

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Papel de Zic2 en la dinámica del citoesqueleto en el cono de crecimiento axonal de las Células Ganglionares de la retina (RGCs).

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: ISABEL PÉREZ FERRER

TUTOR/A: ESTHER GIRALDO REBOLOSO

TUTORES EXTERNOS: CARLOS SÁNCHEZ HUERTAS, ELOÍSA HERRERA GONZÁLEZ
DE MOLINA.

Curso Académico: 2020/2021

VALENCIA, 03/06/2021

Introducción.

El sistema visual y la organización de la retina.

El sistema visual transmite información del exterior a los centros cognitivos del cerebro. Para que esta información sensorial pueda ser transmitida hasta la corteza visual y otras estructuras cerebrales, deben darse una serie de eventos de búsqueda de la ruta óptima por parte de los axones de las neuronas de la retina encargadas de transmitir la información. Estas neuronas se denominan células ganglionares de la retina (RGCs por sus siglas en inglés) y son el único tipo neuronal de la retina que proyecta sus axones fuera del ojo, con el fin de encontrar y conectar con sus dianas sinápticas finales en el cerebro.

El ojo es un órgano compuesto, entre otras estructuras, por la córnea, la lente y la retina. La córnea es la estructura responsable de enfocar la imagen en la retina. La lente detrás de la córnea invierte la imagen de arriba abajo y de derecha a izquierda. La retina, que es la superficie receptiva de la parte posterior del ojo, traduce la luz en señales nerviosas permitiendo distinguir colores y formas con una gran precisión (Erskine & Herrera, 2014). La retina está formada por tres capas de células y dos capas formadas por las conexiones que se dan entre estas células. De dentro hacia fuera, estas son: la capa de células ganglionares retinales que contiene los núcleos de RGCs y células amacrinas desplazadas; la capa plexiforme interna (IPL); la capa nuclear interna (INL), que contiene los núcleos y cuerpos celulares de las células bipolares, horizontales y amacrinas, así como las células gliales de Müller; la capa plexiforme externa (OPL) donde están ubicadas las proyecciones de los bastones y los conos; y la capa nuclear externa (ONL) que contiene los cuerpos celulares de los bastones y los conos que son los detectores de luz. La información visual se transmite desde los conos y los bastones a las RGCs a través de las células amacrinas, bipolares y horizontales (Murcia-Belmonte & Erskine, 2019).

RGCs: diferenciación y formación del sistema visual.

Las RGCs son las únicas neuronas de la retina cuyos axones proyectan fuera del ojo. Estos axones salen a través del disco óptico para formar el nervio óptico y alcanzar la línea media en la región del quiasma óptico, donde deben tomar la decisión binaria de A) cruzar la línea media y avanzar por el hemisferio contralateral o B) no cruzarla y proyectar hacia el hemisferio ipsilateral. La mayoría de los axones visuales cruzan la línea media del quiasma y crecen en la vía óptica contralateral, mientras que solo una fracción de ellos- su proporción varía en función de la especie - se mantienen en el lado ipsilateral (Herrera & Garcia-Frigola, 2008). Todas estas decisiones durante la navegación del axón están reguladas por lo que se conoce como moléculas de guía axonal. Estas proteínas o señales de guía axonal que median atracción o repulsión están altamente conservadas en la evolución, y pueden ser proteínas solubles o ancladas a membrana. Se han identificado cinco grandes familias de proteínas de guía: Netrinas, que señalan a través de los receptores *Deleted in colorectal cancer* (DCC), Neogenina y UNC-5; Slits, que se unen a sus receptores *roundabout* (Robo); Semaforinas, que activan los receptores Neuropilina y Plexina; Efrinas y Ephs y la familia de *Repulsive guidance molecules* (RGMs), que se unen a Neogenina. Además de estas cinco grandes familias de proteínas de guía inicialmente identificadas, posteriormente se han identificado moléculas de adhesión celular, factores de crecimiento y morfógenos, como los Wnts, Sonic hedgehog (Shh) o TGF- β /BMP como proteínas que también participan en los procesos de guía (Kolodkin & Tessier-Lavigne, 2011).

En ratón (*Mus musculus*) el desarrollo de la vía visual comienza después de la diferenciación de las RGCs y tiene lugar en varias fases:

- A partir del décimo día de desarrollo embrionario (E10.5), las RGCs comienzan a diferenciar y extender axones tanto dentro como fuera de la retina orientados hacia el disco óptico. La diferenciación comienza en la región dorso-central de la retina y se extiende hacia la periferia de forma concéntrica. Esta diferenciación es desencadenada por factores de crecimiento de fibroblastos FGF3 y FGF8 y la señalización Delta-Notch que determina la diferenciación de los progenitores retinales (Erskine & Herrera, 2014). Tras la salida de ciclo celular, las RGCs extienden sus axones hacia la capa de la fibra óptica localizada en la capa interna de la retina. Dentro de esta capa los axones se extienden de manera radial y dirigida hacia el centro del disco óptico. Este crecimiento hacia la capa de la fibra óptica es controlado por señales inhibitorias. Las proteínas repulsivas de guía axonal Slit1 y Slit2 se expresan en la capa nuclear interna de la retina, mientras que uno de sus receptores, Robo2, se expresa en la mayoría de las RGCs. En ratones que carecen de Slit1; Slit2 o Robo2, un subconjunto de axones RGC, que se originan predominantemente en la retina ventral, crecen de manera aberrante hacia la retina externa. Una vez los axones han alcanzado el disco óptico, deben salir de ojo. En este proceso es clave la netrina-1, que es expresada por las células gliales del disco óptico. En ratones mutantes que no poseen netrina-1 o el receptor de netrina DCC, los axones no salen del ojo lo que da lugar a una hipoplasia del nervio óptico. Una vez salen del ojo la señalización mediante la proteína *Sonic hedgehog* promueve la velocidad y la dirección de crecimiento de los axones RGC a medida que se extienden a través del nervio óptico (Herrera et al., 2019).
- Entre E13 y E17, los axones de las RGCs navegan por la región del quiasma óptico. Los axones visuales que proceden de la región ventro-temporal de la retina alcanzan la línea media, pero se alejan para proyectarse hacia el tracto óptico ipsilateral. Por el contrario, los axones que se originan en otras regiones de la retina cruzan la línea media del quiasma. Los mecanismos moleculares de guía axonal que tienen lugar en el quiasma óptico en este estadio serán explicados con más detalle más adelante.
- En etapas posnatales, los axones de las RGCs se dirigen a los diferentes núcleos visuales. Al nacer, la mayoría de los axones han alcanzado los diferentes núcleos visuales, incluidos el colículo superior (SC) y el núcleo geniculado lateral (LGN) en el tálamo. Una vez han alcanzado la región correcta, los axones arborizan extensivamente y establecen conexiones con otras neuronas en el tejido diana siguiendo un mapa topográfico: los axones que proceden de la retina temporal van a las áreas rostrales, los axones de la retina dorsal van a las áreas laterales y los axones ventrales al colículo medial. Los axones que se originan en la retina nasal terminan en el SC caudal, los axones temporales se proyectan hacia el colículo rostral, los axones dorsales se asignan al SC lateral y los axones ventrales terminan en el SC (Herrera et al., 2019). Finalmente, en la segunda semana posnatal y después de un proceso de refinamiento las arborizaciones de los terminales visuales establecen las sinapsis definitivas con las neuronas diana.

Navegación de los axones visuales en el quiasma óptico y función de Zic2 en la determinación de la lateralidad axonal.

La información de los campos visuales procedentes de ambas retinas es integrada por los centros de procesamiento del cerebro para producir una representación tridimensional coherente. La principal función del quiasma óptico es organizar las proyecciones axonales de las RGCs procedentes de las dos retinas para que produzcan las conexiones sinápticas adecuadas en los núcleos visuales (Herrera & Garcia-Frigola, 2008). Es en el quiasma óptico donde los axones de las RGCs toman la decisión de cruzar la línea media del quiasma óptico y proyectar contralateralmente o no cruzarla y proyectar en el mismo hemisferio cerebral.

Los factores de transcripción de la familia Zic son importantes reguladores del desarrollo temprano participando en el proceso de gastrulación y cierre del tubo neural, pero, además, Zic2 está involucrado en procesos más tardíos del desarrollo tales como migración y guía axonal (Herrera, 2018). Zic2 se expresa en las RGCs que proyectan sus axones ipsilateralmente, y es necesario para que estos axones no crucen la línea media en el quiasma óptico. La expresión ectópica de Zic2 en RGCs contralaterales es suficiente para forzar un cambio en la lateralidad de los axones visuales. A E14, las RGCs ventrotemporales comienzan a diferenciarse y a extender sus axones. Entre E15 y E16, las células gliales presentes en la línea media del quiasma expresan, entre otras moléculas de guía, la proteína efrina-B2. En las RGCs que proyectan ipsilateralmente Zic2 induce la expresión del receptor EphB1 (Garcia-Frigola et al., 2007) que es uno de los receptores de efrina-B2. La unión entre EphB1/efrina-B2 provoca una respuesta axonal repulsiva y como consecuencia, estos axones, giran en la línea media y proyectan ipsilateralmente (Williams et al., 2004). Los axones de las RGCs contralaterales, que no expresan Zic2, no expresan EphB1 e ignoran la señal repulsiva de la efrina-B2 (Figura 1). Los axones contralaterales expresan además Neuropilin1 que es uno de los receptores del factor de crecimiento vascular A (VEGF-A), expresado también en la línea media. La unión de Nrp1 a su ligando promueve el cruce de la línea media (Herrera et al., 2019).

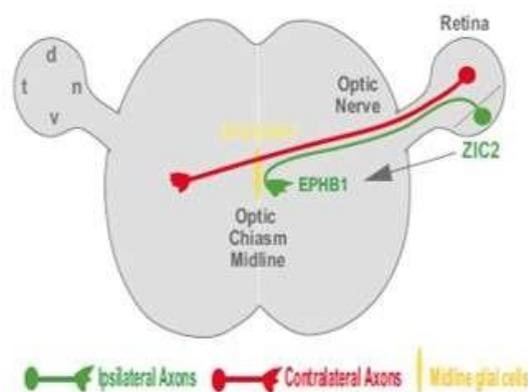


Figura 1. Función de Zic2 en sistema visual. Las RGCs ubicadas en la media luna ventrotemporal periférica de la retina expresan niveles altos de Zic2. Zic2 induce la expresión de EPHB1 en la membrana plasmática del cono de crecimiento. Este se unirá a su ligando EPHRINB2, que se expresa en las células gliales de la línea media del quiasma óptico. La señalización EPHB1/EPHRINB2 media una respuesta repulsiva que obliga a los axones ipsilaterales a repolarizarse y continuar hacia el mismo hemisferio. Imagen modificada de (Herrera, 2018).

