

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
ÁREA BIOLOGÍA

TESIS PRESENTADA PARA ACCEDER
A LA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción Biología Celular y Molecular

“Modulación de la morfogénesis del tubo neural: rol de la actividad de
PKC y su sustrato MARCKS”

Héctor Gonzalo Aparicio Díaz

Laboratorio de Biología Celular del Desarrollo Neural

Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Institut Pasteur de Montevideo

Director de tesis:

Dr. Flavio Zolessi

Tribunal:

Dra. Patricia Cassina (Presidente)
Dr. José Badano (Vocal)
Dra. Inés Carrera (Vocal)

Montevideo, Uruguay
2015

Tabla de contenidos

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Desarrollo temprano del sistema nervioso.....	3
Inducción neural.....	6
Polaridad epitelial.....	7
Cierre del tubo neural.....	10
El citoesqueleto de actina y el cierre del tubo neural.....	12
Proteína quinasa C.....	14
MARCKS.....	15
MARCKS y el desarrollo del sistema nervioso.....	18
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	22
Materiales y métodos.....	23
Embriones.....	23
Cultivo de embriones.....	23
Tratamientos farmacológicos.....	24
Electroporación de vectores de expresión y/o morfolidos en embriones en cultivo.....	25
Oligómeros de morfolido.....	27
Generación del vector CMV-MARCKS_NF-p2A-GFPCaax (MARCKS-NF).....	28
Cortes a congelación.....	31
Inmunofluorescencia indirecta sobre cortes.....	32
Inmunofluorescencia indirecta sobre embriones enteros.....	34
Adquisición y análisis de imágenes.....	35

Resultados.....	36
Estudio del efecto de la activación de PKC sobre néurulas de pollo.....	36
Relación entre la integridad del citoesqueleto de actina y la localización subcelular de MARCKS.....	45
Efecto del <i>knock-down</i> de MARCKS en células neuroepiteliales.....	49
Contribución de MARCKS al efecto generado por la activación de PKC.....	55
Localización subcelular de MARCKS en distintas placodas ectodérmicas.....	59
Efecto de la activación de PKC sobre distintas placodas ectodérmicas.....	61
Discusión.....	64
Activación de PKC y su efecto sobre la morfología de la placa neural en embriones de pollo.....	64
Efecto de la activación de PKC sobre el citoesqueleto de actina.....	66
Activación de PKC y las protrusiones de membrana apical.....	67
MARCKS como el principal mediador de los efectos de la activación de PKC en la neurulación.....	70
Consideraciones finales y conclusiones.....	73
Referencias bibliográficas.....	74

Resumen

En los tetrápodos, la mayor parte del sistema nervioso se genera a partir de la placa neural, la cual se pliega e invagina para formar el tubo neural. La pared de esta estructura está conformada por un epitelio con células altamente polarizadas. El mantenimiento de esta polaridad y el cierre del tubo neural dependen de la integridad del citoesqueleto, cuya dinámica es regulada por diversas vías de señalización. MARCKS es una proteína moduladora de actina, cuya depleción en ratones afecta principalmente el desarrollo del sistema nervioso, incluyendo la aparición de defectos del cierre del tubo neural (DTN). MARCKS es blanco de fosforilación por PKC, la cual modula tanto su localización subcelular como su interacción con otras moléculas. En embriones de pollo, MARCKS se acumula transitoriamente en la región apical de las células neuroepiteliales durante el cierre del tubo neural.

Este trabajo intenta aportar a la comprensión de las funciones de PKC y MARCKS durante la formación del tubo neural en embriones de pollo. Como primera aproximación, modificamos farmacológicamente la actividad de PKC en embriones de pollo en cultivo. La activación de PKC generó importantes DTN. A su vez, la polaridad del neuroepitelio se vio drásticamente afectada, con la aparición de protrusiones apicales de citoplasma y núcleos. Este tratamiento produjo en algunas células la pérdida del contacto con la lámina basal. Al expresar una variante de MARCKS que no es capaz de ser fosforilada por PKC, pudimos revertir en parte el efecto generado por su activación sobre las células neuroepiteliales. Finalmente, redujimos la expresión de MARCKS utilizando morfolinós que bloquean su traducción, lo cual llevó a defectos en la morfogénesis del tubo neural similares a los presentados tras la activación de PKC, tal como la aparición de protrusiones

apicales. Además, encontramos que tanto el enriquecimiento apical de MARCKS como el efecto de la activación de PKC, son características compartidas por otros epitelios en invaginación durante el desarrollo.

Considerando en conjunto los resultados experimentales de esta tesis, podemos afirmar que la actividad de PKC debe estar finamente regulada durante el cierre del tubo neural en embriones de pollo y que una parte importante de los efectos generados por su activación están mediados por MARCKS. Hemos también evidenciado que la localización subcelular de MARCKS, y por lo tanto su asociación a la membrana apical es necesaria para una correcta formación del tubo neural.

Introducción

Una de las preguntas fundamentales en biología es cómo los organismos multicelulares surgen de una única célula: el cigoto. Órganos de complejidad y forma variada como pueden ser el hígado o el cerebro, se forman durante el desarrollo embrionario a través de múltiples movimientos morfogénéticos de capas de células epiteliales (Andrew & Ewald 2010). Un ejemplo extraordinario de morfogénesis epitelial está dado por la formación del tubo neural, que implica una serie de eventos morfogénéticos finamente coordinados que inician el desarrollo del sistema nervioso central de los vertebrados.

Desarrollo temprano del sistema nervioso

En los tetrápodos, la formación del tubo neural ocurre de dos maneras posibles, llamadas neurulación primaria y neurulación secundaria (ver Figura I-1) (Lowery & Sive 2004). La neurulación primaria resulta en la formación de la mayor parte del tubo neural, el cual dará lugar al cerebro y una gran proporción de la médula espinal. Aunque existen algunas diferencias morfológicas en distintas clases de vertebrados tetrápodos, la formación de esta región del tubo comienza a partir de un engrosamiento de una capa de células epiteliales ectodérmicas en la región dorsal del embrión, la placa neural, y la subsiguiente elevación de las regiones laterales de esta capa celular. Estas elevaciones, denominadas pliegues neurales, se dirigen hacia la línea dorsal media donde se encuentran y fusionan completando la conversión de la lámina plana en un tubo. Este proceso se denomina colectivamente cierre del tubo neural (Wallingford 2005).

