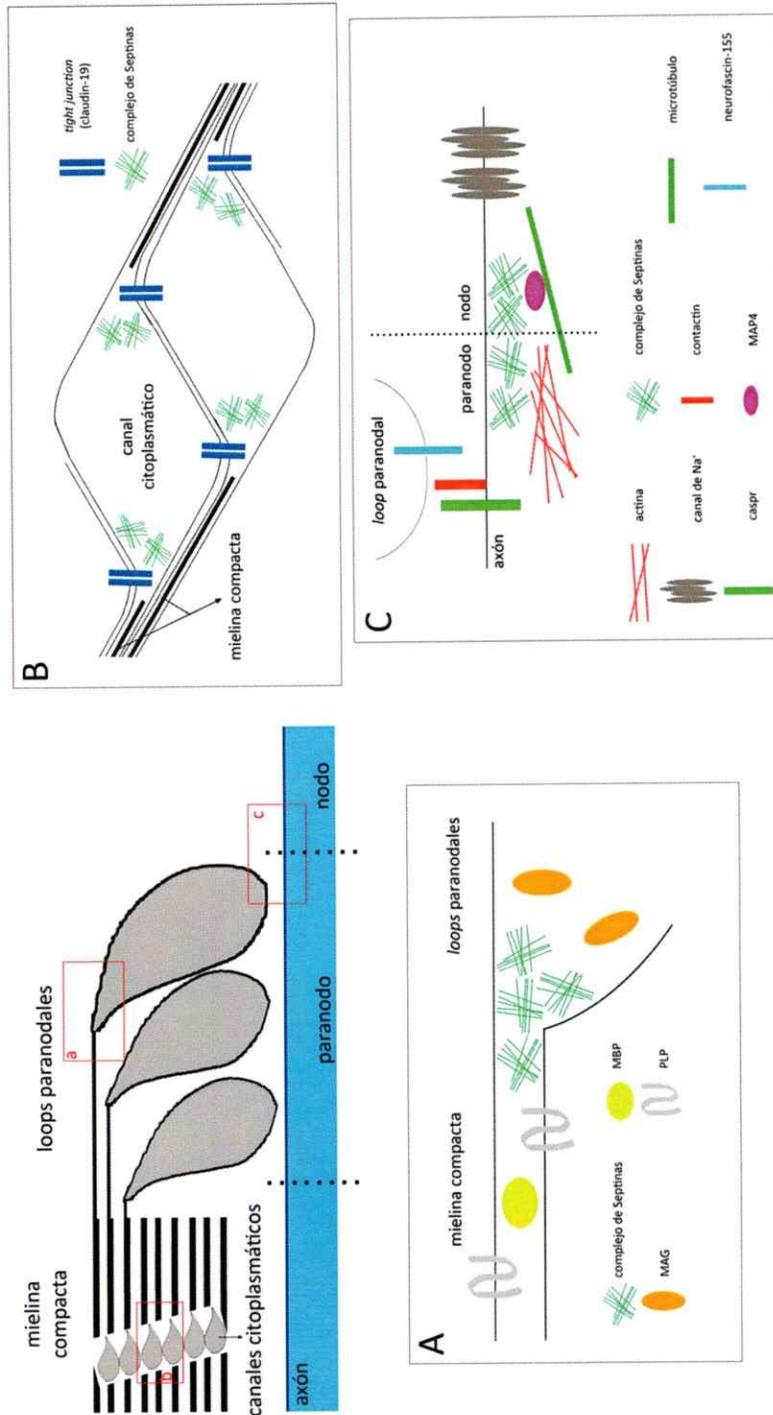


Figura 15. Citoesqueleto de Septinas funciona como barrera a la difusión manteniendo los dominios subcelulares en células mielinizantes. Esquema de sección longitudinal de un axón mielinizado en la región cercana al nodo, enmarcados se muestran 3 posibles ubicaciones donde el citoesqueleto de Septinas podría estar

actuando como barrera a la difusión, manteniendo canales citoplasmáticos y mielina compacta como dominios separados. Complejo de Septinas como barrera a la difusión: entre: (A) mielina compacta y *loops* paranodales; (B) mielina compacta y canales citoplasmáticos, tales como incisuras de Schmidt-Lanterman o bandas de Cajal en SNP, aunque no se puede descartar que se cumpla la misma función en mesaxón interno y/o externo; (C) paranodo y nodo de Ranvier, donde Septinas a través de su interacción con el citoesqueleto permitiría la segregación de proteínas en el axolema de la neurona mielinizada.