Recientemente se ha descrito un papel esencial de la vía de señalización de Wnt en el establecimiento de la lateralidad axonal (Morenilla-Palao et al., 2020). La vía de Wnt se puede dividir en dos ramas alternativas: la vía canónica y la no canónica. En ausencia de Wnt, la β -catenina citosólica que se encuentra libre es fosforilada y degradada por un complejo formado por la kinasa GSK3 β , Axin, Apc (Apc2 en el sistema nervioso). Cuando Wnt se une a sus receptores (Frizzled y Lrp5/6) inactiva el complejo de destrucción de la β -catenina, produciendo su acumulación. Cuando se activa la vía canónica la β -catenina se transloca al núcleo de la célula para iniciar la transcripción de ciertos genes mayormente asociados con los procesos de división celular. La β -catenina, además de regular la transcripción génica en el núcleo, es una molécula de transducción intracelular que une la proteína de adhesión a membrana E-cadherina al citoesqueleto de actina. Wnt5a se expresa en la línea media del quiasma óptico y promueve el cruce de los axones RGC contralaterales por medio de la acumulación de β -catenina, que en estas neuronas no activa la vía canónica. Sin embargo, en las RGCs ipsilaterales, el factor de transcripción Zic2 modifica la respuesta a Wnt5a regulando la expresión de varios componentes de esta vía no canónica de Wnt y transformando la respuesta atractiva de los axones RGC en repulsiva.

Según el modelo propuesto, Zic2 promueve la activación de los receptores EphB1 en los axones RGC ipsilaterales cuando llegan a la línea media, lo que produce la fosforilación de β -catenina en un residuo distinto (Y654) al que se fosforila en la vía canónica para enviarla a núcleo. Esta fosforilación de la β -catenina en el residuo Y654 impide la adhesión de la E-cadherina al citoesqueleto de actina, produciendo la desestabilización de los filamentos de actina y promoviendo la respuesta repulsiva del axón (Morenilla-Palao et al., 2020).

El cono de crecimiento axonal: morfología, citoesqueleto y dinámica.

Durante el desarrollo de los circuitos neurales, los axones deben recorrer grandes distancias en su camino hacia sus dianas sinápticas finales. La precisión de las conexiones axonales depende de complejas vías de señalización que controlan la adhesión y los movimientos del axón. La señalización de las moléculas de guía axonal ocurre en un pequeño engrosamiento en la punta del axón, conocido como cono de crecimiento (CC). El CC es extremadamente dinámico. La principal característica morfológica de un cono de crecimiento es una periferia dinámica compuesta por lamelipodios en forma de lámina y filopodios estrechos. Estas estructuras son sensibles a las señales de guía externas a través de su unión a receptores específicos situados en la superficie del CC. Las señales de guía axonal activan vías de transducción intracelulares que convergen principalmente en la remodelación de la arquitectura del citoesqueleto del CC con el fin de orquestar los movimientos de dirección. Las redes de citoesqueleto responsables de la movilidad del cono de crecimiento y el axón están formadas por los filamentos de actina (F-actina) y por los microtúbulos (MTs). Los F-actina son la base molecular de los filopodios y lamelipodios que se encuentran en la periferia del cono de crecimiento, llamada dominio-P. En cambio, los MTs en el cono se encuentran densamente agrupados en el dominio central del CC, llamado dominio-C. Entre ambos dominios del CC encontramos una zona de transición o zona-T (Figura 2) (Coles & Bradke, 2015; Dent et al., 2011; Geraldo & Gordon-Weeks, 2009).

El movimiento orientado de los axones ocurre en tres etapas: protrusión, congestión y consolidación. La protuberancia es la extensión de una nueva membrana en la periferia del cono de crecimiento y es impulsada principalmente por la polimerización de F-actina. La congestión es el resultado del transporte de vesículas y orgánulos de la membrana impulsados por los microtúbulos (MT) hacia las regiones de la periferia dominadas por la actina. Por último, la consolidación resulta de la estabilización y contracción del cono de crecimiento en un eje del

axón cilíndrico, que se ve acompañado por el transporte bidireccional de orgánulos y vesículas dependiente de microtúbulos. Además de estas etapas, los axones también sufren ciclos de pausa y retracción resultado de la remodelación del citoesqueleto desencadenada por señales de guía recibidas en el cono de crecimiento.

Dinámica del citoesqueleto de F-actina en el cono de crecimiento.

Las redes de F-actina están formadas por filamentos helicoidales de doble hebra de 8 nm de grosor, compuestos de monómeros de actina globular (G-actina). Son polímeros con dos extremos: un extremo más (+), donde se produce la adición de monómeros de actina y un extremo menos (-), donde se produce la disociación de esos monómeros de actina (Blanquie & Bradke, 2018). El control de la nucleación, elongación, despolimerización, agrupamiento y contracción de la F-actina que da forma al cono de crecimiento y permite respuestas dinámicas a las señales de guía extracelulares, está mediada por proteínas accesorias de actina. Un ejemplo son las proteínas nucleadoras de actina que facilitan la formación de un núcleo de actina. Existen cuatro clases de proteínas nucleadoras de actina: el complejo Arp2/3, proteínas de la familia de las forminas como DAAM, la proteína Spire y la proteína cordon-bleu. El complejo Arp2/3 nuclea nuevos filamentos de los lados de los filamentos existentes, dando lugar a redes de filamentos de actina ramificados que luego pueden agruparse para dar lugar a los haces de F-actina que componen los filopodios y lamelipodios (Korobova & Svitkina, 2008) Otro ejemplo de proteínas importantes en el ensamblaje de actina es la proteína motora dependiente de F-actina, miosina-II. La miosina-II ejerce fuerzas contráctiles sobre fibras de actina antiparalelas, causando la contracción de la red de actina hasta el punto de romper los filamentos en trozos más pequeños. Esto produce una rápida despolimerización de F-actina en la zona de transición (zona-T) del cono de crecimiento. Esta zona de transición delimita el límite existente entre la periferia que es rica en F-actina y la región central del cono que es rica en microtúbulos (MT) (Medeiros et al., 2006). En la zona-T del CC también se concentra la proteína ADF/cofilina encargada de cortar y depolimerizar los filamentos de actina. La acción de ADF/cofilina aumenta la renovación de los filamentos de actina, ya que aumenta la cantidad disponible de actina monomérica (G-actina) y extremos de F-actina libres (Fass et al., 2004).

Las redes de F-actina se concentran en la periferia del cono de crecimiento, dando lugar a los filopodios (haces de F-actina) y lamelipodios (mallas de F-actina). Existe poca F-actina en el dominio central del CC y en el eje del axón. En el caso de los filopodios los monómeros de G-actina se agregan a los filamentos de la punta del filopodio gracias a la acción que ejercen proteínas de unión a actina, como la profilina o la distrofina. Las fibras de actina en la corteza submembranosa del CC experimentan un flujo retrógrado sostenido (FR), producto de la polimerización continua de F-actina en su extremo +, junto con las fuerzas de tracción retrógradas dependientes de miosina-II y la actividad despolimerizadora de ADF/Cofilina en la zona de transición del cono. El balance entre la velocidad de polimerización de F-actina y el flujo retrógrado determina si el cono extiende o retrae sus protuberancias. Si la velocidad de polimerización supera al flujo retrógrado entonces el cono de crecimiento se expande (Dent et al., 2011). Además, las proteínas motoras utilizan la F-actina agrupada para transportar cargas tanto en sentido anterógrado como retrógrado.

Para generar fuerzas de tracción que impulsen el crecimiento de los axones, el citoesqueleto del CC interacciona con sitios de adhesión o puntos de contacto a la matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés). Las proteínas de la ECM activan receptores transmembrana, reclutando complejos de proteínas a los puntos de contacto que interactúan con las redes del citoesqueleto. Los movimientos de protrusión del CC resultan de la polimerización de la F-actina en el borde delantero y de la reducción del flujo retrógrado de la F-actina, como consecuencia del anclaje de la F-actina a los complejos de los puntos de contacto en los sitios de adhesión. Tras la protrusión

de la periferia del cono, los microtúbulos pioneros exploran los sitios de adhesión dentro de los filopodios y lamelipodios siendo capturados y estabilizados. Este mecanismo de crecimiento y giro del CC dependiente de adhesión al sustrato se conoce como modelo de *clutch* (Gomez & Letourneau, 2014; Kerstein et al., 2015). En el caso del eje del axón, las acumulaciones focales de F-actina se denominan placas o parches de actina, y son dominios muy dinámicos que preceden a la formación de filopodios. Se ha demostrado que las proteínas Arp2/3, Cortactina o Debrina fomentan la extensión de filopodios axonales a partir de estos parches de actina (Armijo-Weingart & Gallo, 2017).

Dinámica de los microtúbulos en el cono de crecimiento.