En contraste, la neurulación secundaria da cuenta de la formación de la porción terminal del tubo neural caudal. Durante la neurulación secundaria no existe una placa neural, sino que el tubo neural deriva de una población de células

mesenquimáticas, que se condensan para formar el “cordón medular” (Shimokita & Takahashi 2011). Posteriormente, las células externas del cordón medular sufren una transición mesénquima-epitelial para formar un epitelio columnar pseudoestratificado similar al de la placa neural, mientras que las células internas permanecen con un fenotipo mesenquimal. Más tarde comienza el desarrollo de uniones intercelulares y las células epiteliales se convierten en células polarizadas. La luz del tubo se forma entre las dos capas de células, formándose múltiples lúmenes que coalescen para formar el tubo neural (Catala et al. 1995). Por último, se produce la fusión con la región rostral del tubo generado por neurulación primaria, para generar un tubo neural único y continuo (Colas & Schoenwolf 2001). Recientemente se ha demostrado que la región de fusión entre ambas porciones del tubo neural no es simplemente un “pegado”, sino que posee características morfogenéticas particulares, entre las que se destacan movimientos concertados de elevación y plegado de la placa neural combinado con un ingreso local e intercalación de células. Por esta razón los autores lo han catalogado como un proceso distinto a los mencionados anteriormente, denominándolo “neurulación de la unión” (Dady et al. 2014).

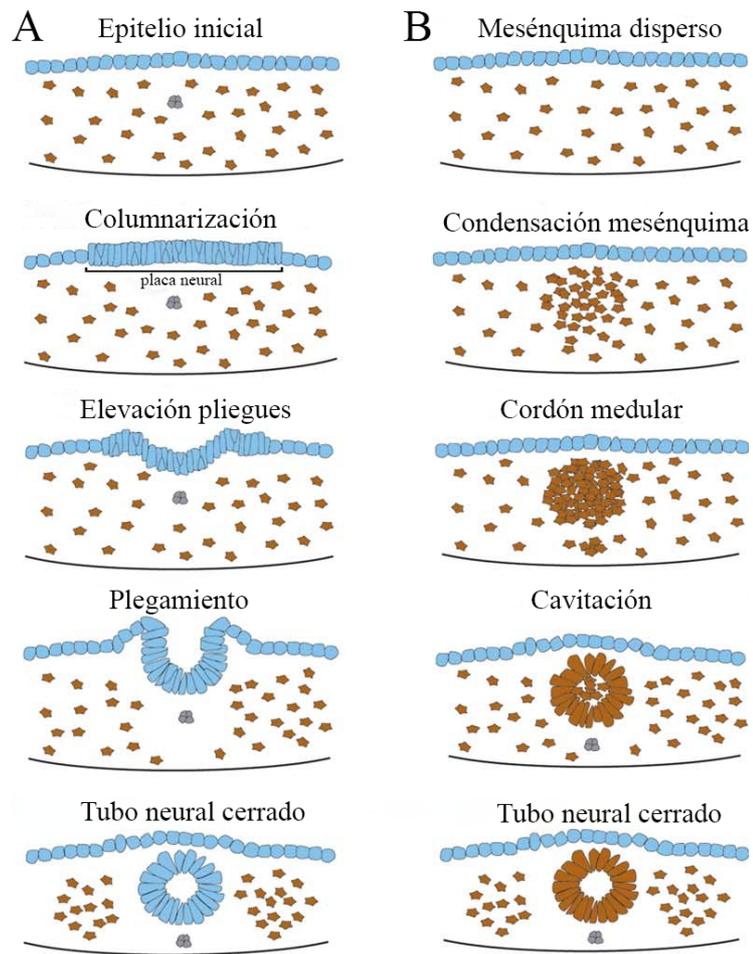


Figura I-1. Neurulación primaria y secundaria. **A** La neurulación primaria comprende el plegamiento de una placa neural epitelial en un tubo neural. **B** Durante la neurulación secundaria el cordón medular sufre una transición mesénquima-epitelial antes de la cavitación para formar el tubo neural. Imagen tomada y modificada de Lowery & Sive 2004.

Inducción neural

Previo a la formación de la placa neural, la región del ectodermo dorsal que dará lugar al sistema nervioso debe ser especificada a convertirse en ectodermo neural, en un proceso denominado inducción neural. Dicha inducción involucraría la supresión de un destino epidérmico, más que una inducción de un destino neural tal como lo indica el modelo de "inducción por defecto" (De Robertis & Kuroda 2004). Este modelo postula que una subfamilia de factores TGF β , denominados proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) son las encargadas de especificar un destino epidérmico. Estas son proteínas extracelulares que se unen y activan receptores de superficie celular, llevando a la activación de factores de transcripción que estimulan la expresión de genes de diferenciación epidérmica. En la región en que se formará el sistema nervioso central existen antagonistas de BMPs, secretados por el cordamesodermo dorsal. Estos antagonistas (folistatina, noggina, cordina y cerberus) son proteínas de secreción que se unen a los ligandos de BMP previniendo la activación de los receptores de BMP y por lo tanto determinando un destino neural (De Robertis & Kuroda 2004).

Sin embargo, otros experimentos realizados en pollo y *Xenopus* han arrojado evidencias de que el proceso de inducción neural no es tan sencillo. Se ha sugerido que la cascada de señalización mediada por FGF posee un rol instructivo en la inducción neural en estadios tempranos y que es independiente de su actividad inhibitoria de la vía de BMP. Se ha observado en embriones de pollo que la señal de BMP inhibe la expresión del marcador de placa neural "definitivo" *Sox2*, pero no la expresión del marcador temprano *Sox3* (Linker & Stern 2004). A su vez, en *Xenopus* el bloqueo de la señal de BMP en el estadio de gástrula (cuando ocurre la inducción neural) no induce tejido neural, pero cuando la inhibición de la actividad de BMP se

realiza luego del estadio de gástrula, se genera tejido neural ectópico. Sin embargo, cuando la inhibición tardía de BMP es combinada con una activación temprana de FGF, existe un aumento considerable en la inducción. Dichos ensayos apoyan la idea de que una señal de FGF temprana es requerida antes de la inhibición de la actividad de BMP para una correcta inducción neural (Delaune et al. 2005). Por lo tanto, parece ser que la inducción neural no ocurre en un simple paso, sino que requiere de una secuencia de señales en un orden específico en el cual la inhibición por BMP constituye un evento tardío (Stern 2006).

Polaridad epitelial

Los epitelios son tejidos constituidos por células contiguas yuxtapuestas, unidas fuertemente entre sí, que rodean cavidades y constituyen componentes funcionales esenciales de distintos órganos. Proveen barreras de protección entre compartimentos que poseen diferentes funciones fisiológicas, además de múltiples funciones como secreción, absorción y recepción sensorial. Los tejidos epiteliales se caracterizan por poseer uniones célula-célula muy estables mediadas por distintos tipos de complejos de adhesión, por la conexión con la lámina basal y por una robusta polarización que determina distintos dominios celulares. La polaridad ápico-basal es una característica propia de todos los epitelios y separa la membrana plasmática en 3 regiones: basal, lateral y apical. El dominio basal contacta con la lámina basal a través de uniones mediadas por integrinas, en el dominio lateral se encuentran los complejos de unión célula-célula, como son las uniones estrechas y *zonula adherens*. Las uniones estrechas forman barreras con permeabilidad selectiva regulando el pasaje de agua, iones y otros solutos. A su vez, sirven como barreras moleculares que dividen los dominios apical y baso-lateral de la membrana

plasmática en distintos compartimentos (Anderson 2001). Por otro lado, las uniones de tipo adherente, compuestas por cadherinas, proveen al tejido epitelial de una cohesión muy fuerte entre sus células (Niessen 2007).