Purificación de la proteína GST-SEPT8 recombinante

Se propuso clonar la secuencia del extremo C-terminal de SEPT8 con el fin de expresar la proteína recombinante *in vitro*, para generar posteriormente un suero inmunorreactivo específico contra SEPT8. Este suero sería utilizado para ensayos de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica acoplada a microscopía de fluorescencia. Sin embargo no se obtuvo inducción de la proteína de fusión GST-SEPT8 de aproximadamente 43 kDa, al inducir con IPTG las bacterias transformadas. Se ha documentado previamente que la expresión de Septinas en bacterias conlleva rendimientos de expresión y purificación de estas proteínas muy bajos, ya que la Septinas recombinantes como monómeros no son solubles y tienden a precipitar (Sheffield y col., 2003; Souza y Barbosa, 2010). Una forma de solventar este problema experimental es transformar bacterias con constructos bicistrónicos que codifiquen y expresen más de una Septina, puesto que al parecer la solubilidad de las Septinas recombinantes en el citoplasma requiere de la formación de complejos hetero-oligoméricos entre miembros de la familia de las Septinas (Sheffield y col., 2003). Cabe destacar, que para el caso particular de SEPT8 solo se ha logrado expresar y purificar la región que comprende al dominio central conservado entre Septinas más su

dominio C-terminal variable (Souza y Barbosa, 2010), lo que abre la posibilidad que el dominio central de las Septinas sea necesario para la estabilidad y solubilidad de SEPT8 recombinante, puesto que en nuestras manos al expresar solo la región C-terminal de SEPT8, no se observó expresión de la proteína en bacterias siguiendo distintos protocolos de inducción.

Las septinas, incluyendo a SEPT8, en su extremo C-terminal pueden poseer secuencias repetidas de aminoácidos altamente hidrofóbicos con tendencia a formar estructuras del tipo *coiled coil* (Kartmann y Roth, 2001; Versele y Thorner, 2005). Se ha descrito que péptidos o proteínas hidrofóbicas (incluyendo a las de transmembrana) tienden a formar agregados de alto peso molecular, o cuerpos de inclusión al momento de la lisis celular (Sagné y col., 1996; Lajmi y col., 2000). Una posibilidad es que SEPT8 no sea detectado luego de la inducción debido a que se generen agregados de la proteína recombinante a pesos moleculares altos, o a que estos agregados no sean solubilizados en el *buffer* de lisis. Finalmente, la no detección y/o no inducción de GST-SEPT8 se puede deber a problemas de la técnica, por ejemplo, la expresión de proteínas recombinantes en cultivo bacteriano de alta densidad puede generar la pérdida del plásmido transformado, reducción del pH y acceso limitado a oxígeno, lo que resulta en una producción de proteína baja o incluso nula (Sivashanmugam y col., 2009). Una posible solución a este problema sería realizar la inducción de la proteína recombinante durante un menor tiempo, impidiendo así que el cultivo bacteriano llegué a saturación. En adición, altos niveles de expresión de proteínas recombinantes, no solo pueden generar cuerpos de inclusión, sino que también pueden ser tóxicos para las bacterias (Laage y Langosch, 2001). Si este fuese el caso, una estandarización acabada del protocolo de expresión e inducción de GST-SEPT8 en bacterias *e. coli*

BL21 debiese ser llevada a cabo teniendo en cuenta estas consideraciones experimentales, por ejemplo disminuyendo el tiempo de crecimiento bacteriano y de inducción de expresión. Por otro lado, para evitar la formación de cuerpos de inclusión, la extracción de proteínas podría ser llevada a cabo utilizando *buffers* con una mayor concentración de sales que conllevaría un aumento en la fuerza iónica, o con una mayor concentración de detergentes que interferiría con la formación de interacciones hidrofóbicas entre proteínas.

Expresión de SEPT8 en hipocampo, corteza y cerebelo

La señal del ARNm de SEPT8 es detectada diferencialmente en distintas regiones del hipocampo, corteza y cerebelo, lo que permite suponer que la expresión de SEPT8 regula la mielinización o la función neuronal solo de determinadas proyecciones o áreas anatómicas. En el hipocampo adulto existen fibras mielinizadas en las mismas regiones donde se observó expresión de SEPT8 (Arnold y Trojanowski, 1996; Meier y col., 2004), sin embargo también está densamente poblado por axones no mielinizados, delgados y muy ramificados, que forman sinapsis *en passant* a lo largo de su extensión (Palani y col., 2010). Prácticamente la totalidad de la señal de SEPT8 en el hipocampo es detectada a lo largo de fibras, viéndose excluida de cuerpos celulares, potenciando la idea de que SEPT8 se podría traducir asociado a la mielina, y no en el soma del oligodendrocito.