Los microtúbulos (MTs) son estructuras cilíndricas de 25 nm de espesor compuestos por 13 protofilamentos, que surgen de la polimerización longitudinal de heterodímeros de α - y β -tubulina. Los microtúbulos al igual que los filamentos de actina están polarizados: presentan un extremo negativo (-) estable o que polimeriza lentamente, y un extremo positivo (+) dinámico que experimenta transiciones bruscas entre eventos de polimerización y despolimerización. Esta alternancia en el extremo + de los MTs es denominada “inestabilidad dinámica”. En el axón los MTs están densamente fasciculados y estabilizados por la acción de diversas proteínas de unión a MTs (MAPs por sus siglas en inglés). Todos los MTs axonales tienen una polaridad homogénea, con sus extremos – orientados hacia cuerpo celular y sus extremos + orientados hacia la punta del axón (Blanquie & Bradke, 2018). Aunque en menor proporción los MT también se extienden en el CC. En contraste con los del axón, los MTs del CC son dinámicos y se encuentran distribuidos dispersamente en el dominio-P. Los MTs de la periferia del CC tienden a defascicularse, doblarse y girar por medio de la interacción con las fibras de actina. Esta interacción entre MTs y F-actina en el CC se produce a través de proteínas de asociación a los microtúbulos, también conocidas como MAPs que son las que conectan ambas redes del citoesqueleto. Algunos ejemplos de estas MAPs serían la proteína tau o las proteínas de interacción con el extremo + de los MTs llamadas +TIPs por sus siglas en inglés. Se ha demostrado que varias +TIPs pueden acoplar microtúbulos a la dinámica de la F-actina, apoyando tanto el avance como la retracción de los microtúbulos en la periferia del cono de crecimiento. Además, hay evidencia tanto *in vitro* como *in vivo* de que las +TIP podrían participar como nucleadoras de la F-actina influyendo de forma directa en su organización y dinámica (Cammarata et al., 2016). Por tanto, las dinámicas de filopodios y lamelipodios subyacen a la motilidad del cono de crecimiento que se logran mediante los comportamientos coordinados de los MTs y el citoesqueleto de actina.

Se sabe que el giro repulsivo del CC surge por la pérdida de las superestructuras de la F-actina y la contracción de la actinmiosina, mientras que el giro atractivo implica la incorporación de actina en el lado del cono de crecimiento donde se está dando la señal quimioatrayente. En el caso de los MTs, se ha demostrado que la invasión de los MT en la región periférica de un lado del cono de crecimiento es imprescindible para que el CC gire en esa dirección. La dinámica de los microtúbulos también se ve afectada por el flujo retrógrado de la F-actina basado en la miosina-II. Este flujo empuja a la mayoría de los MTs fuera del dominio-P y hace que se localicen en el dominio-C del CC. De manera que la relajación, de las fuerzas retrogradadas de la F-actina también facilita la entrada de MTs en la región periférica del CC y el consiguiente movimiento de giro (Burnette et al., 2008; Kahn & Baas, 2016).

Coordinación entre MTs y F-actina en el cono de crecimiento.

Una de las +TIP encargadas de la coordinación de MTs y actina en el CC en respuesta a señales

de guía axonal es la proteína APC. APC estabiliza los extremos + de los MTs y se distribuye asimétricamente en el CC. La acumulación local de APC en un lado del CC anticipa el giro del axón en esta dirección axial. La estimulación focalizada del CC con el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) produce la inactivación asimétrica de GSK3, lo que permite la estabilización del extremo + MT mediada por APC y el giro del cono. Además, se ha demostrado que el tratamiento del CC con Wnt3a desplaza a la APC de los extremos + del cono y altera la direccionalidad de crecimiento de los MTs (Koester et al., 2007; Purro et al., 2008; Zhou & Cohan, 2004). APC tiene una proteína homóloga específica del cerebro, denominada APC2, que también se comporta como una proteína de unión a MT y se encuentra en los CC de los axones retinales. APC2 participa en la guía de los axones retinotectales regulando la estabilidad de los MT. Se ha descrito que los axones de las RGCs delecionados para Apc2 tienen una respuesta atenuada a la efrina-A2 (Kahnet al., 2018; Shintani et al., 2009) y más recientemente APC2 también se ha identificado como mediador de la respuesta del CC a Wnt5a en los axones RGC durante el cruce de la línea media en el quiasma óptico (Morenilla-Palao et al., 2020).

Como se ha descrito más arriba, el factor de transcripción Zic2 regula intrínsecamente la decisión de guía axonal binaria de los axones visuales en la línea media del quiasma. Lo hace cambiando la respuesta axonal a Wnt5a de atracción a repulsión. Para ello reduce los niveles APC2 en los CC e incrementa los niveles de β -catenina además de inducir la expresión del receptor de efrina-B2, EphB1 (Morenilla-Palao et al., 2020). Este mecanismo además de regular la respuesta axonal a las moléculas de guía axonal del quiasma óptico podría influir de manera intrínseca en la dinámica de los citoesqueletos de actina y MTs en el cono de crecimiento de estas neuronas.

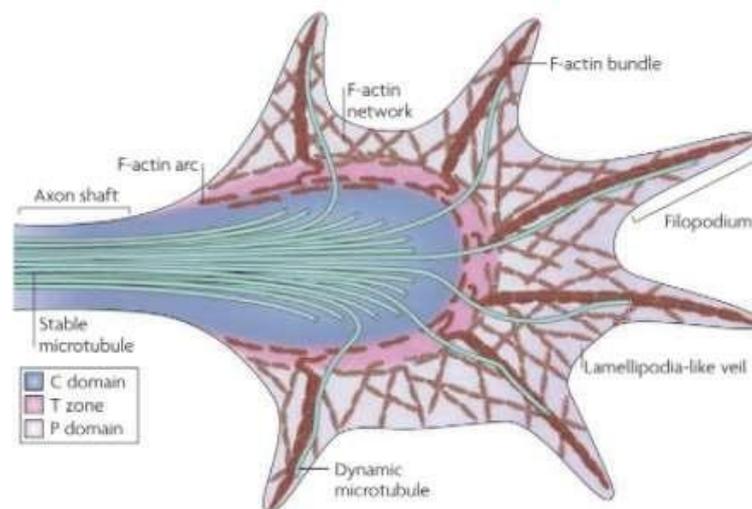


Figura 2. Estructura del cono de crecimiento. El dominio periférico (P) contiene filamentos largos de actina agrupados (haces de F-actina), que forman los filopodios, así como redes de F-actina ramificadas en forma de malla, que dan estructura a los lamelipodios. Además, los microtúbulos (MT) dinámicos individuales "pioneros" exploran esta región a lo largo de los haces de F-actina. El dominio central (C) encierra MT agrupados estables que entran en el cono de crecimiento desde el eje del axón, además de numerosos orgánulos, vesículas y haces centrales de actina. Finalmente, la zona de transición (T) se encuentra en la interfaz entre los dominios P y C, donde las estructuras contráctiles de actomiosina que se encuentran perpendiculares a los haces de actina F y forman un anillo hemicircunferencial (Lowery & Van Vactor, 2009).

Antecedentes y objetivos.

La presencia de Zic2 en RGC ipsilaterales provoca la señalización dependiente de Efrina-B2 y

Wnt5a en el quiasma óptico y conduce a la activación de EphB1 y fosforilación de β -catenina en los axones RGC. En particular, la fosforilación de β -catenina impide la formación de complejos cadherina/F-actina y provoca una desestabilización local de la F-actina que desencadena una respuesta repulsiva.

El presente trabajo de fin de máster tiene como objetivos:

- Analizar si Zic2 posee un papel, independiente de la señalización exógena por Ephrin o Wnt, en la morfología y dinámica de los conos de crecimiento.
- Determinar si Zic2 interfiere con el remodelamiento del citoesqueleto de actina en la periferia del cono de crecimiento.

Materiales y métodos.

Animales.

Ratones B6D2F1 (DBA1-C57BL/6) fueron empleados para hacer las electroporaciones y los explantes de retina. Todos los animales proceden de una colonia reproductora existente en el animalario del Instituto de Neurociencias (IN). Todos los procedimientos con animales empleados fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado Animal de IN y cumplen la legislación europea (2013/63/UE) y española (RD 53/2013).

Electroporación *in útero* en embriones de ratón.

Ratonas hembras adultas preñadas en día 13 de gestación (E13.5) fueron anestesiadas con isoflurano (WPI, EE. UU.). La electroporación en el útero se realizó como se describe en (García-Frigola et al., 2007). Los plásmidos se inyectaron a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se empleó 1 ratona gestante para cada combinación plasmídica. Se emplearon los siguientes plásmidos: pCAG-GFP y pCAG-RFP, como reporteros de electroporación; pCAG-lifeAct-turquoise, como reportero de F-actina; pCAG-Zic2 para expresar ectópicamente Zic2. Se realizaron las siguientes combinaciones de electroporación: Control: pCAG-GFP, pCAG-RFP o pCAG-lifeAct-turquoise. Zic2: pCAG-Zic2 + pCAG-GFP, pCAG-RFP o pCAG-lifeAct-turquoise. Todas las electroporaciones fueron realizadas por la técnico asistente Yaiza Coca (Figura 3A).

Extracción de retinas.

Se sacrificaron las ratonas hembras gestantes electroporadas en E14.5 mediante dislocación cervical. Se sacaron los embriones de la ratona y de sus sacos vitelinos, se sacrificaron mediante decapitación y se guardaron sus cabezas en PBS frío. Se fijaron las cabezas en una placa Petri rellena de Sylgard que cubierta con PBS frío. Utilizando pinzas de disección se retiró el tejido que rodea el ojo y con una aguja de jeringa, se hizo un pequeño orificio en el centro de la lente. Se separó cuidadosamente el epitelio pigmentado de la retina y se extrajo la retina cortando el nervio óptico. Se recogieron las retinas individualmente en PBS frío y se comprobó su nivel de electroporación en una lupa con fluorescencia. Solo las retinas con un nivel detectable de fluorescencia verde o roja, según el plásmido reportero electroporado, fueron empleadas en los cultivos de explantes (Figura 3B).

Cultivo de explantes de retina.

Para la realización de los cultivos de explantes de retina se siguió el siguiente procedimiento (Morenilla-Palao et al., 2020; Murcia-Belmonte et al., 2019).

1. Transferir una retina a la tapa de la placa de Petri pequeña que contenga medio DMEN / F12 fresco.
2. Cortar la retina con dos cuchillos de disección afilados retirando en el proceso el disco

óptico. **3.** Hacer 3 pequeñas hendiduras en la retina central para aplanar la retina y luego girar la retina colocando el lado del pigmento hacia arriba, es decir poner la retina dorsal. **4.** Cortar la retina en pequeños trozos cuadrados tratando de hacer los cortes lo más limpios posible. **5.** Transferir los fragmentos de retina a las placas. Usar una punta amarilla cortada para transferir las piezas. **6.** Hundir, aplanar y pegar las piezas en el cristal de las placas de cultivo, conteniendo el medio de cultivo.