Distintos componentes de los complejos de adhesión anclan y organizan el citoesqueleto, e interactúan con factores de transcripción y con distintas moléculas de señalización celular, funcionando como centros integradores para eventos de transducción de señales (Hartsock & Nelson 2008). Los complejos de adhesión celular a su vez participan en el establecimiento de la polaridad celular, anclando complejos moleculares que establecen y mantienen la polaridad ápico-basal. El complejo Crumbs, compuesto por Crumbs, PALS y PATJ, se encuentra en la región apical, enriquecido en el límite entre las regiones apical y lateral de la célula. La interacción de PATJ con ZO-3 y claudinas, anclan dicho complejo a las uniones estrechas (Roh et al. 2002). Se ha documentado que la expresión ectópica de Crumbs confiere por sí sola la identidad apical a la membrana plasmática (Wodarz et al. 1995). Mutaciones en los componentes de este complejo inhiben la formación de un dominio apical y la subsecuente pérdida de polaridad (Tepass et al. 2001). El complejo Crumbs a su vez restringe el reclutamiento de un segundo complejo de polaridad, Par, integrado por PAR3, aPKC y PAR6, a una región más basal (sub-apical) de la membrana. Su localización está mediada por la interacción de PAR3 y un componente de las uniones estrechas, JAM-1 (Itoh et al. 2001). Por último, el complejo Scribble, conformado por Scribble, Dlg y Lgl, se localiza en la región basolateral de la membrana. Scribble inhibe la formación del complejo Par, otorgando identidad baso-lateral a la membrana (Tanentzapf & Tepass 2003). La interacción mutuamente antagónica entre estos tres complejos (ver Figura I-2) es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad ápico-basal. Estos complejos funcionan como centros de señalización y anclaje de distintas moléculas, facilitando

la coordinada regulación del citoesqueleto, el tráfico de membrana y la composición de la membrana plasmática necesarias para el establecimiento de una correcta polaridad celular (Goldstein & Macara 2007).

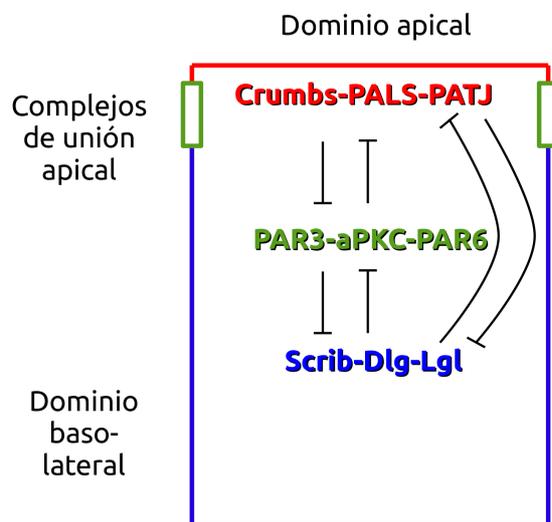


Figura I-2. Distribución de los complejos de polaridad epitelial. El complejo Crumbs se localiza por encima de las uniones estrechas, el complejo Par se localiza predominantemente en las uniones estrechas y el complejo Scribble se localiza en el dominio lateral de la membrana plasmática. La inhibición recíproca entre los complejos (flechas negras) establece y mantiene sus respectivas distribuciones asimétricas.

Las células neuroepiteliales también están morfológicamente polarizadas con dominios de membrana apical y baso-lateral, y contienen estructuras subcelulares polarizadas, como el centrosoma y el citoesqueleto cortical de actina (Chenn et al. 1998). Sin embargo poseen una particularidad: durante el cierre del tubo neural pierden la expresión de la proteína transmembrana ocludina, que es esencial para la función de las uniones estrechas. Al mismo tiempo, otra proteína enriquecida en las

uniones estrechas, ZO-1, cambia su localización a las uniones de tipo adherente (Aaku-Saraste et al. 1996). Dicho fenómeno conlleva a la pérdida total del sellado apical producido por las uniones estrechas y a una disminución de la polaridad ápico-basal.

Cierre del tubo neural

La formación de la placa neural comienza con una diferenciación fenotípica de sus células con respecto al ectodermo que la rodea y que formará la epidermis: las células adoptan una forma columnar y se elongan en su eje ápico-basal (ver Figura I-3 A). Esta elongación está mediada en parte por microtúbulos paraxiales (Schoenwolf & Powers 1987). El segundo paso, el moldeado de la placa neural, es un paso crítico. Al momento de la especificación, la placa neural es ancha a lo largo del eje medio-lateral y corta en el eje céfalo-caudal. Durante este paso, la placa se estrecha en el eje medio-lateral y se alarga en el eje céfalo-caudal, mediante un proceso de convergencia y extensión en el cual las células convergen en la línea media y como consecuencia el tejido se alarga. Alteraciones de estos movimientos generan defectos en el cierre del tubo neural (Wallingford & Harland 2002). La regulación de los movimientos de extensión convergente están mediados por la polaridad celular planar (PCP), entendida como la polaridad celular en el plano del epitelio. Esta clase de polaridad le confiere al tejido coordenadas espaciales que permiten comportamientos celulares orientados en el plano de una capa celular (Wallingford 2012).

A su vez, el cambio de forma que sufren las células neuroepiteliales de acuerdo al eje ápico-basal también contribuye al moldeado de la placa neural. La elevación del neuroepitelio ayuda a disminuir el ancho de la placa con respecto al

eje medio-lateral, ya que el volumen de las células no varía durante el proceso de elongación de las células (Schoenwolf & Powers 1987).

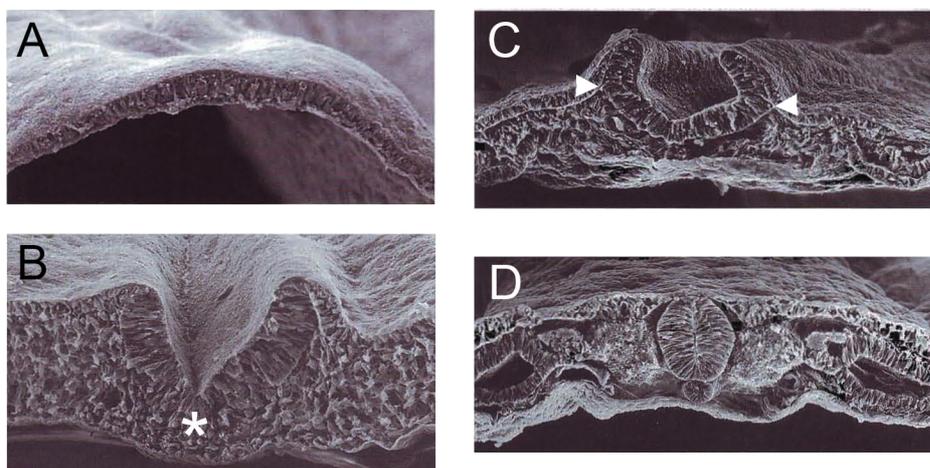


Figura I-3. Neurulación en el embrión de pollo. Secuencia de imágenes de microscopía electrónica de barrido de embriones de pollo en diferentes estadios de la neurulación. La placa neural **(A)** se transforma en el surco neural mediante la formación del punto de bisagra medial (asterisco) **(B)** que luego adiciona los puntos de bisagra laterales (puntas de flecha) **(C)**, con lo cual los pliegues neurales se enfrentan en la línea dorsal media, formando el tubo neural **(D)**. Modificado de Gilbert 2010.