La presencia de tractos mielinizados en la corteza de mamíferos es heterogénea, donde regiones con relativa baja densidad neuronal y bajo contenido de mielina se caracterizan por poseer neuronas con árboles dendríticos más ramificados, somas de mayor tamaño y mayor densidad de espinas dendríticas (Glasser y van

Essen, 2011). Concordante con esto, neuronas individuales poseen distintos perfiles de mielinización en la corteza, que definen las propiedades fisiológicas intrínsecas de cada axón mielinizado (Tomassy y col., 2014). Con esto en consideración, el fenómeno de mielinización cortical en el que participa SEPT8, podría definir las propiedades de cada uno de los axones mielinizados en las regiones analizadas, permitiendo así otorgar heterogeneidad funcional a la población de neuronas corticales. En mamíferos se ha descrito al cuerpo caloso como un tracto de materia blanca, el que se compone de fibras nerviosas mielinizadas y de células gliales con sus somas ubicados de manera dispersa a lo largo de esta estructura (Peters y Sethares, 2002 ; Hofer y Frahm, 2006). Aparentemente en las regiones analizadas en este trabajo, el cuerpo caloso no se conecta con el hemisferio contralateral, y las fibras positivas para SEPT8 proyectan de tal manera que pasan por la corteza retrosplenial (RSC), por lo que no se puede determinar si estas prolongaciones contactan blancos específicos en esta región cortical o si cruzan hacia el hemisferio cortical complementario. El patrón punteado de la señal de SEPT8 en la corteza retrosplenial podría corresponder a terminales presinápticos, puesto que se ha descrito que las Septinas participan de exocitosis de neurotransmisores (Xue y col., 2004; Tsang y col., 2008). Esta observación apoyaría la hipótesis de la traducción local de proteínas, incluida SEPT8, en regiones distales del axón. Finalmente, es importante considerar que la gran mayoría de las fibras positivas para SEPT8 cruzan longitudinalmente la corteza, siguiendo el mismo patrón que las interneuronas inhibitorias GABAérgicas corticales que poseen axones mielinizados (Thomson y Banister, 2003), abriendo la posibilidad de que SEPT8 participe en la mielinización de axones neuroquímicamente inhibitorios.

Se ha descrito que la mielinización dependiente de oligodendrocitos es fundamental para el normal desarrollo de la citoarquitectura del cerebelo (Mathis y col., 2003). La anatomía de la corteza cerebelar destaca por la presencia de un grupo de neuronas llamadas células de Purkinje, que son consideradas como la unidad computacional del cerebelo ya que integran hasta 150.000 *inputs* sinápticos para posteriormente producir un único *output* (Dizon y Khodakhah, 2011). Los somas de las células de Purkinje se ubican en la denominada capa de células de Purkinje, de donde emerge el árbol dendrítico de esta neuronas que se ubica en la capa molecular, y los axones que proyectan hacia la capa granular (Voogd y Glickstein, 1998; Ramnani, 2006). Los axones de las células de Purkinje son mielinizados durante etapas post-natales, donde las primeras fibras mielinizantes aparecen entre los días P10 y P12 del desarrollo del ratón (Gianola y col., 2003). Considerando que los análisis de hibridación *in situ* fueron realizados sobre tejido proveniente de animales adultos, las fibras positivas para SEPT8 observadas en la capa granular podrían corresponder a tractos axonales mielinizados de las células de Purkinje. La ausencia de SEPT8 en la capa de células de Purkinje se debe a que en esta región solo existen somas celulares, y al parecer la traducción de SEPT8 ocurriría asociada a la vaina de mielina. Finalmente, en la capa molecular se encuentran las dendritas de las células e Purkinje, las que son contactadas por delgados axones mielinizados provenientes de las células granulares (Wyatt y col., 2005). Estos axones mielinizados también son positivos para SEPT8, lo que hace suponer algún rol para esta proteína en el establecimiento y mantención de la mielina en esta región.

Si bien, la detección de mielina través de inmunohistoquímica se lleva a cabo utilizando anticuerpos contra algún componente de esta, como MBP, o a través de

tinción citológica utilizando las tinciones de *Black-Gold* o *Sudan-Black* por ejemplo, la distribución de la señal del ARNm de SEPT8 es muy similar al patrón observado para fibras mielinizadas en distintas regiones del cerebro (ver Meier y col., 2004 Figura 1 y Tomassy y col., 2014 Figura 4A), lo que permite afirmar que lo que observamos es localización de SEPT8 asociada a mielina y no una observación artefactual.