Los explantes de retina electroporada se cultivaron sobre cubreobjetos de cristal, previamente desengrasados, en placas de 4 pocillos (Thermo Scientific) o en placas de 35mm con fondo de vidrio de 14 mm (MatTek) para la realización de microscopía de fluorescencia en tiempo real (*time-lapse*). Ambos tipos de substrato fueron pretratados a 37°C con poly-L-lisina (0,01%) durante 24 h y con laminina (20 µg/ml) durante 1 h. El medio de cultivo empleado fue DMEM:F12 (Gibco) con 0,4% de metilcelulosa (Sigma) suplementado con B-27, albúmina de suero bovino (BSA, Roche) y Penicilina/Estreptomocina (Sigma). La metilcelulosa fue incubada en agitación a 4°C con el medio de cultivo para su completa disolución. El medio completo fue esterilizado mediante un filtro de vacío antes de realizar el cultivo. Los explantes fueron incubados en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas (Figura 3C).

Inmunohistoquímica.

Los explantes de retina fueron fijados con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato solución salina (PBS) o con una disolución de PFA al 4% y sacarosa al 4% de sacarosa en tampón PHEM (120 mM Pipes, 50 mM Hepes pH 7,4, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂) (Sánchez-Huertas *et al.*, 2016) durante 10 min a T^a ambiente (TA). Tras la fijación, los explantes se incubaron durante 1 hora a TA con una solución de bloqueo con Tritón X-100 al 0,025%, suero fetal bovino (FBS) al 10% y gelatina al 0,02%. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución de bloqueo e incubados con los explantes en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche (16-18 h). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Chicken anti-GFP (Aves Labs, GFP-1020 1:1000), Rabbit anti-RFP (Rockland, 600-401-379, 1:1000), Rabbit Anti-beta III Tubulin (Abcam, ab18207, 1:1000), Goat Tubulin-4A Alpha chain (Sicgen Antibodies, AB0134-200, 1:500), Goat tdTomato Polyclonal Antibody (Sicgen antibodies, AB8181-200, 1:1000), Rabbit Anti-Zic2 (Herrera Lab, 1:1000 (Marcucci *et al.*, 2016)). Se lavaron los anticuerpos primarios con tres lavados de 10 min con PBS a TA y se incubaron los anticuerpos secundarios durante 1 hora a TA en solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios Alexa conjugados utilizados fueron: Anti-Chicken IgG 488, Anti-Rabbit IgG 546, Anti-Rabbit IgG 405, Anti-Goat (H+L) 488 (Invitrogen, 1:400). Para la tinción de los filamentos de actina (F-actina) se empleó Phalloidin-Atto conjugada con fluoróforo Alexa 633 (Sigma, BCC0816, 1:50). Por último, se lavaron los anticuerpos secundarios mediante tres lavados con PBS de 10 min a TA y los cubres conteniendo los explantes de montaron sobre portaobjetos (MicroSlides) usando Mowiol como medio de montaje.

Construcciones plasmídicas.

La construcción reportera fluorescente de F-actina Lifeact-Turquoise se subclonó en un plásmido con promotor CAG para poder visualizar la señal fluorescente en los explantes de retina electroporados. Se siguieron los siguientes pasos en el procedimiento de subclonación:

1. Comprobación del patrón de restricción del plásmido pLifeAct-mTurquoise2 (Addgene #44970) con la enzima BsaAI (NEB). Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 1% en tampón TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM a pH 8.0), mediante el sistema de electroforesis y se visualizaron en un transiluminador UV equipado con cámara digital.
2. Se utilizaron las enzimas EcoRI-HF y NotI-HF (ambas de NEB) para liberar el cassette Lifeact-Turquoise del plásmido de origen y generar extremos cohesivos compatibles en el sitio de clonaje múltiple (MCS por sus siglas en inglés) del plásmido de destino. Se

inactivaron las enzimas y se añadió la enzima fosfatasa alcalina exclusivamente a la digestión del plásmido de destino para evitar la recircularización de este. Ambos productos de digestión se cargaron en un gel de agarosa 1%, se separaron mediante electroforesis y se cortaron las bandas correspondientes al inserto digerido (804 bp) y plásmido digerido (4,78 kb). Se purificaron los fragmentos de DNA con el Kit QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (Qiagen), se cuantificaron en el espectrofotómetro Nanodrop y se calcularon los volúmenes necesarios para la ligación. Se mezclaron los fragmentos en proporción 1:6 (plásmido:inserto) con la enzima ligasa T4 y se incubó la reacción a 16°C durante la noche (16-18 h). También se incluyó un control de ligación sin DNA correspondiente al inserto.

3. Todas las ligaciones se transformaron en bacterias *E.coli* DH5 α quimiocompetentes mediante shock térmico a 42°C y se dejaron crecer las bacterias en medio LB con el antibiótico Ampicilina durante la noche en incubador a 37°C.
4. Al día siguiente se picaron colonias individuales de bacterias y se crecieron en medio LB con ampicilina durante la noche. Al día siguiente se extrajo el DNA plasmídico bacteriano mediante el protocolo de miniprep:
 - Transferir 1.5 ml del medio de crecimiento de bacterias en un tubo eppendorf, centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm y retirar el sobrenadante.
 - Añadir 100 μ l de solución I (25mM Tris HCL, pH 8; 10 mM EDTA; 50 mM glucosa). Resuspender el pellet, añadir 200 μ l de la solución II (1% w/v SDS y 0.2M NaOH) y mezclar bien.
 - Añadir 150 μ l de la solución III (3M de acetato de sodio a pH 4,8), mezclar bien y centrifugar durante 20 min a 13.000 rpm a una temperatura de 4°C.
 - Transferir el sobrenadante a un eppendorf limpio. Añadir etanol 100% pre-enfriado a -20°C y dejar la mezcla 10 minutos a -20°C.
 - Centrifugar 10 min a 13.000 rpm a 4°C, eliminar el sobrenadante, añadir 200 μ l etanol 70%, centrifugar 1 minuto a 13000 rpm a 4°C, eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
 - Resuspender el DNA con una solución TE 1x (10 mM Tris-HCL pH 8; 1 mM EDTA) con 0.1 mg/ml RNasa A.
5. Las minipreps de DNA plasmídico se sometieron a digestiones de comprobación con las enzimas EcoRI y NotI para comprobar si el vector de destino había incorporado el inserto.
6. Aquellos DNA plasmídicos que mostraron patrones de restricción compatibles con una subclonación exitosa fueron transformados en bacterias *E.coli* DH5 α quimiocompetentes. Éstas fueron crecidas en LB con ampicilina a gran escala y se llevó a cabo un protocolo de extracción de ADN plasmídico con Midiprep (NucleoBond Xtra Midi, Machery-Nagel). Una vez extraído el DNA se hicieron nuevas comprobaciones mediante restricción. Se utilizaron las enzimas EcoRI y NotI para liberar el inserto y las enzimas NcoI y AgeI (todas de NEB) para generar patrones de restricción específicos, cortando tanto en el vector como en el inserto. Con el objetivo de confirmar el éxito de la subclonación, las midipreps se enviaron a secuenciar al Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (Granada), empleando oligonucleótidos cebadores en 5' y en 3' respecto del *locus* de clonación del plásmido de destino. Las secuencias recibidas (836 bp y 792 bp) se compararon mediante alineamiento múltiple con la secuencia molde de LifeAct-mTurquoise (Addgene) usando el software Geneious Prime.

Microscopía y análisis de datos.

Para la adquisición de imágenes de microscopía de explantes fijados y vivos se empleó un microscopio invertido automatizado Thunder Imager (Leica), equipado con cámara Leica DFC9000GTC, incubador de temperatura/CO₂, y objetivos 40x/1.30 NA y 63x/1.40 NA (ambos de aceite). En los cultivos de explantes fijados y teñidos mediante inmunofluorescencia se tomaron imágenes aleatorias de todos los axones RGC y conos de crecimiento electroporados (visualizados mediante los reporteros GFP o RFP) que se encontraban aislados creciendo fuera de los explantes (Figura 3F y Figura 3E). En los cultivos de explantes de retina electroporados vivos se realizaron adquisiciones de imagen en tiempo real (*time-lapse*) de todos los conos de crecimiento RGC electroporados (visualizados mediante RFP) que se encontraban aislados creciendo fuera de los explantes. Se obtuvieron videos de 2 min con una resolución temporal de 2 seg con la mínima intensidad de LED y tiempo de exposición para evitar problemas de fototoxicidad en los conos. Tanto en explantes fijados como vivos se emplearon las mismas condiciones de fluorescencia y exposición en las electroporaciones control y Zic2. Para el análisis de imagen se utilizó el software Fiji ImageJ (NIH). En los conos fijados y teñidos mediante inmunohistoquímica se determinó el número de filopodios por cono y el área de los conos de crecimiento. Se estimaron como filopodios las estructuras de grosor uniforme con una longitud en 1 y 15 micras. El tamaño del píxel en las imágenes fue 0.203 μm. Para calcular el enriquecimiento de F-actina en el cono se trazó el área del cono y se empleó herramienta *mean gray value* (Fiji) y la siguiente fórmula: $(\text{mean gray value cono} - \text{background})/(\text{mean gray value axon} - \text{background})$. Para el análisis de los *time-lapse* de los conos se hizo una proyección z de intensidad máxima de todos los planos de cada video. Después, se contabilizaron los eventos de extensión y retracción de filopodios en cada cono y se normalizaron por la duración del video. Para el análisis estadístico de los datos se empleó el software GraphPad Prism software (v7.0). Con el promedio de los datos obtenidos de experimentos independientes en los grupos experimentales control y Zic2, se realizó un *T*-test para datos no-pareados para determinar si había diferencias significativas entre ambos grupos. Se consideró como significativo un valor de p inferior a 0.05.

Para los análisis del flujo retrógrado (RF) de la F-actina en los conos de crecimiento RGC electroporados con pCAG-Lifeact-Turquoise, se obtuvieron videos de 2 min con una resolución temporal de 2'' con la mínima intensidad de LED y tiempo de exposición para evitar problemas de fototoxicidad. A los *time-lapse* de cada cono se aplicó proyección z de intensidad máxima y se obtuvieron kymogramas de filopodios dinámicos del cono mediante el *plugin* Kymograph (A. Seitz, EMBL, Heidelberg) de Fiji. Para el cálculo de la velocidad del RF se trazaron líneas sobre las líneas del flujo y se obtuvieron las coordenadas X1, Y1; X2, Y2 del kymograma. Después, se aplicó la fórmula: $-(X2-X1)*\text{tamaño de píxel})/((Y2-Y1)*\text{intervalo de tiempo})*60s$ para calcular la velocidad. Los valores de velocidad del RF de la actina se obtuvieron promediando 2-6 líneas de RF por kymograma, y promediando los promedios de 2-4 filopodios por cono. La velocidad media final del RF se calculó promediando las velocidades medias de tres CC distintos de axones RGC.