El plegamiento de la placa comienza mientras el moldeado está en marcha. Este proceso involucra la formación de los pliegues neurales en los bordes laterales de la placa y su subsecuente elevación y convergencia hacia la línea media (ver Figura I-3 B-C). El plegamiento se lleva a cabo gracias a fuerzas intrínsecas y extrínsecas a la placa neural. Las fuerzas intrínsecas involucran la generación de

puntos de bisagra, un punto de bisagra medial que se extiende a lo largo de todo el eje rostro-caudal, y un par de puntos bisagras laterales que se encuentran principalmente en las regiones presuntivas del cerebro (Colas & Schoenwolf 2001). Luego, la placa neural rota alrededor de los puntos de bisagra. Las fuerzas extrínsecas a la placa neural dependen tanto de la expansión del mesénquima de la cabeza, como del deslizamiento del tejido ectodérmico no neural adyacente a la placa. Ambos tejidos generan una fuerza de tracción que ayuda a la convergencia de los pliegues neurales (Moury & Schoenwolf 1995; Chen & Behringer 1995). Como consecuencia de estos movimientos, los pliegues entran en contacto en la línea media, donde se adhieren y posteriormente se fusionan, generando un tubo neural separado del ectodermo epidérmico (ver Figura I-3 D).

El citoesqueleto de actina y el cierre del tubo neural

El citoesqueleto de actina posee un papel importante en la generación del tubo neural, en especial en el proceso de plegamiento de la placa. Esta observación está dada por el hecho de que agentes farmacológicos que afectan a los filamentos de actina, y mutaciones en genes que codifican proteínas que los regulan, bloquean el cierre del tubo neural en este paso. Dos eventos morfológicos ocurren en este momento que dan cuenta de la dependencia del citoesqueleto, uno de ellos es la formación de los puntos de bisagra a través del cambio en la morfología celular, mientras que el segundo es el plegamiento de la placa alrededor de los puntos de bisagra.

La formación de los puntos de bisagra se puede llevar a cabo por dos mecanismos: constricción apical y/o expansión de la región basal de las células neuroepiteliales. El primero consiste en una reducción del área de la región apical

de las células, transformando células de morfología columnar en células con aspecto de cuña. La disminución de la región apical se da por un proceso de constricción del anillo de actina y miosina (actomiosina) (Sawyer et al. 2010). Existe una densa distribución de filamentos de actina en la región apical de las células neuroepiteliales y proteínas clave que participan en la contracción del anillo de actomiosina, como son Rho, la quinasa de Rho (ROCK) y la proteína motora miosina IIB, están localizadas apicalmente en las células neuroepiteliales (Hildebrand 2005; Kinoshita et al. 2008; Nishimura & Takeichi 2008). A su vez, el complejo motor de la miosina II se encuentra en un estado activo, dada por la fosforilación de la cadena liviana de la miosina II (Kinoshita et al. 2008).

Aunque la constricción apical mediada por el anillo de actomiosina es ampliamente aceptada como motor de la neurulación, existen ciertas evidencias que demuestran que el mecanismo no es tan simple. La placa neural se pliega en lugares específicos (los puntos de bisagra central y mediales) en lugar de una invaginación general del neuroepitelio. Sin embargo, el anillo de actomiosina no se encuentra solamente en esos puntos, sino que se encuentra en la cara apical de todas las células (Ybot-Gonzalez & Copp 1999). Modelos alternativos que se centran en la regulación de la polaridad ápico-basal como efectores de la constricción apical han surgido en respuesta a estas interrogantes. Como se comenta más arriba, el complejo Par se encuentra asociado a las uniones estrechas, sin embargo su asociación con dichas uniones es sensible a la cascada de señalización mediada por BMP (Eom et al. 2011). Una disminución local de la señal de BMP vuelve inestable al complejo PAR, degradándolo y dejando el camino libre para una incursión apical de la proteína LGL del complejo Scribble. LGL le confiere a la membrana apical una identidad baso-lateral, disminuyendo el área de membrana apical, llevando a una constricción (Eom et al. 2011).

En esta misma línea, se ha establecido una relación entre la progresión del ciclo celular y los cambios morfológicos de las células en los puntos de bisagra (Smith & Schoenwolf 1988). Mientras las células neuroepiteliales transcurren en el ciclo celular, sus núcleos migran en el eje ápico-basal, ocurriendo la mitosis siempre en la región apical. A este proceso, descrito por F. C. Sauer en 1935, se lo denomina “migración nuclear intercinética”. Las células del punto de bisagra medial poseen ciclos celulares largos, y cortos estadios de mitosis en la región apical de las células en comparación con el resto del neuroepitelio. Esto lleva a una expansión de la región basal, contribuyendo así, a la generación de las bisagras (Smith & Schoenwolf 1988).

Proteína quinasa C

La proteína quinasa C (PKC) comprende una familia de isoenzimas serina/treonina quinasa estructuralmente homólogas, las cuales poseen un rol crítico en la transducción de señales. Las PKC están ampliamente conservadas en eucariotas variando en complejidad desde una única isoforma en levaduras, a 5 en moscas, hasta 13 en mamíferos (Mehta 2014). Esta familia está involucrada en una gran variedad de funciones celulares y vías de transducción de señales regulando migración, polaridad, proliferación, diferenciación y muerte celular (Nishizuka 1995; Saito et al. 2002).