CONCLUSIONES

- Se generaron partidores que amplifican específicamente la región codificante para el extremo C-terminal de SEPT8, que permiten distinguir a esta proteína del resto de las Septinas.
- Mediante RT-PCR utilizando los partidores diseñados, se determinó que el ARNm de SEPT8 se expresa en SNC y SNP durante estadio adulto, etapa en la que existen altos niveles de mielinización, sugiriendo que SEPT8 participaría en la formación y/o mantención de la estructura de la vaina de mielina. Se valida el uso de partidores que amplifiquen regiones específicas en la secuencia nucleotídica como método para detectar expresión diferencial de Septinas.
- El ARNm de SEPT8 es detectado en distintas regiones de cerebro (corteza, hipocampo y cerebelo) y en nervio ciático, aparentemente asociado a fibras mielinizadas. Esto, sumado al hecho de que SEPT8 no se detecta en somas celulares, permite proponer que la traducción de SEPT8 ocurriría asociada a la mielina al igual que en el caso de la proteína básica de la mielina (MBP), o al axón mielinizado.
- Se clonó el vector EGFP-SEPT8, y la expresión de la proteína de fusión en células mielinizantes TC620 es aparentemente asociada a membrana plasmática. Esto sustenta la hipótesis de que SEPT8 formaría parte del citoesqueleto de Septinas que funciona como barrera a la difusión en regiones adyacentes a la

membrana plasmática, manteniendo así los subdominios en células mielinizantes: la mielina compacta y los canales citoplasmáticos.

- Se clonó el vector codificante para GST-SEPT8, con el propósito de purificar la proteína de fusión desde bacterias. Sin embargo, no se logró inducir o detectar la expresión de la proteína recombinante, probablemente a que debido a sus propiedades fisicoquímicas, SEPT8 haya formado agregados o cuerpos de inclusión, tal como se ha descrito ocurre con otros miembros de las Septinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* 2011; 21(10):585-93. (a)
- Aggarwal S, Yurlova L, Snaidero N, Reetz C, Frey S, Zimmermann J, Pähler G, Janshoff A, Friedrichs J, Müller DJ, Goebel C, Simons M. A size barrier limits protein diffusion at the cell surface to generate lipid-rich myelin-membrane sheets. *Dev Cell.* 2011; 21(3):445-56. (b)
- Ainger K, Avossa D, Morgan F, Hill SJ, Barry C, Barbarese E, Carson JH. Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol.* 1993; 123(2):431-41.
- Ainger K, Avossa D, Diana AS, Barry C, Barbarese E, Carson JH. Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol.* 1997; 138(5):1077-87.
- Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci.* 2011; 34(2):76-87.
- Arnold SE, Trojanowski JQ. Human fetal hippocampal development: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neuronal morphologic features. *J Comp Neurol.* 1996; 367(2):274-92.
- Arroyo EJ, Scherer SS. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol.* 2000; 113(1):1-18.
- Aschner M, Allen JW, Kimelberg HK, LoPachin RM, Streit WJ. Glial cells in neurotoxicity development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39:151-73.
- Bassell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron.* 2008; 60(2):201-14.
- Beise N, Trimble W. Septins at a glance. *J Cell Sci.* 2011; 124(24):4141-6.
- Bertin A, McMurray MA, Thai L, Garcia G 3rd, Votin V, Grob P, Allyn T, Thorner J, Nogales E. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *J Mol Biol.* 2010; 404(4):711-31.
- Bläser S, Jersch K, Hainmann I, Wunderle D, Zgaga-Griesz A, Busse A, Zieger B. Human septin-septin interaction: CDCrel-1 partners with KIAA0202. *FEBS Lett.* 2002; 519(1-3):169-72.
- Bläser S, Jersch K, Hainmann I, Zieger W, Wunderle D, Busse A, Zieger B. Isolation of new splice isoforms, characterization and expression analysis of the human septin SEPT8 (KIAA0202). *Gene.* 2003; 312:313-20.
- Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1):37-53.
- Brahic M, Roussarie JP. Axon-myelin interactions during a viral infection of the central nervous system. *PLoS Pathog.* 2009; 5(9):e1000519.