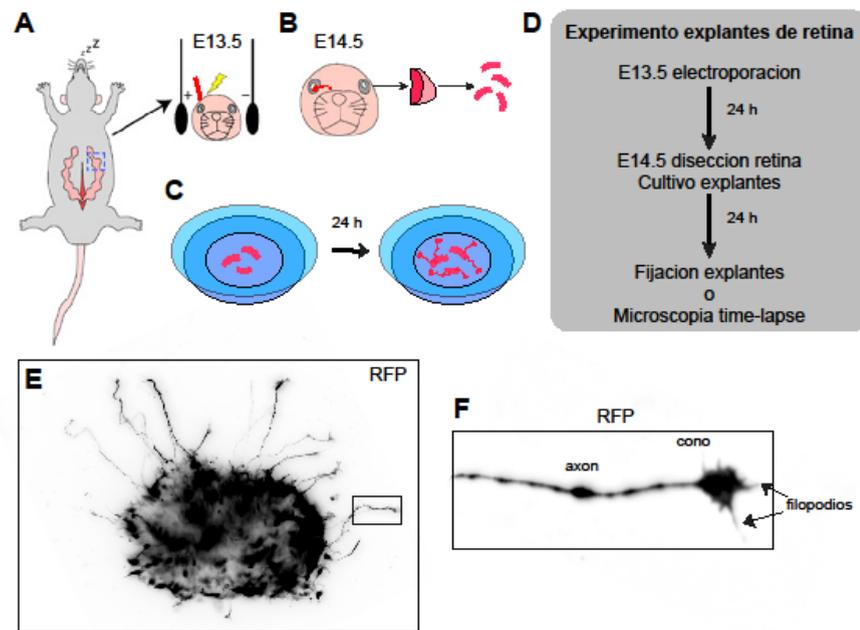


Figura 3. Electroporación in útero. A. Esquema que representa la electroporación en útero en la retina de embriones de ratón a E13.5. B. Las retinas electroporadas se extraen a E14.5. C. Las retinas electroporadas se trocean en explantes y se cultivan durante 24h. D. Esquema del experimento de cultivo de explantes de retina. E. Los explantes de retina electroporados expresan RFP (proteína fluorescente roja) tras 24 horas de cultivo. F. Axón de una RGC electroporada.

Resultados

Visualización del citoesqueleto en los conos de crecimiento de las RGCs

La motilidad del cono de crecimiento axonal (CC) está impulsada principalmente por la remodelación coordinada de las redes citoesqueléticas, incluidas las fibras de actina (F-actina) y los microtúbulos (MTs). Para analizar las consecuencias de la expresión de *Zic2* en la distribución de F-actina y MTs en los conos de crecimiento axonales de las células ganglionares de la retina (RGCs) se realizaron tinciones mediante inmunofluorescencia de los explantes electroporados. Con el objetivo de visualizar F-actina y MTs, se emplearon Phalloidin conjugada y el anticuerpo anti- β -III-tubulina (TUJ-1), respectivamente (Figura 5A, B). Para mejorar la resolución de las imágenes de microscopía, los explantes se fijaron mediante un protocolo de fijación/extracción en el que se sustrae el componente soluble del citoplasma celular (Sánchez-Huertas et al., 2016; Witte et al., 2008). Las imágenes de microscopía óptica invertida mostraron una buena resolución de la señal de F-actina y MTs aislados entrando en el dominio periférico (dominio-P) del CC (Figura 5A, B). Sin embargo, solo una pequeña proporción de los CC analizados contenían MTs aislados detectables en el dominio-P. Por este motivo decidimos enfocar el análisis en la morfología del cono, así como en la distribución y dinámica del citoesqueleto de la F-actina en las células que expresan *Zic2*.

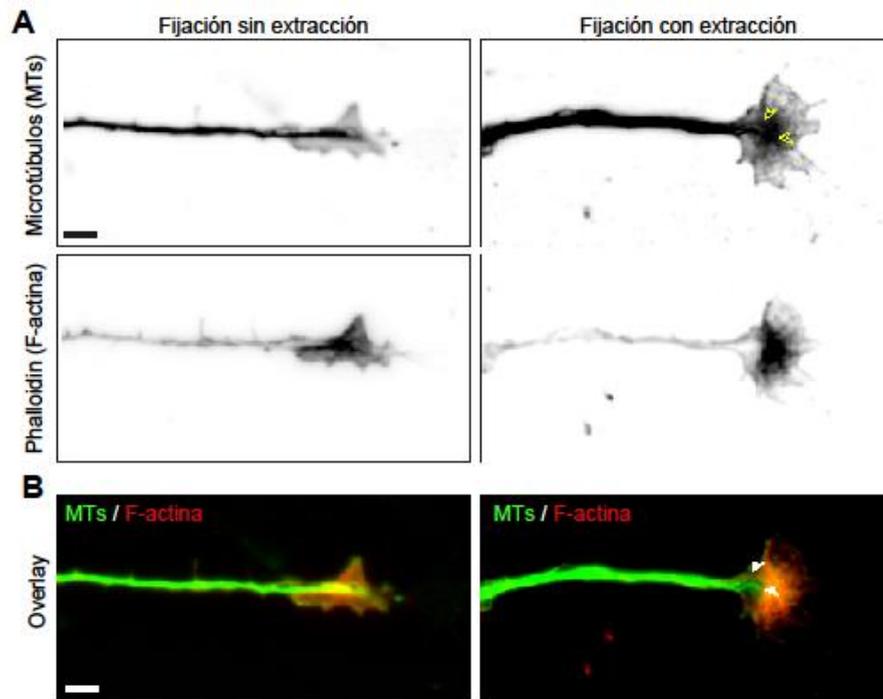


Figura 4. Inmunotinción de MT y F-actina. A. MT y F-actina sin y con protocolo de extracción. B. Overlay de la inmunotinción de F-actina (rojo) y MT (verde) en axones RGC sin protocolo de extracción y con protocolo de extracción, las puntas de flecha indican los haces de MT que entran en el cono. Barra de escala, 5 μ m.

La expresión de Zic2 aumenta la concentración de F-actina en la zona periférica del cono.

Para caracterizar la función de Zic2 en la morfología del CC se electroporaron las retinas de embriones en E13.5 con un plásmido reportero RFP o con una combinación del plásmido RFP y otro plásmido que codifica para el factor de transcripción Zic2. Un día después, se extrajeron las retinas y se cultivaron como explantes durante 24 horas. En los explantes fijados e inmunoteñidos se midió el área de los CC y el número de filopodios en cada CC de axones procedentes de retinas electroporadas con control y Zic2 (Figura 6A-C). Tras el análisis encontramos que la expresión de Zic2 no cambia significativamente el tamaño de CC ni el número de filopodios en la periferia del CC (Figura 6A-C y 6C). Por tanto, concluimos que la expresión de Zic2 no altera la morfología del cono de crecimiento de las RGCs. Además, estudiamos si la expresión de Zic2 tiene algún efecto en la organización y densidad de las redes de F-actina en el CC. Para ello nos servimos de la Phalloidin, que se une específicamente a las fibras de actina, conjugada con un marcador fluorescente. Como era esperado, los conos procedentes de axones de las RGC control mostraban un enriquecimiento de F-actina en el CC de ≈ 1.5 veces respecto del segmento del axón (Figura 6D, E). En los conos de las neuronas que expresaban Zic2 observamos un enriquecimiento de F-actina en la periferia de los conos superior de los conos control, de más de 2 veces respecto del segmento de axón (Figura 6D, E). Este incremento significativo del ratio de F-actina en los conos de crecimiento de axones de RGCs sugiere que Zic2 regula la estabilidad del citoesqueleto de actina.