Los trece miembros de la familia en mamíferos están agrupados en cuatro subclases de acuerdo a sus características estructurales y requerimientos de cofactores. Todos los miembros comparten una estructura básica, consistiendo en un dominio regulatorio en la región N-terminal y un dominio catalítico en C-terminal. Las subclases se dividen en PKCs clásicas o convencionales (cPKC: α , β I,

β II y γ), PKCs noveles (nPKC: ϵ , θ , η y δ), PKCs atípicas (aPKC: ζ y ι) y las quinasas relacionadas a PKC (PKR1, 2 y 3) (Ron & Kazanietz 1999; Mellor & Parker 1998). Todas las isoformas requieren de fosfatidilserina para su activación. Las cPKCs son sensibles al Ca^{2+} y necesitan la adición de diacilglicerol o éster de forbol para su activación. Las nPKCs son insensibles al Ca^{2+} pero igual requieren de la adición de diacilglicerol o éster de forbol para su activación. Para el caso de la aPKCs, éstas son insensibles al Ca^{2+} e independientes de diacilglicerol y éster de forbol. Por último, las PRK son insensibles al Ca^{2+} al diacilglicerol y éster de forbol, sin embargo se ha documentado que PRK1 se une a RhoA aumentando su activación *in vitro* (Mellor & Parker 1998).

Como mecanismo general, la activación de las cPKCs está mediada por el segundo mensajero diacilglicerol, producto de la reacción enzimática de la fosfolipasa C sobre el fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), generando diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). El IP_3 aumenta la concentración citosólica de Ca^{2+} , lo cual provoca la translocación de PKC desde el citosol a la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Allí se activa por la combinación de Ca^{2+} , diacilglicerol y el fosfolípido fosfatidilserina (Saito et al. 2002).

MARCKS

MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate) es una proteína perteneciente a una familia compuesta por dos miembros: MARCKS y MARCKS-Like 1. Originalmente se la identificó como el principal sustrato de PKC (Albert et al. 1986) y desde entonces ha sido implicada en un gran número de procesos celulares. Entre ellos se destaca la regulación de la dinámica del citoesqueleto cortical de actina en eventos como el desarrollo del sistema nervioso, la migración celular y la

adhesión, así como en los procesos de fagocitosis, endocitosis y exocitosis (Arbuzova et al. 2002). Si bien es una proteína ubicua, su expresión es elevada en el cerebro, donde constituye cerca del 0.2% de las proteínas totales (Albert et al. 1986).

Las proteínas de la familia MARCKS son proteínas pequeñas, intrínsecamente desplegadas, ácidas, ricas en alanina, glicina, prolina y ácido glutámico. En el pollo, la secuencia de MARCKS consta de 280 aminoácidos y tiene un peso molecular medido por espectrometría de masa MALDI-TOF de 27.8kDa (Stumpo et al. 1989; Zolessi et al. 2004), pero su alto contenido en aminoácidos con carga negativa y su estructura desplegada hacen que su migración en geles de SDS-poliacrilamida sea anómala y su tamaño aparente ronde entre los 60 y 80 kDa (Blackshear 1993). Se encuentra tanto asociada a la membrana celular como libre en el citosol (soluble). Contiene tres dominios conservados, un dominio N-terminal que puede ser miristilado, un dominio MH2 cuya función es desconocida y un dominio efector básico también llamado dominio de fosforilación, ya que los sitios de fosforilación por PKC se encuentran en él (Stumpo et al. 1989). El dominio amino terminal está formado por los primeros catorce aminoácidos que conforman la secuencia consenso para su miristilación. Ésta es una modificación co-traducciona en la cual se adiciona un ácido mirístico al grupo amino de la glicina (la metionina inicial es eliminada co-traduccionalmente), en el extremo N-terminal, mediante un enlace amida (Towler et al. 1988). Dicha miristilación no jugaría un rol preponderante en la determinación de la estructura secundaria ni su interacción con otras proteínas (Taniguchi et al. 1994). La secuencia que codifica el dominio MH2 presenta un alto grado de conservación entre distintos vertebrados y es sitio de fosforilación por quinasas dependientes de ciclinas (cdk) en neuronas en diferenciación (Zolessi et al. 2004; Toledo et al. 2013). A su vez, es el único sitio de empalme del ARNm (Blackshear et al. 1992). Finalmente, el dominio efector (DE) posee una secuencia

de 25 aminoácidos con 4 serinas susceptibles de ser fosforiladas por PKC (Thelen et al. 1991). En bovinos, pollos y en humanos, las cuatro serinas pueden ser fosforiladas, mientras que en ratones solo la primera, segunda y cuarta (S152, 156 y 163) son fosforilables por PKC clásicas (α , β , γ) y noveles (δ , θ , ϵ y η) (Taniguchi et al. 1994; Herget et al. 1995; Uberall et al. 1997).

Además de ser el sitio de fosforilación por PKC, el DE también actúa como sitio de interacción con otras moléculas tales como la calmodulina unida a calcio (Ca-CaM), los fosfolípidos de membrana cargados negativamente y los filamentos de actina (ver Figura I-4). La proteína desfosforilada entrecruza los filamentos de actina por medio de dos sitios de unión a actina idénticos localizados en el DE, responsables de interactuar y entrecruzar los filamentos de actina (Hartwig et al. 1992; Yarmola et al. 2001). La capacidad de entrecruzar filamentos puede ser inhibida por la unión a calmodulina o por la fosforilación mediada por PKC. La fosforilación no impide la unión a la actina, pero ésta se vuelve más laxa impidiendo el entrecruzamiento de los microfilamentos (Hartwig et al. 1992). La unión a la membrana plasmática está mediada por la unión hidrofóbica del grupo miristato a la bicapa lipídica, y por la interacción electrostática entre los residuos básicos del DE y las cabezas cargadas negativamente de fosfolípidos de la membrana (Aderem 1992; Blackshear 1993; Wang et al. 2001). El dominio efector puede ser separado de la membrana plasmática si se eliminan los fosfoinosítidos PIP₂ y PIP₃, demostrando la importancia de estos fosfolípidos en el anclaje del DE a la membrana plasmática (Heo et al. 2006). La fosforilación también provoca su translocación al citosol, al cambiar las cargas eléctricas del DE (Rosen et al. 1990). MARCKS es de esta manera modulada por la activación de PKC y de Ca-CaM (Hartwig et al. 1992).

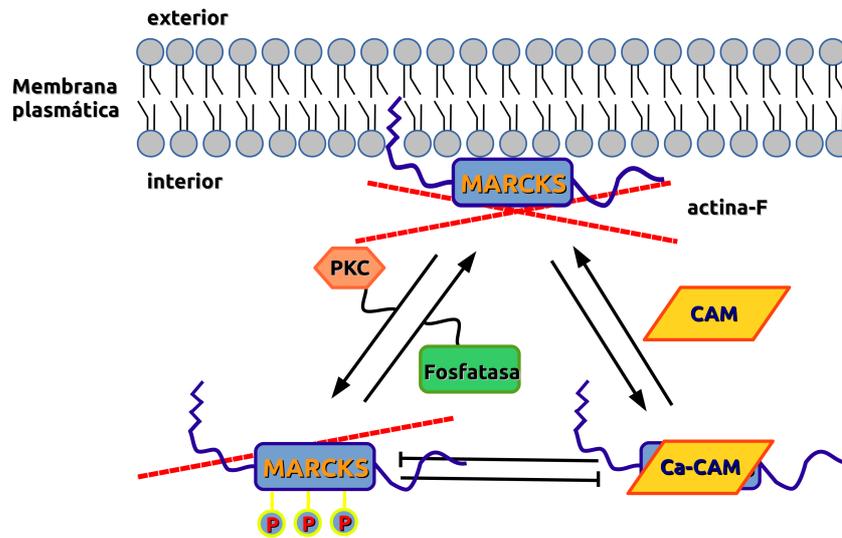


Figura I-4. Representación de las principales interacciones y cascadas de señalización de MARCKS. MARCKS se une a la membrana plasmática a través de un grupo miristato que se inserta en la bicapa y a la interacción del DE con los fosfolípidos de la membrana. MARCKS puede translocarse de manera reversible al citosol, por ciclos de fosforilaciones/desfosforilaciones mediadas por PKC y fosfatasas respectivamente o aumentos transitorios en la concentración de Ca^{2+} llevando a una activación de Ca-Calmodulina. Nótese que la capacidad de entrecruzar filamentos de actina, así como las interacciones con PKC y Ca-CAM son mutuamente excluyentes.