- Bridges AA, Gladfelter AS. Septin Form and Function at the Cell Cortex. *J Biol Chem*. 2015.
- Buser AM, Erne B, Werner HB, Nave KA, Schaeren-Wiemers N. The septin cytoskeleton in myelinating glia. *Mol Cell Neurosci*. 2009; 40(2):156-66.
- Cao L, Ding X, Yu W, Yang X, Shen S, Yu L. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *FEBS Lett*. 2007; 581(28):5526-32.
- Casamayor A, Snyder M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(8):2762-77.
- Cho SJ, Lee H, Dutta S, Song J, Walikonis R, Moon IS. Septin 6 regulates the cytoarchitecture of neurons through localization at dendritic branch points and bases of protrusions. *Mol Cells*. 2011; 32(1):89-98.
- Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14(5):311-21.
- Colman DR, Kreibich G, Frey AB, Sabatini DD. Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol*. 1982; 95(1):598-608.
- Corty MM, Freeman MR. Cell biology in neuroscience: Architects in neural circuit design: glia control neuron numbers and connectivity. *J Cell Biol*. 2013; 203(3):395-405.
- Dahlhaus M, Li KW, van der Schors RC, Saiepour MH, van Nierop P, Heimel JA, Hermans JM, Loos M, Smit AB, Levelt CN. The synaptic proteome during development and plasticity of the mouse visual cortex. *Mol Cell Proteomics*. 2011; 10(5):M110.005413.
- de Monasterio-Schrader P, Jahn O, Tenzer S, Wichert SP, Patzig J, Werner HB. Systematic approaches to central nervous system myelin. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69(17):2879-94.
- Dizon MJ, Khodakhah K. The role of interneurons in shaping Purkinje cell responses in the cerebellar cortex. *J Neurosci*. 2011; 31(29):10463-73.
- El Waly B, Macchi M, Cayre M, Durbec P. Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front Neurosci*. 2014; 8:145.
- Engmann O, Hortobágyi T, Thompson AJ, Guadagno J, Troakes C, Soriano S, Al-Sarraj S, Kim Y, Giese KP. Cyclin-dependent kinase 5 activator p25 is generated during memory formation and is reduced at an early stage in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2011; 70(2):159-68.
- Ewers H, Tada T, Petersen JD, Racz B, Sheng M, Choquet D. A Septin-Dependent Diffusion Barrier at Dendritic Spine Necks. *PLoS One*. 2014; 9(12):e113916.
- Fewou SN, Fernandes A, Stockdale K, Francone VP, Dupree JL, Rosenbluth J, Pfeiffer SE, Bansal R. Myelin protein composition is altered in mice lacking either sulfated or both sulfated and non-sulfated galactolipids. *J Neurochem*. 2010; 112(3):599-610.
- Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, Kirchhoff F, Möbius W, Goebbels S, Nave KA, Schneider A, Simons M, Klugmann M, Trotter J, Krämer-Albers EM. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol*. 2011; 11(7):e1001604.

Field CM, Kellogg D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol.* 1999; 9(10):387-94.

Fujishima K, Kiyonari H, Kurisu J, Hirano T, Kengaku M. Targeted disruption of Sept3, a heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons. *J Neurochem.* 2007; 102(1):77-92.

Fung KY, Dai L, Trimble WS. Cell and molecular biology of septins. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2014; 310:289-339.

Gianola S, Savio T, Schwab ME, Rossi F. Cell-autonomous mechanisms and myelin-associated factors contribute to the development of Purkinje axon intracortical plexus in the rat cerebellum. *J Neurosci.* 2003; 23(11):4613-24.

Glasser MF, Van Essen DC. Mapping human cortical areas in vivo based on myelin content as revealed by T1- and T2-weighted MRI. *J Neurosci.* 2011; 31(32):11597-616.

Gopalakrishnan G, Awasthi A, Belkaid W, De Faria O Jr, Liazoghli D, Colman DR, Dhaunchak AS. Lipidome and proteome map of myelin membranes. *J Neurosci Res.* 2013; 91(3):321-34.

Haarer BK, Pringle JR. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol Cell Biol.* 1987; 7(10):3678-87.

Hall PA, Jung K, Hillan KJ, Russell SE. Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol.* 2005; 206(3):269-78.

Hara A, Taguchi A, Niwa M, Aoki H, Yamada Y, Ito H, Nagata K, Kunisada T, Mori H. Localization of septin 8 in murine retina, and spatiotemporal expression of septin 8 in a murine model of photoreceptor cell degeneration. *Neurosci Lett.* 2007; 423(3):205-10.

Hartline DK, Colman DR. Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr Biol.* 2007; 17(1):29-35.

Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res.* 1971; 69(2):265-76.

Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci.* 2009; 3:31.

Hofer S, Frahm J. Topography of the human corpus callosum revisited—comprehensive fiber tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* 2006; 32(3):989-94.

Hu Q, Milenkovic L, Jin H, Scott MP, Nachury MV, Spiliotis ET, Nelson WJ. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science.* 2010; 329(5990):436-9.