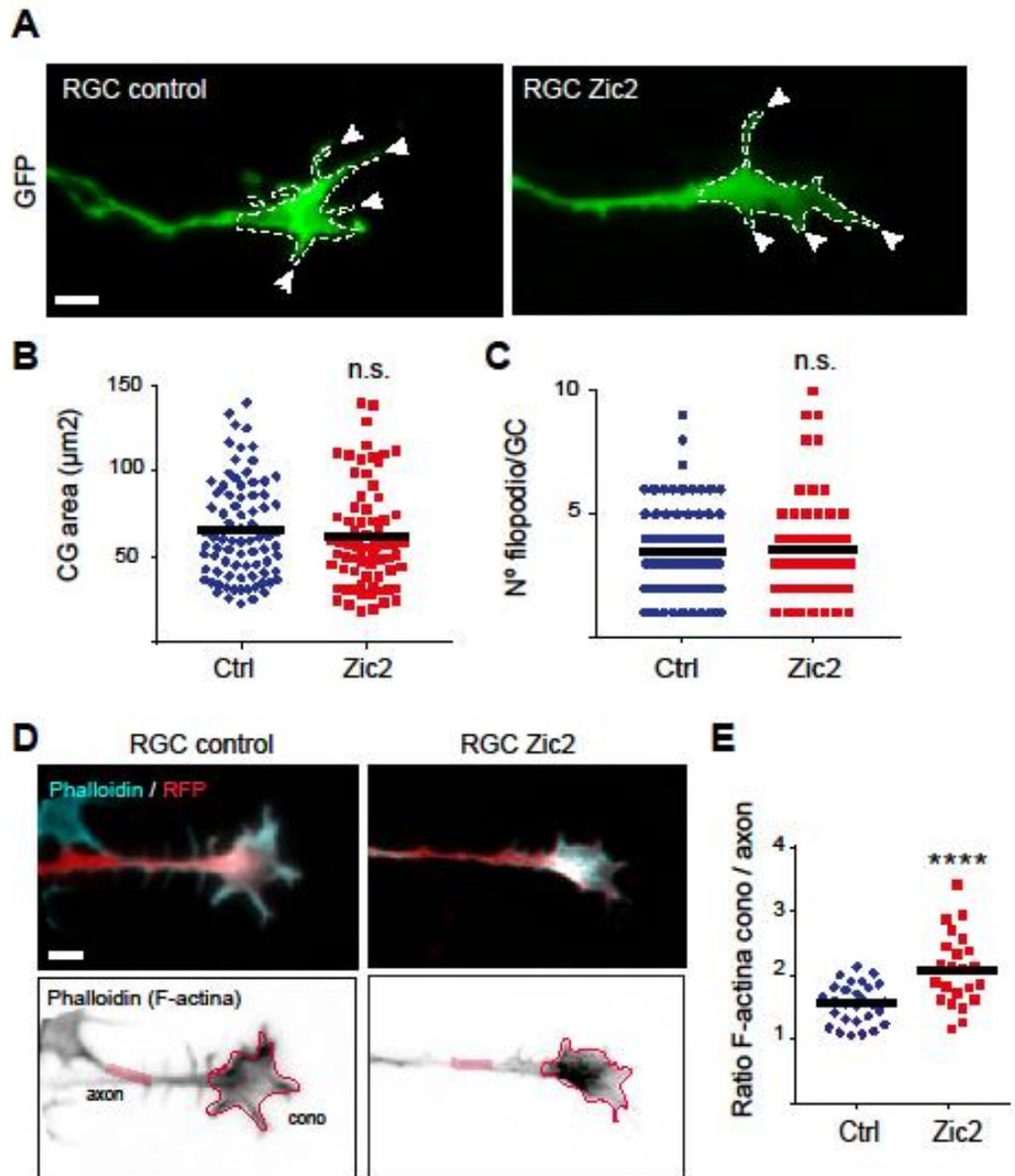


Figura 5. Zic2 no cambia la morfología del CC, pero induce un aumento en los niveles de F-actina en el GC.
 A. Conos electroporados (control y Zic2). Las líneas blancas discontinuas marcan el área del CC y las puntas de flecha el número de filopodios en CC de axones RGC control y Zic2. Barra de escala, 5 μm . B. Área de los CC control vs CC Zic2 (μm^2). C. Número de filopodios/CC de CC de axones RGC control vs CC de axones RGC Zic2. Solo los axones electroporados fueron utilizados. N= 80 (control) N=69 (Zic2) axones de 4 experimentos independientes. La dispersión por puntos muestra la media. Analizado T-test para datos no-pareados. D. F-actina en CC de axones RGC control vs CC de axones RGC Zic2. Las líneas discontinuas rojas marcan la F-actina en el cono, la barra roja señala la F-actina en el eje del axón. Barra de escala, 5 μm . E. Ratio de F-actina en CC de axones RGC vs Ratio de F-actina en CC de axones Zic2. N= 29 (control), N=23 (Zic2) axones procedentes de 4 experimentos independientes. La dispersión por puntos muestra el promedio analizado mediante T-test para datos no-pareados. Estadísticamente significativo **** $p < 0.0001$. n.s.=no significativo.

La expresión de Zic2 estimula la dinámica de filopodios en los CC.

Dado que la remodelación de F-actina juega un papel muy importante en la dinámica de los CC, se realizaron estudios de imágenes en vivo mediante microscopía *time-lapse* en los axones de RGC que expresaban Zic2 y control (Figura 7A). Para llevar a cabo este análisis se cuantificaron los eventos de extensión y retracción de filopodios por minuto y por cono, en ambas condiciones experimentales. Observamos un incremento en la frecuencia de eventos de extensión y retracción de filopodios en los conos de las neuronas que expresaban Zic2 (Figura 7A-C), siendo este aumento estadísticamente significativo solo en el caso de los eventos de retracción (Figura 7C). Nuestros resultados demuestran que Zic2 modula la remodelación de las redes de F-actina en el CC de axones de RGCs, y que los cambios inducidos por su expresión desencadenan la dinámica de los filopodios en el dominio periférico de los conos de crecimiento.

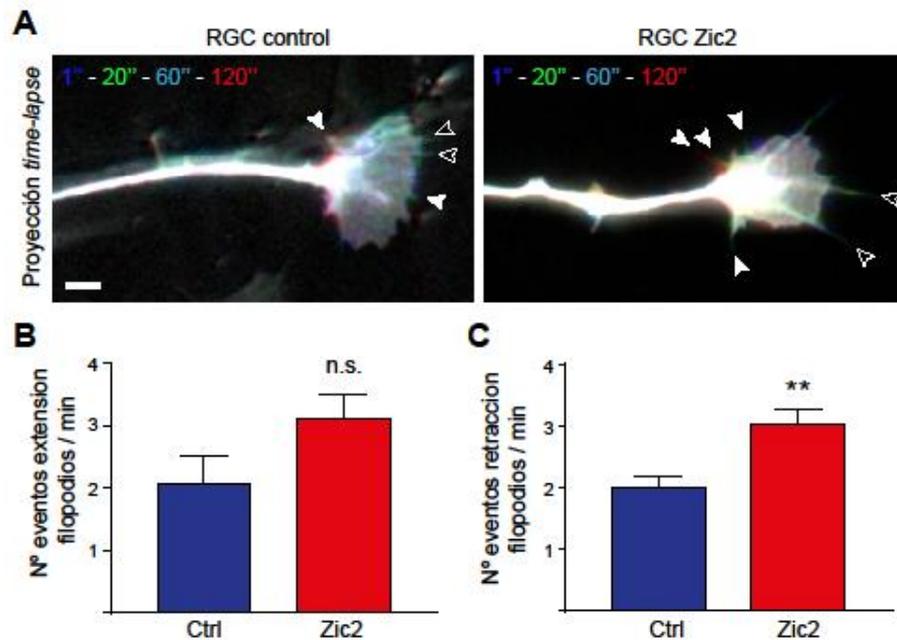


Figura 6. Zic2 aumenta la dinámica de los GC. A. La dinámica de los CC axonales (control y Zic2) se tomaron a intervalos de 2 segundos durante 2 minutos. Se muestran proyecciones de time-lapse por colores, tiempo (") segundos, barra de escala, 5 μ m. B. Eventos de extensión de filopodios por minuto y por cono. C. Eventos de retracción de filopodios por minuto y por cono. N=16 (control), N= 20 (Zic2) en CC de axones RGC de 3 experimentos independientes. Las barras del histograma muestran promedio \pm SEM. Analizado mediante T-test para datos no-pareados. **p<0.0018. Estadísticamente significativo. n.s=no significativo (p=0.0928)

Estudio del flujo retrógrado de la F-actina en los conos de axones de RGCs

Los eventos de extensión y retracción de los filopodios están frecuentemente asociados a cambios en la velocidad del flujo retrógrado (FR) de la F-actina en estas estructuras. Por ello, para poder visualizarlo y analizarlo empleamos la construcción Lifact-Turquoise en las electroporaciones. El péptido Lifact fusionado a la proteína fluorescente Turquoise se une a los filamentos de actina dentro de las células vivas y permite detectar la dinámica del citoesqueleto de actina mediante microscopía en tiempo real o *time-lapse* (Riedl et al., 2008). El plásmido de referencia pLifeAct-mTurquoise2 (Addgene #4490) expresaba el cassette bajo el control de un promotor CMV y comprobamos empíricamente que con este promotor no era posible detectar fluorescencia en los conos de los explantes de retina electroporados (datos no mostrados). Para incrementar la señal se subclonó el cassette Lifact-Turquoise en el plásmido de expresión pCAG/ES bajo el control del promotor CAG (Figura 8A), mucho más potente. Para ello seguimos

el siguiente protocolo de subclonación. El primer paso fue comprobar si el plásmido de origen del inserto se correspondía con el del repositorio de Addgene. Para ello hicimos 2 patrones de restricción; el primero de ellos cortaba el plásmido en tres zonas diferentes (tamaños: 1.1, 1.5 y 2 kilobases) mediante la enzima de restricción BsaAI; el segundo patrón fue una comprobación de liberación del inserto LifeAct-mTurquoise con un tamaño esperado de 804 pares de bases (pb) mediante las enzimas de restricción EcoRI y NotI (Figura 8B). Una vez comprobado, se llevó a cabo la digestión con las enzimas EcoRI y NotI en el plásmido de origen (pLifeact-mTurquoise) y de destino (pCAG) (Figura 8C). Mediante esta digestión se liberó el inserto del plásmido de origen, generando extremos cohesivos compatibles con los del plásmido de destino. Una vez purificados los fragmentos de DNA inserto y plásmido, se ligaron para obtener la nueva construcción pCAG-LifeAct-mTurquoise (Figura 8D). Como comprobación, se hicieron dos patrones de restricción y se secuenció el nuevo plásmido. El primer patrón de restricción fue el de liberación del inserto de 804 pb mediante las enzimas de restricción EcoRI y NotI. En el segundo patrón se hicieron cortes dentro del plásmido y del inserto mediante las enzimas NcoI y AgeI, generando fragmentos de DNA con los tamaños 1.6, 1.4 y 2.6 kilobases (Figura 8E). El patrón de restricción de comprobación y la secuenciación del nuevo plásmido generado (Figura 8E-F), confirmaron la inserción del reportero LifeAct-mTurquoise en el plásmido pCAG.