MARCKS y el desarrollo del sistema nervioso

A pesar de ser MARCKS una proteína ampliamente distribuida en distintos tejidos, los efectos de la delección de su gen en ratones sólo son importantes a nivel del sistema nervioso (Stumpo et al. 1995). Todos los ratones homocigotos para dicha

deleción murieron antes o algunas horas después del nacimiento. En ellos el fenotipo es complejo, y presenta severas alteraciones anatómicas derivadas de un cierre defectuoso del tubo neural como son exencefalia y onfalocele. En aquellos ratones donde no existía exencefalia, se apreciaron defectos tales como la falla en la laminación de la corteza cerebral. Estos ratones presentan además agenesia del cuerpo calloso y otras comisuras del cerebro anterior. Algunos de estos defectos pueden ser explicados por anomalías en la migración neuronal, ya sea como consecuencia de alteraciones en la interacción célula-célula o célula-matriz, funciones donde MARCKS podría jugar un rol importante. En estos ratones existen anomalías en la lámina basal que rodea el tubo neural y en otras moléculas de la matriz extracelular como los proteoglicanos, lo cual puede ocasionar defectos en la migración de los neuroblastos (Blackshear et al. 1997). Los ratones heterocigotos por su parte, si bien no presentan deficiencias anatómicas ostensibles, tienen defectos en el aprendizaje espacial (McNamara et al. 1998). Los defectos provocados por la deleción del gen de MARCKS son revertidos en ratones transgénicos que expresan la variante humana completa de MARCKS. Por su parte, el rescate con la variante completa de MARCKS humana pero no miristilable, la cual presenta menos afinidad por la membrana plasmática, no revierte la muerte perinatal pero sí la mayoría de los defectos del desarrollo del sistema nervioso (Swierczynski et al. 1996). A su vez, la variante no miristilable y seudofosforilada (mutación de las cuatro serinas del DE por ácido aspártico), que presenta una afinidad muy reducida por la membrana plasmática, revierte todos los defectos de los ratones *knock-out* aunque no aumenta la sobrevivencia de los mismos. Por otra parte, la complementación de los ratones *knock-out*, con una variante de MARCKS no fosforilable (serinas del DE sustituidas por asparaginas) revierte todos los defectos del desarrollo del sistema nervioso aunque tampoco mejora la sobrevivencia de

los ratones (Scarlett & Blackshear 2003). Estos resultados indican que a pesar de ser conocida como el principal sustrato de PKC, la fosforilación de MARCKS en el DE no sería necesaria para algunas de las funciones que cumple MARCKS en el sistema nervioso. Más recientemente, se demostró que MARCKS posee un rol esencial en la ubicación y proliferación de la glía radial. Los ratones *marcks*-/- presentan una organización aberrante del andamiaje dado por la glía radial, presentando células progenitoras ectópicas a lo largo de toda la zona intermedia y la placa cortical. Dichas células presentan una localización anómala de componentes de los complejos de polaridad celular como son: aPKC ζ , PAR3, CDC42, β -catenina, prominina, N-cadherina y la miosina IIB. Esto determina defectos en la organización de las capas de la corteza y la presencia de neuronas ectópicas (Weimer et al. 2009). De modo interesante, estos defectos fueron revertidos por la expresión de una variante de MARCKS no fosforilable en el DE, sugiriendo que la fosforilación por PKC es prescindible en esta función de MARCKS, pero no fue revertida por la variante mutante carente de la miristilación, fundamental para la correcta inserción de MARCKS en la membrana (Weimer et al. 2009). Estos resultados sugerirían que la fosforilación por PKC no es necesaria para la/s función/es que MARCKS media durante el desarrollo normal del sistema nervioso central en ratones, pero sí lo son para la sobrevivencia luego del nacimiento.

Por otro lado, se ha estudiado el rol de MARCKS durante el desarrollo embrionario temprano de un anamniota, *Xenopus laevis*. La pérdida de función de MARCKS utilizando oligómeros de morfolino generó defectos en los movimientos morfogenéticos durante la gastrulación (Iioka et al. 2004). Utilizando explantos de *animal cap*, Iioka y colaboradores encontraron que MARCKS regula la formación del citoesqueleto cortical de actina, la adhesión celular y el control de la polaridad celular durante la gastrulación. De manera interesante, cuando el morfolino es

inyectado en las blastómeras dorso-anteriores en un embrión de ocho células (células que originarán el neuroectodermo), se observan defectos notorios en el cierre del tubo neural (Iioka et al. 2004). Estos resultados sugieren una función conservada de MARCKS en el cierre del tubo neural entre anfibios y mamíferos (Iioka et al. 2004).

Por último, en embriones de pollo se ha encontrado que MARCKS se acumula transitoriamente en la región apical de las células neuroepiteliales durante el cierre del tubo neural (Zolessi & Arruti 2001). La apicalización comienza luego de formada la placa neural, sin embargo es durante el proceso de plegamiento donde su distribución asimétrica se vuelve evidente. Luego de finalizado el proceso de formación del tubo neural, se pierde su distribución asimétrica, encontrándose homogéneamente distribuida en la periferia de las células neuroepiteliales (Zolessi & Arruti 2001). Recientemente, hemos retomado esta línea de trabajo (Aparicio 2012), con el fin de comenzar a comprender las funciones de MARCKS y su translocación en el cierre del tubo neural en embriones de pollo. Para ello desarrollamos y pusimos a punto un protocolo para la activación farmacológica de PKC en embriones de pollo en cultivo. La activación de PKC generó importantes defectos en la neurulación, y la mayor parte de MARCKS resultó separada de la membrana plasmática. La polaridad celular del neuroepitelio se vio afectada, con la aparición de protrusiones de membrana apical y un desplazamiento de distintos marcadores apicales a un área central (Aparicio 2012). Esta estrategia experimental nos permitió alterar farmacológicamente la asociación de MARCKS con la membrana plasmática, mediante la activación de PKC, y correlacionar los defectos causados en el cierre del tubo neural con la localización subcelular de MARCKS.