Ishii A, Dutta R, Wark GM, Hwang SI, Han DK, Trapp BD, Pfeiffer SE, Bansal R. Human myelin proteome and comparative analysis with mouse myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(34):14605-10.

Ito H, Atsuzawa K, Morishita R, Usuda N, Sudo K, Iwamoto I, Mizutani K, Katoh-Semba R, Nozawa Y, Asano T, Nagata K. SEPT8 controls the binding of vesicle-associated membrane protein 2 to synaptophysin. *J Neurochem.* 2009; 108(4):867-80.

Jahn O, Tenzer S, Bartsch N, Patzig J, Werner HB. Myelin proteome analysis: Methods and implications for the myelin cytoskeleton. In: Dermietzel R, (ed.); *The cytoskeleton: Imaging, isolation, and interaction. Neuromethods.* 2013; 79:335-353

Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(9):671-82.

Kamasawa N, Sik A, Morita M, Yasumura T, Davidson KG, Nagy JI, Rash JE. Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience.* 2005; 136(1):65-86.

Kartmann B, Roth D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *J Cell Sci.* 2001; 114(5):839-44.

Kashima T, Tiu SN, Merrill JE, Vinters HV, Dawson G, Campagnoni AT. Expression of oligodendrocyte-associated genes in cell lines derived from human gliomas and neuroblastomas. *Cancer Res.* 1993; 53(1):170-5.

Kim HB, Haarer BK, Pringle JR. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *J Cell Biol.* 1991; 112(4):535-44.

Kinoshita N, Kimura K, Matsumoto N, Watanabe M, Fukaya M, Ide C. Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes. *Genes Cells.* 2004; 9(1):1-14.

Kinoshita M. The septins. *Genome Biol.* 2003; 4(11):236.

Kremer BE, Haystead T, Macara IG. Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(10):4648-59.

Kuo YC, Shen YR, Chen HI, Lin YH, Wang YY, Chen YR, Wang CY, Kuo PL. SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins. *J Cell Sci.* 2015; 128(5):923-34.

Laage R, Langosch D. Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins. *Traffic.* 2001; 2(2):99-104.

Lajmi AR, Wallace TR, Shin JA. Short, hydrophobic, alanine-based proteins based on the basic region/leucine zipper protein motif: overcoming inclusion body formation and protein aggregation during overexpression, purification, and renaturation. *Protein Expr Purif.* 2000; 18(3):394-403.

Laursen LS, Chan CW, Ffrench-Constant C. Translation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes is regulated by integrin activation and hnRNP-K. *J Cell Biol.* 2011; 192(5):797-811.

Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol.* 2002; 317(1):41-72.

- Li X, Serwanski DR, Miralles CP, Nagata K, De Blas AL. Septin 11 is present in GABAergic synapses and plays a functional role in the cytoarchitecture of neurons and GABAergic synaptic connectivity. *J Biol Chem.* 2009; 284(25):17253-65.
- Lin AC, Holt CE. Function and regulation of local axonal translation. *Curr Opin Neurobiol.* 2008; 18(1):60-8.
- Lopez-Verrilli MA, Picou F, Court FA. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia.* 2013; 61(11):1795-806.
- Maccaferri G. Stratum oriens horizontal interneurone diversity and hippocampal network dynamics. *J Physiol.* 2005; 562(1):73-80.
- Martini R, Schachner M. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *J Cell Biol.* 1986; 103(1):2439-48.
- Mathis C, Collin L, Borrelli E. Oligodendrocyte ablation impairs cerebellum development. *Development.* 2003; 130(19):4709-18.
- Mavrikis M, Azou-Gros Y, Tsai FC, Alvarado J, Bertin A, Iv F, Kress A, Brasselet S, Koenderink GH, Lecuit T. Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles. *Nat Cell Biol.* 2014; 16(4):322-34.
- Meier S, Bräuer AU, Heimrich B, Nitsch R, Savaskan NE. Myelination in the hippocampus during development and following lesion. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(9):1082-94.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci.* 2006; 26(30):7907-18.
- Minis A, Dahary D, Manor O, Leshkowitz D, Pilpel Y, Yaron A. Subcellular transcriptomics-dissection of the mRNA composition in the axonal compartment of sensory neurons. *Dev Neurobiol.* 2014; 74(3):365-81.
- Mirsky R, Jessen KR. The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol.* 1999; 9(2):293-311.
- Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005; 169(3):527-38.
- Mostowy S, Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(3):183-94.
- Müller C, Bauer NM, Schäfer I, White R. Making myelin basic protein -from mRNA transport to localized translation. *Front Cell Neurosci.* 2013; 27;7:169.
- Nave KA, Werner HB. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014; 30:503-33.
- Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol.* 2014; 32:367-402.

- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2009; Jan;10(1):9-22.
- Ogawa Y, Rasband MN. Proteomic analysis of optic nerve lipid rafts reveals new paranodal proteins. *J Neurosci Res*. 2009; 87(15):3502-10.
- Pache M, Zieger B, Bläser S, Meyer P. Immunoreactivity of the septins SEPT4, SEPT5, and SEPT8 in the human eye. *J Histochem Cytochem*. 2005; 53(9):1139-47.
- Palani D, Baginskaskas A, Raastad M. Bursts and hyperexcitability in non-myelinated axons of the rat hippocampus. *Neuroscience*. 2010; 167(4):1004-13.
- Pan F, Malmberg RL, Momany M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol*. 2007; 7:103.
- Patzig J, Jahn O, Tenzer S, Wichert SP, de Monasterio-Schrader P, Rosfa S, Kuharev J, Yan K, Bormuth I, Bremer J, Aguzzi A, Orfaniotou F, Hesse D, Schwab MH, Möbius W, Nave KA, Werner HB. Quantitative and integrative proteome analysis of peripheral nerve myelin identifies novel myelin proteins and candidate neuropathy loci. *J Neurosci*. 2011; 31(45):16369-86.
- Patzig J, Dworschak MS, Martens AK, Werner HB. Septins in the glial cells of the nervous system. *Biol Chem*. 2014; 395(2):143-9.
- Pedraza L, Huang JK, Colman DR. Organizing principles of the axoglial apparatus. *Neuron*. 2001; 30(2):335-44.
- Peles E, Salzer JL. Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol*. 2000; 10(5):558-65.
- Peng J, Kim MJ, Cheng D, Duong DM, Gygi SP, Sheng M. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J Biol Chem*. 2004; 279(20):21003-11.
- Peters A, Sethares C. Aging and the myelinated fibers in prefrontal cortex and corpus callosum of the monkey. *J Comp Neurol*. 2002; 442(3):277-91.
- Poliak S, Peles E. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(12):968-80.
- Ramnani N. The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(7):511-22.
- Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*. 2010; 468(7321):253-62.
- Rodriguez-Escudero I, Roelants FM, Thorner J, Nombela C, Molina M, Cid VJ. Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast. *Biochem J*. 2005; 390(2):613-23.
- Roth AD, Ivanova A, Colman DR. New observations on the compact myelin proteome. *Neuron Glia Biol*. 2006; 2(1):15-21.
- Roth AD, Liazoghli D, Perez De Arce F, Colman DR. Septin 7: actin cross-organization is required for axonal association of Schwann cells. *Biol Res*. 2013; 46(3):243-9.

Saarikangas J, Barral Y. The emerging functions of septins in metazoans. *EMBO Rep.* 2011; 12(11):1118-26.

Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 2003; 83(4):1359-400.

Sagné C, Isambert MF, Henry JP, Gasnier B. SDS-resistant aggregation of membrane proteins: application to the purification of the vesicular monoamine transporter. *Biochem J.* 1996; 316(3):825-31.

Salzer JL. Polarized domains of myelinated axons. *Neuron.* 2003; 40(2):297-318.

Sellin ME, Sandblad L, Stenmark S, Gullberg M. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Mol Biol Cell.* 2011; 22(17):3152-64.

Sheffield PJ, Oliver CJ, Kremer BE, Sheng S, Shao Z, Macara IG. Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *J Biol Chem.* 2003; 278(5):3483-8.

Sherman DL, Tait S, Melrose S, Johnson R, Zonta B, Court FA, Macklin WB, Meek S, Smith AJ, Cottrell DF, Brophy PJ. Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron.* 2005; 48(5):737-42.

Simons M, Snaidero N, Aggarwal S. Cell polarity in myelinating glia: from membrane flow to diffusion barriers. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1821(8):1146-53.

Sirajuddin M, Farkasovsky M, Hauer F, Kühlmann D, Macara IG, Weyand M, Stark H, Wittinghofer A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature.* 2007; 449(7160):311-5.

Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 2009; 18(5):936-48.

Somjen GG. Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia.* 1988; 1(1):2-9.

Souza TA, Barbosa JA. Cloning, overexpression, purification and preliminary characterization of human septin 8. *Protein J.* 2010; 29(5):328-35.

Spiliotis ET, Nelson WJ. Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J Cell Sci.* 2006; 119(1):4-10.

Stelzhammer V, Amess B, Martins-de-Souza D, Levin Y, Ozanne SE, Martin-Gronert MS, Urday S, Bahn S, Guest PC. Analysis of the rat hypothalamus proteome by data-independent label-free LC-MS/MS. *Proteomics.* 2012; 12(22):3386-92.