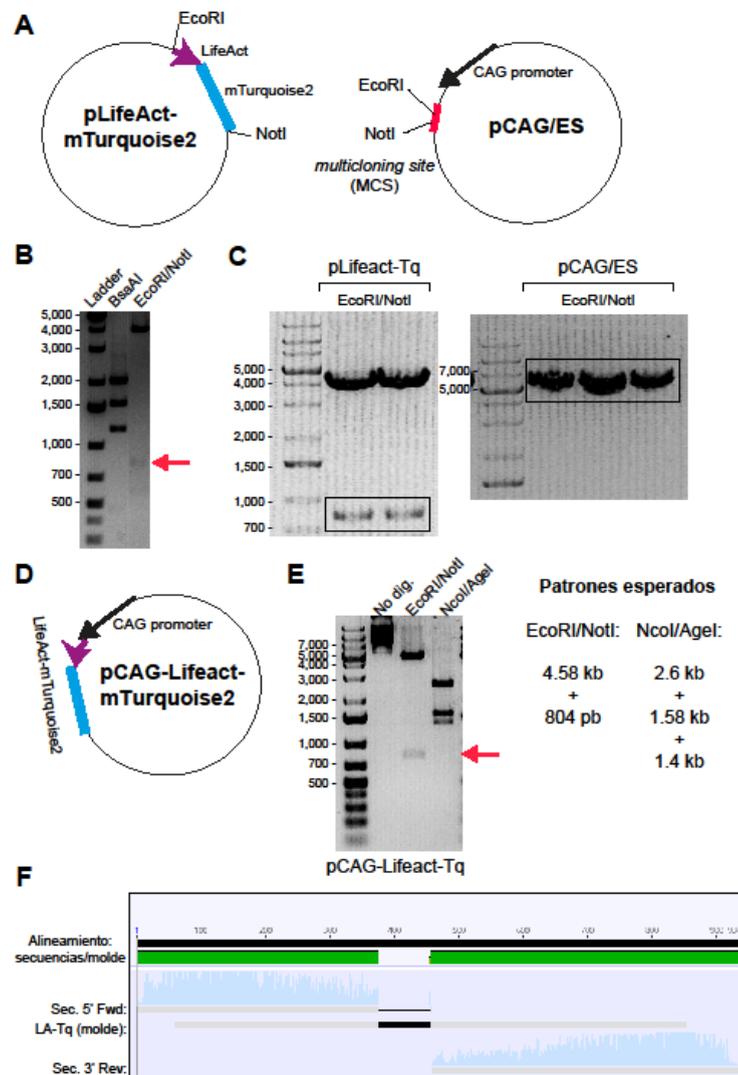


Figura 7. Generación del plásmido pCAG-LifeAct-mTurquoise. A. Plásmidos pLifeAct-mTurquoise2 (4,765 Kb y pCAG/ES (4,79 kb). B. Restricción de comprobación de pLifeAct-mTurquoise2. Se muestra el marcador de peso molecular y las bandas electroforéticas correspondientes a los tamaños de fragmentos de restricción esperados. 1,2 kb; 1,5 kb; 2 kb (enzima BsaAI) y 804 bp (marcado con una flecha roja) y 3,9 kb (enzimas EcoRI/NotI). C. Restricción de subclonación. Se muestra el marcador de peso molecular y las bandas electroforéticas correspondientes a los tamaños de fragmentos de restricción esperados (3,9 kb y 804 bp) para pLifeAct-mTurquoise2 y 4,78 kb para pCAG/ES con las enzimas EcoRI y NotI. D. Plásmido pCAG-LifeAct-mTurquoise. E. Restricción de comprobación del plásmido pCAG- LifeAct-mTurquoise. Se muestra el marcador de peso molecular y las bandas electroforéticas correspondientes a los tamaños de fragmentos de restricción esperados: 5,58 kb (plásmido sin digerir), 4,78 kb y 804 bp (EcoRI/NotI); 1, 58 kb, 1,4 kb 2,6 kb (NcoI/AgeI). F. Alineación múltiple de las secuencias en 5' (Fwd) y 3'(rev) con la secuencia LifeAct-mTurquoise. Se muestra el nivel de conservación de la secuencia en verde.

La nueva construcción pCAG-Lifeact-Turquoise fue electroporada en la retina de embriones a E13.5. Siguiendo el mismo protocolo anterior, se realizaron los explantes de retina y se obtuvieron videos de microscopía time-lapse en conos de axones de las RGC procedentes de retinas electroporadas. Como era esperable, comprobamos que la señal fluorescente de Lifeact-Tq se concentraba en los conos de crecimiento (Figura 9A). Además, en los videos observamos el flujo retrogrado (FR) de la F-actina en los filopodios. Para representar la dinámica de la F-actina en una imagen bidimensional generamos kymogramas en los filopodios de los conos, utilizando la aplicación *Kymogram* del software Fiji. En estos kymogramas se apreció el FR en forma de líneas diagonales paralelas (Figura 9B). Sobre estas representaciones bidimensionales se trazaron las líneas de flujo para calcular su velocidad (Figura 9C). La velocidad media registrada del RF de F-actina fue de $\approx 8 \mu\text{m}/\text{min}$, equivalente a estudios previos en modelos experimentales similares (Figura 9D). Por tanto, este resultado valida el procedimiento experimental y análisis realizado. Debido a limitaciones técnicas durante la puesta en funcionamiento de los microscopios necesarios para hacer los *time-lapse*, únicamente se llevó a cabo un experimento con conos procedentes de axones RGC control electroporados. Sin embargo, la generación de este plásmido y optimización de su visualización permitirá realizar futuros estudios *in vivo* del papel de Zic2 en la dinámica de flujo retrógrado de la F-actina en axones de RGCs *in vivo*.

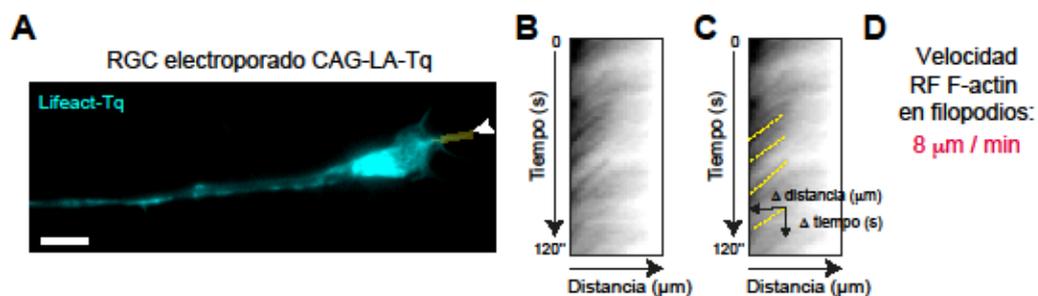


Figura 8. La electroporación de la construcción pCAG-LifeAct-mTurquoise permite la visualización del flujo retrógrado de la F-actina. A. Axón de una RGC electroporada con el plásmido pCAG-LifeAct-mTurquoise. Las puntas de flecha señalan los filopodios y las bandas amarillas marcan el recorrido para el cálculo de la velocidad del flujo retrógrado. Barra de escala, 5 μm . B. Kymogramas generados a partir de los filopodios de CC de axones RGC electroporados con el plásmido pCAG- LifeAct-mTurquoise C. Esquema del cálculo del RF en los Kymogramas generados. Las líneas amarillas discontinuas marcan el movimiento retrógrado de la F-actina (RF). D. Velocidad media del RF de la F-actina (8 μm).

Discusión.

El factor de transcripción Zic2 se ha identificado como un determinante de la lateralidad axonal de las neuronas RGCs. Además, la presencia de Zic2 en las RGCs ipsilaterales provoca la señalización dependiente de efrina-B2 y Wnt5a en el quiasma óptico y conduce a la fosforilación de β -catenina en el residuo Y654, lo que evita la formación de complejos cadherina / actina en la cara del CC que entra en contacto con estas moléculas de guía. A su vez, esto desestabiliza F-actina localmente (Herrera et al., 2003; Morenilla-Palao et al., 2020). En el presente trabajo de Fin de Máster estudiamos cómo el programa genético regulado por Zic2 afecta a la determinación de la morfología y dinámica citoesqueleto en el CC antes y después de la exposición a las proteínas de guía. Para expresar Zic2 en las RGCs electroporamos un plásmido de expresión en mamífero que codifica para este factor de transcripción tal y como se ha descrito previamente (Morenilla-Palao et al., 2020).

Los resultados muestran que la expresión de Zic2 en RGCs aumenta la cantidad de F-actina en el CC incluso antes de la exposición de los CC a las moléculas de guía. Las redes de F-actina se concentran en la periferia de los CC para dar lugar a los filopodios. Sin embargo, este aumento de F-actina parece no aumentar el tamaño de los conos ni la densidad de filopodios en los axones de las células que expresan Zic2. Que el aumento de F-actina no se traduzca en un aumento del número de filopodios podría deberse a que para formar redes de F-actina que den lugar a estas protuberancias es necesario que los nuevos microfilamentos que se forman de *novo*, por proteínas nucleadoras de F-actina como el complejo Arp2/3, se entrelacen con otros para dar lugar a un citoesqueleto de actina funcional (Suetsugu et al., 2002). Estas proteínas nucleadoras responden a estímulos externos como las señales de guía axonal que no están presentes en nuestros experimentos. Sabemos que Zic2 induce la expresión de EphB1 en los axones RGC ipsilaterales. EphB1, es una proteína quinasa que se activa en respuesta a efrina-B2. La activación de EphB1 produce la fosforilación de la β -catenina impidiendo la adhesión de E-cadherina al citoesqueleto de actina produciendo su desestabilización (Lilien & Balsamo, 2005; Morenilla-Palao et al., 2020). Nuestros resultados sugieren que el programa genético activado por Zic2 influye en el citoesqueleto de actina en los CC de las RGCs previamente a la exposición de señales extrínsecas. Por la restricción temporal de este trabajo de máster, no pudimos analizar la influencia de la sobreexpresión de Zic2 sobre el citoesqueleto de los MTs, pero sería interesante ver si Zic2 también regula los MTs. Una de las +TIP encargadas de la coordinación de MTs y actina en el CC es la APC. APC estabiliza los extremos + de los MTs (Koester et al., 2007). Trabajos previos del laboratorio han demostrado que los conos de las neuronas que expresan Zic2 (ipsilaterales) muestran menor expresión de APC2 (la proteína homóloga de APC en el cerebro) que las neuronas contralaterales (Morenilla-Palao et al., 2020), por lo que Zic2 podría jugar también un papel regulatorio en la estabilidad de los MTs. La motilidad del CC depende en gran medida de la remodelación coordinada de las redes citoesqueléticas de las fibras de actina y microtúbulos. Nuestros resultados también muestran que los CC de las neuronas que expresan Zic2 son más dinámicos que los de las neuronas que no expresan este factor de transcripción.