Hipótesis de trabajo

A partir de los antecedentes expuestos, proponemos que la localización subcelular de MARCKS, modulada por la actividad de PKC, sería necesaria para una correcta formación del tubo neural.

Objetivo principal

El objetivo de este trabajo de tesis consiste en aportar a la comprensión de las funciones de PKC y MARCKS durante el cierre del tubo neural.

Objetivos específicos

- ⊙ Profundizar el estudio del efecto de la activación de PKC en las células del neuroepitelio utilizando ésteres de forbol.
- ⊙ Determinar la localización subcelular de MARCKS en la región apical de las células neuroepiteliales al afectar el citoesqueleto de actina.
- ⊙ Evaluar la contribución de MARCKS al efecto generado por la activación de PKC en la placa neural
- ⊙ Estudiar el efecto del silenciamiento de MARCKS, usando morfolidos, durante el cierre del tubo neural.
- ⊙ Extender el estudio de PKC y MARCKS a otros epitelios en invaginación en embriones de pollo.

Materiales y métodos

Embriones

Para este trabajo se utilizaron huevos embrionados de pollo (*Gallus gallus*) donados por Avícola Prodhin. Los mismos fueron incubados en una incubadora a 37° C, con humedad constante y movimiento basculante. Se obtuvieron embriones de diferentes estadios, desde estadio HH4 (12 horas) hasta estadio HH17 (52-64 horas), de acuerdo a la tabla de estadios normales de desarrollo del pollo de Hamburger y Hamilton (Hamburger & Hamilton 1992).

Cultivo de embriones

Los embriones fueron cultivados utilizando el método EC (Chapman et al. 2001). Este método consiste en la utilización de un papel de filtro para mantener el embrión bajo la tensión de la membrana vitelina, sobre un sustrato semi-sólido de agar-albúmina. Para la implementación del cultivo, los huevos embrionados se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se procedió a la rotura de la cáscara colocando el contenido del huevo en una placa de Petri de 10 cm de diámetro. El blastodermo debe quedar hacia arriba y aproximadamente centrado en la yema de huevo. La albúmina interfiere con la capacidad de la membrana vitelina para pegarse al papel de filtro. Por lo tanto, se retiró la albúmina que cubre el blastodermo utilizando papel tisú, mediante movimientos suaves desde el centro hacia la periferia del blastodermo. Una vez que el área de membrana vitelina quedó libre de albúmina, una pieza de papel de filtro de aproximadamente 1.5-2.0 cm cuadrados, con una abertura central con forma de trébol de cuatro hojas en el centro, se colocó suavemente sobre la membrana vitelina, de manera que el embrión quedara

en el centro. El papel inmediatamente absorbe el líquido de la superficie de la membrana vitelina, adhiriéndose firmemente. Posteriormente se cortó la membrana vitelina alrededor del papel de filtro. Con pinzas finas se retiró suavemente el papel de filtro (con el embrión adherido al mismo por medio de la membrana vitelina) de la yema en dirección oblicua. Se eliminó el exceso de yema del blastodermo realizando inmersiones en PBS. Luego se procedió a la datación del embrión de acuerdo a Hamburger y Hamilton (1951). Por último los embriones fueron incubados a 37°C a humedad constante, dentro de una placa de Petri de 3.5 cm de diámetro conteniendo el medio semi-sólido de agar-albúmina.

Tratamientos farmacológicos

Los tratamientos farmacológicos se llevaron a cabo sobre embriones en condiciones de cultivo EC. En el medio semi-sólido de agar-albúmina se incluyeron las siguientes drogas: forbol-miristato-acetato (PMA, Sigma-Aldrich, P-8139), blebistatina (Sigma-Aldrich, B-0560) y citocalasina D (Sigma-Aldrich, C-8273), utilizándose en todos los casos dimetil sulfóxido (DMSO) como vehículo.

Los tratamientos con PMA comprendieron un rango de dosis de 1 a 5 μM por un período de 3 horas, desde el estadio de surco neural abierto (HH8) hasta el estadio HH9 correspondiente al cierre del tubo neural cefálico.

Realizamos experimentos de co-tratamiento de embriones desde HH8 hasta HH9 (3 horas de exposición) con 2 μM PMA y 200 μM blebistatina (inhibidor de la miosina II) simultáneamente. Además de las drogas colocadas en el medio de cultivo, se adicionaron 20 μl de blebistatina por encima de cada embrión. En esta serie de ensayos se realizaron todas las combinaciones experimentales posibles: control (vehículo), PMA, blebistatina y PMA/blebistatina.

En el caso de los experimentos con la droga citocalasina D (desestabilizante del citoesqueleto de actina), la exposición a la droga fue por 30 minutos a una concentración de 10 µg/ml. En todos los casos se administró a los embriones control dosis equivalentes de DMSO a las utilizadas en los grupos experimentales.

Electroporación de vectores de expresión y/o morfolinós en embriones en cultivo

Para los ensayos de electroporación construimos una cámara de electroporación que consiste en una placa de petri de 35 mm a la cual se le acopló en el fondo un alambre de platino de 1 mm de diámetro que fue enroscado y luego aplanado finalizando con un diámetro de 3 mm en su extremo. Se aisló la mayor parte de la extensión del alambre con esmalte de uñas, menos el extremo enroscado. El electrodo móvil fue armado también con alambre de platino, aplanado en el extremo y acoplado a un armazón de lapicera. El generador de pulsos cuadrados fue construido en el taller de electrotecnia de la Facultad de Ciencias, posee una duración mínima de pulso de 1 ms, una separación temporal entre pulsos de 10 ms y una frecuencia de trenes de descarga regulable.

Antes de cada experimento se cubrió la cámara de electroporación con agarosa al 1%, generando una capa de 2 mm de espesor entre el electrodo y el borde de la agarosa. Luego de solidificada la agarosa, realizamos un orificio de forma circular de 5 mm de diámetro en la capa de agarosa sobre el extremo del electrodo, removiendo el gel que lo recubría. El buffer utilizado para las sesiones de electroporación fue Tyrode, descrito como el de mayor eficiencia a la hora de electroporar células del epiblasto (Voiculescu et al. 2008). Se colocó un volumen de

4 ml que cubre toda la placa y genera un espesor de 2 mm sobre la agarosa. Se colocaron embriones de estadio HH4 en cultivo EC, en la cámara de electroporación quedando totalmente sumergidos en Tyrode y colocados de tal forma que el ectodermo dorsal quede orientado hacia el cátodo (electrodo de polaridad negativa; ubicado en el piso de la placa) (ver Figura MM-1).