Tada T, Simonetta A, Batterton M, Kinoshita M, Edbauer D, Sheng M. Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. *Curr Biol.* 2007; 17(20):1752-8.

Takizawa PA, DeRisi JL, Wilhelm JE, Vale RD. Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science.* 2000; 290(5490):341-4.

Tanaka-Takiguchi Y, Kinoshita M, Takiguchi K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr Biol*. 2009; 19(2):140-5.

Taraslia VK, Kouskoulis A, Anagnostopoulos AK, Stravopodis DJ, Margaritis LH, Tsangaris GT. Proteomic analysis of normal murine brain parts. *Cancer Genomics Proteomics*. 2013; 10(3):125-54.

Tasaki I. The electro-saltatory transmission of the nerve impulse and the effect of narcosis upon the nerve fiber. *Am J Physiol* 1939; 127: 211-227.

Taylor CM, Marta CB, Claycomb RJ, Han DK, Rasband MN, Coetzee T, Pfeiffer SE. Proteomic mapping provides powerful insights into functional myelin biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(13):4643-8.

Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(8):581-93.

Thomson AM, Bannister AP. Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb Cortex*. 2003; 13(1):5-14.

Tomassy GS, Berger DR, Chen HH, Kasthuri N, Hayworth KJ, Vercelli A, Seung HS, Lichtman JW, Arlotta P. Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science*. 2014; 344(6181):319-24.

Trajkovic K, Dhaunchak AS, Goncalves JT, Wenzel D, Schneider A, Bunt G, Nave KA, Simons M. Neuron to glia signaling triggers myelin membrane exocytosis from endosomal storage sites. *J Cell Biol*. 2006; 172(6):937-48.

Tsang CW, Fedchyshyn M, Harrison J, Xie H, Xue J, Robinson PJ, Wang LY, Trimble WS. Superfluous role of mammalian septins 3 and 5 in neuronal development and synaptic transmission. *Mol Cell Biol*. 2008; 28(23):7012-29.

Trimble WS, Grinstein S. Barriers to the free diffusion of proteins and lipids in the plasma membrane. *J Cell Biol*. 2015; 208(3):259-71.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9(6):654-9.

Velumian AA, Samoilova M, Fehlings MG. Visualization of cytoplasmic diffusion within living myelin sheaths of CNS white matter axons using microinjection of the fluorescent dye Lucifer Yellow. *Neuroimage*. 2011; 56(1):27-34.

Virchow, R. *Gesammelte A bhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin*. Hamm, Frankfurt. 1856. 1024 pp.

Versele M, Thorner J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol*. 2005; 15(8):414-24.

Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. 2005; 6(8):626-40.

Voogd J, Glickstein M. The anatomy of the cerebellum. *Trends Cogn Sci*. 1998; 2(9):307-13.

Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL. Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature*. 1993; 365(6441):75-9.

Weirich CS, Erzberger JP, Barral Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(6):478-89.

Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Möbius W, Guarente L, Casaccia-Bonnel P, Jahn O, Nave KA. Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci*. 2007; 27(29):7717-30.

White R, Gonsior C, Krämer-Albers EM, Stöhr N, Hüttelmaier S, Trotter J. Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *J Cell Biol*. 2008; 181(4):579-86.

Wyatt KD, Tanapat P, Wang SS. Speed limits in the cerebellum: constraints from myelinated and unmyelinated parallel fibers. *Eur J Neurosci*. 2005; 21(8):2285-90.

Xie Y, Vessey JP, Konecna A, Dahm R, Macchi P, Kiebler MA. The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Curr Biol*. 2007; 17(20):1746-51.

Xu R, Greening DW, Rai A, Ji H, Simpson RJ. Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. *Methods*. 2015; doi: 10.1016/j.ymeth.2015.04.008

Xue J, Tsang CW, Gai WP, Malladi CS, Trimble WS, Rostas JA, Robinson PJ. Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. *J Neurochem*. 2004; 91(3):579-90.

Ye Y, Xiong J, Hu J, Kong M, Cheng L, Chen H, Li T, Jiang L. Altered hippocampal myelinated fiber integrity in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: a histopathological and stereological investigation. *Brain Res*. 2013; 1522:76-87.

Zalc B, Goujet D, Colman D. The origin of the myelination program in vertebrates. *Curr Biol*. 2008; 18(12):R511-2.

Zhang J, Kong C, Xie H, McPherson PS, Grinstein S, Trimble WS. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr Biol*. 1999; 9(24):1458-67.