Una vez estudiado el papel del programa genético activado por Zic2 sobre el citoesqueleto de los CC, los próximos estudios deberían ir dirigidos al estudio de la dinámica *in vivo* del citoesqueleto en respuesta a un baño polarizado con Wnt5a y efrin-B2. En este sentido, el plásmido desarrollado en este trabajo de máster (pCAG-lifeAct-turquoise) constituye una herramienta para el estudio *in vivo* de la F-actina ya que permite el estudio del flujo retrógrado que esta experimenta. Es de destacar que nuestros valores de velocidad de RF promedio fueron similares a los reportados previamente (Geraldo & Gordon-Weeks, 2009; Neukirchen & Bradke, 2011; Sánchez-Huertas et al., 2020), por lo que se podría hacer un estudio para determinar la influencia de en la velocidad media del flujo retrógrado de la actina. Por último, otras estrategias

de subclonación en plásmidos con el promotor CAG nos permitirían el estudio de microtúbulos (EB3-mCherry (Stepanova et al., 2003)) y de las adhesiones focales (AF) (pCAG-GFPaxilline, Herrera Lab). La formación de las AF depende de la dinámica de la actina y, a su vez, afecta la dinámica del flujo de actina al desencadenar la transición de un flujo rápido a un flujo lento (Alexandrova et al., 2008). Esperamos que nuestra construcción permita estudiar si Zic2 influye en la dinámica del citoesqueleto en el CC cuando los axones visuales se exponen a moléculas de guía como efrina-B2 o Wnt5a.

Conclusiones.

El protocolo de extracción de la tubulina soluble mejoró la visualización de los MT en el CC, pero no fue suficiente para su estudio.

La expresión de Zic2 en las RGCs no cambia la morfología (área del CC y densidad de filopodios) de los CC.

El programa genético activado por Zic2 regula proteínas que remodelan el citoesqueleto de F-actina ya que produce mayor acumulación de esta en el CC. Esta acumulación es estadísticamente significativa.

El programa genético activado por Zic2 regula la dinámica de los CC tanto en eventos de extensión filopodial como en eventos de retracción filopodial siendo estos últimos estadísticamente significativos.

El plásmido pCAG- LifeAct-mTurquoise generado en este trabajo de máster permite el estudio *in vivo* de la F-actina y el cálculo del flujo retrógrado que esta experimenta.

Bibliografía.

- Alexandrova, A. Y., Arnold, K., Schaub, S., Vasiliev, J. M., Meister, J. J., Bershady, A. D., & Verkhovskiy, A. B. (2008). Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS One*, 3(9), e3234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003234>
- Armijo-Weingart, L., & Gallo, G. (2017). It takes a village to raise a branch: Cellular mechanisms of the initiation of axon collateral branches. *Mol Cell Neurosci*, 84, 36-47. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.03.007>
- Blanquie, O., & Bradke, F. (2018). Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 51, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.024>
- Burnette, D. T., Ji, L., Schaefer, A. W., Medeiros, N. A., Danuser, G., & Forscher, P. (2008). Myosin II activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Dev Cell*, 15(1), 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.016>
- Cammarata, G. M., Bearce, E. A., & Lowery, L. A. (2016). Cytoskeletal social networking in the growth cone: How +TIPs mediate microtubule-actin cross-linking to drive axon outgrowth and guidance. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 73(9), 461-476. <https://doi.org/10.1002/cm.21272>
- Coles, C. H., & Bradke, F. (2015). Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Curr Biol*,

25(15), R677-691. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.020>

- Dent, E. W., Gupton, S. L., & Gertler, F. B. (2011). The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001800>
- Erskine, L., & Herrera, E. (2014). Connecting the retina to the brain. *ASN Neuro*, 6(6). <https://doi.org/10.1177/1759091414562107>
- Fass, J., Gehler, S., Sarmiere, P., Letourneau, P., & Bamburg, J. R. (2004). Regulating filopodial dynamics through actin-depolymerizing factor/cofilin. *Anat Sci Int*, 79(4), 173-183. <https://doi.org/10.1111/j.1447-073x.2004.00087.x>
- Garcia-Frigola, C., Carreres, M. I., Vegar, C., & Herrera, E. (2007). Gene delivery into mouse retinal ganglion cells by in utero electroporation. *BMC Dev Biol*, 7, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-213x-7-103>
- Geraldo, S., & Gordon-Weeks, P. R. (2009). Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci*, 122(Pt 20), 3595-3604. <https://doi.org/10.1242/jcs.042309>
- Gomez, T. M., & Letourneau, P. C. (2014). Actin dynamics in growth cone motility and navigation. *J Neurochem*, 129(2), 221-234. <https://doi.org/10.1111/jnc.12506>
- Herrera, E. (2018). Rodent Zic Genes in Neural Network Wiring. *Adv Exp Med Biol*, 1046, 209-230. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7311-3_11
- Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R. A., Dolen, G., Mikoshiba, K., Brown, S., & Mason, C. A. (2003). Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell*, 114(5), 545-557. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00684-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00684-6)
- Herrera, E., Erskine, L., & Morenilla-Palao, C. (2019). Guidance of retinal axons in mammals. *Semin Cell Dev Biol*, 85, 48-59. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.027>
- Herrera, E., & Garcia-Frigola, C. (2008). Genetics and development of the optic chiasm. *Front Biosci*, 13, 1646-1653. <https://doi.org/10.2741/2788>
- Kahn, O. I., & Baas, P. W. (2016). Microtubules and Growth Cones: Motors Drive the Turn. *Trends Neurosci*, 39(7), 433-440. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.04.009>
- Kahn, O. I., Schätzle, P., van de Willige, D., Tas, R. P., Lindhout, F. W., Portegies, S., Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2018). APC2 controls dendrite development by promoting microtubule dynamics. *Nat Commun*, 9(1), 2773. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05124-5>
- Kerstein, P. C., Nichol, R. I., & Gomez, T. M. (2015). Mechanochemical regulation of growth cone motility. *Front Cell Neurosci*, 9, 244. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00244>
- Koester, M. P., Müller, O., & Pollerberg, G. E. (2007). Adenomatous polyposis coli is differentially distributed in growth cones and modulates their steering. *J Neurosci*, 27(46), 12590-12600. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2250-07.2007>
- Kolodkin, A. L., & Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001727>

- Korobova, F., & Svitkina, T. (2008). Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Mol Biol Cell*, 19(4), 1561-1574. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-09-0964>
- Lilien, J., & Balsamo, J. (2005). The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol*, 17(5), 459-465. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.009>
- Lowery, L. A., & Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5), 332-343. <https://doi.org/10.1038/nrm2679>
- Marcucci, F., Murcia-Belmonte, V., Wang, Q., Coca, Y., Ferreiro-Galve, S., Kuwajima, T., Khalid, S., Ross, M. E., Mason, C., & Herrera, E. (2016). The Ciliary Margin Zone of the Mammalian Retina Generates Retinal Ganglion Cells. *Cell Rep*, 17(12), 3153-3164. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.016>
- Medeiros, N. A., Burnette, D. T., & Forscher, P. (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat Cell Biol*, 8(3), 215-226. <https://doi.org/10.1038/ncb1367>
- Morenilla-Palao, C., López-Cascales, M. T., López-Atalaya, J. P., Baeza, D., Calvo-Díaz, L., Barco, A., & Herrera, E. (2020). A Zic2-regulated switch in a noncanonical Wnt/ β catenin pathway is essential for the formation of bilateral circuits. *Sci Adv*, 6(46). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz8797>
- Murcia-Belmonte, V., Coca, Y., Vegar, C., Negueruela, S., de Juan Romero, C., Valiño, A. J., Sala, S., DaSilva, R., Kania, A., Borrell, V., Martinez, L. M., Erskine, L., & Herrera, E. (2019). A Retino-retinal Projection Guided by Unc5c Emerged in Species with Retinal Waves. *Curr Biol*, 29(7), 1149-1160.e1144. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.052>
- Murcia-Belmonte, V., & Erskine, L. (2019). Wiring the Binocular Visual Pathways. *Int J Mol Sci*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133282>
- Neukirchen, D., & Bradke, F. (2011). Neuronal polarization and the cytoskeleton. *Semin Cell Dev Biol*, 22(8), 825-833. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.08.007>
- Purro, S. A., Ciani, L., Hoyos-Flight, M., Stamatakou, E., Siomou, E., & Salinas, P. C. (2008). Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. *J Neurosci*, 28(34), 8644-8654. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2320-08.2008>
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M., & Wedlich-Soldner, R. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods*, 5(7), 605-607. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1220>
- Sánchez-Huertas, C., Bonhomme, M., Falco, A., Fagotto-Kaufmann, C., van Haren, J., Jeanneteau, F., Galjart, N., Debant, A., & Boudeau, J. (2020). The +TIP Navigator-1 is an actin-microtubule crosslinker that regulates axonal growth cone motility. *J Cell Biol*, 219(9). <https://doi.org/10.1083/jcb.201905199>
- Sánchez-Huertas, C., Freixo, F., Viáis, R., Lacasa, C., Soriano, E., & Lüders, J. (2016). Non-centrosomal nucleation mediated by augmin organizes microtubules in post-mitotic neurons and controls axonal microtubule polarity. *Nat Commun*, 7, 12187.

<https://doi.org/10.1038/ncomms12187>

- Shintani, T., Ihara, M., Tani, S., Sakuraba, J., Sakuta, H., & Noda, M. (2009). APC2 plays an essential role in axonal projections through the regulation of microtubule stability. *J Neurosci*, 29(37), 11628-11640. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2394-09.2009>
- Stepanova, T., Slemmer, J., Hoogenraad, C. C., Lansbergen, G., Dortland, B., De Zeeuw, C. I., Grosveld, F., van Cappellen, G., Akhmanova, A., & Galjart, N. (2003). Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J Neurosci*, 23(7), 2655-2664. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-07-02655.2003>
- Suetsugu, S., Miki, H., & Takenawa, T. (2002). Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins. *Cell Motil Cytoskeleton*, 51(3), 113-122. <https://doi.org/10.1002/cm.10020>
- Williams, Z. M., Bush, G., Rauch, S. L., Cosgrove, G. R., & Eskandar, E. N. (2004). Human anterior cingulate neurons and the integration of monetary reward with motor responses. *Nat Neurosci*, 7(12), 1370-1375. <https://doi.org/10.1038/nn1354>
- Witte, H., Neukirchen, D., & Bradke, F. (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol*, 180(3), 619-632. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707042>
- Zhou, F. Q., & Cohan, C. S. (2004). How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets. *J Neurobiol*, 58(1), 84-91. <https://doi.org/10.1002/neu.10278>