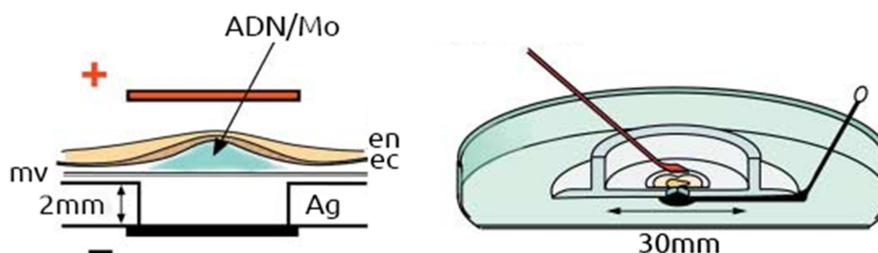


Figura MM-1. Esquema de electroporación de embriones tempranos. Se muestra la disposición de los electrodos, los embriones y la solución a electroporar (ADN o Morfolino). mv: membrana vitelina; en: endodermo; ec: ectodermo; ag: agarosa. Modificado de (Hatakeyama & Shimamura 2008).

Utilizando capilares y bajo lupa estereoscópica se procedió a inyectar la solución a electroporar (detallada más abajo) en el espacio entre la membrana vitelina y el ectodermo dorsal (ver Figura MM-1). Inmediatamente después se colocó el ánodo a una distancia de 2 mm del embrión y se dispuso la generación de los pulsos cuadrados con el electroporador. El protocolo comprendió 4 pulsos cuadrados de 6 V, de 50 milisegundos de duración y una separación temporal entre ellos de 1 segundo. Luego de culminada la sesión los embriones se colocaron en un cámara húmeda y se incubaron hasta el estadio de interés.

En el caso de electroporación de morfolinos, se prepararon soluciones de una

concentración final de 2 mM de morfolino a partir de una solución stock de 4 mM (ver Tabla MM-1). Para la electroporación de plásmidos se trabajó con una concentración final de 1.5-2 µg/ml dependiendo del vector de expresión. A diferencia de la solución de morfolinos, ésta no contiene sacarosa pero sí FastGreen al 0.1%.

Tabla MM-1. Solución de electroporación de morfolinos

Solución de electroporación morfolinos	Volumen
Sacarosa 60%	0,5µl
Agua	3,25µl
Morfolino (4mM)	1,25µl
Vf:	5µl

Oligómeros de morfolino

Se diseñó una secuencia de morfolino (Mo) para el bloqueo de la traducción dirigido contra el extremo 5' del ARN mensajero que codifica para MARCKS (GeneTools, LLC) (ver Tabla MM-2). Tanto este morfolino para MARCKS, como el usado como control (morfolino estándar de GeneTools) están acoplados en su extremo 3' a fluoresceína (FITC) lo que otorga dos ventajas experimentales. Por un lado, le confiere carga negativa al oligómero (necesaria para mejorar la eficiencia en la electroporación) y por otro la posibilidad de evidenciar las células que adquirieron el morfolino. El morfolino control está dirigido contra el pre-ARN mensajero de la beta globina humana, secuencia que no se encuentra en el genoma del pollo.

Tabla MM-2. Secuencias de los oligómeros de morfolino utilizados.

Nombre	Secuencia
MARCKS Mo	5´ TCTTGGAGAACTGGGCACCCATGCT 3´
Control Mo	5´ CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3´

Generación del vector CMV-MARCKS_NF-p2A-GFPCaax (MARCKS-NF)

Utilizamos el sistema “Tol2-Kit” ((Kwan et al. 2007); http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Main_Page) con el objetivo de generar una construcción que posea una variante de MARCKS no fosforilable por PKC en el DE (MARCKS-NF) y además contenga un reportero que permita determinar las células que lo incorporaron. Este kit está basado en el sistema Gateway (ThermoFisher Scientific), el cual combina tres vectores de “entrada” (uno “5'-entry” típicamente conteniendo el promotor, uno “middle-entry” conteniendo la secuencia codificante de interés, y uno “3'-entry” conteniendo un marcador o reportero) en un vector de “destino” por medio de recombinación sitio-específica. Partimos de una construcción que contiene una variante de MARCKS humana en la que las 4 serinas del DE (blancos de fosforilación por PKC) fueron sustituidas por asparaginas (Scarlett & Blackshear 2003), haciendo esta variante de MARCKS incapaz de ser fosforilada por PKC en el DE (MARCKS-NF), a partir de un plásmido donado amablemente por P. Blackshear.

Amplificamos por PCR la secuencia de MARCKS utilizado primers que la flanquean. A su vez, agregamos sitios de corte para las enzimas de restricción NcoI y PstI (ver Tabla MM-3) con el objetivo de insertar la secuencia en el plásmido de entrada “pME-EGFP no stop”, sustituyendo el marco abierto de lectura de GFP por

la secuencia de MARCKS-NF. En naranja se señalan las secuencias de las enzimas de restricción NcoI para el primer 5' y PstI para el 3'.

Tabla MM-3. Primers utilizados

Primer 5'	5' TTA CCATGG GTGCCAGTTCTCCAAGACC 3'
Primer 3'	5' AAAG CTGCAG ACTCCGCCGGCTCGGCGGG 3'

Luego de amplificada la secuencia de MARCKS-NF se procedió al chequeo por electroforesis y posterior purificación, también por electroforesis en gel de agarosa. Al mismo tiempo, digerimos el plásmido de entrada con las enzimas de restricción NcoI y PstI (NEB) y llevamos a cabo la ligación entre el plásmido digerido y la secuencia de MARCKS-NF con la enzima ligasa T4 (NEB). Culminada la ligación, transformamos bacterias DH5 α (ThermoFisher Scientific) con el nuevo plásmido, sembramos dichas bacterias en placas de LB Agar con kanamicina y seleccionamos 5 colonias. Éstas se llevaron a medio líquido generando un stock de cada una de ellas. Posteriormente, purificamos el ADN plasmídico de cada colonia con el kit GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Con el fin de determinar que el producto de ligación sea el buscado, los plásmidos fueron enviados a MacroGen (Corea del Sur) para su secuenciación. Obtenidas las secuencias, seleccionamos una de las colonias que poseía la secuencia de MARCKS-NF sin mutaciones, obteniendo así nuestro "vector middle entry".

La reacción de recombinación fue llevada a cabo entre los siguientes vectores de entrada: - p5E-CMV/SP6, que contiene el promotor CMV; - pME-MARCKS-NF no stop (contiene la secuencia de MARCKS_NF); - p3E-p2A-EGFP2AAX (péptido p2A-secuencia que genera el clivaje co-traduccional en plásmidos bicistrónicos- seguido de GFP de membrana). Como vector de destino utilizamos pDestTol2pA2, el cual contiene las regiones terminales del transposón Tol2, necesarias para la inserción

en el genoma. La reacción de recombinación fue llevada a cabo por la enzima LR Clonasa II Plus de Gateway (ThermoFisher Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. En una reacción de 10 μ L, se colocaron 20 fmol de cada vector de entrada y 20 fmol del vector de destino en buffer Tris-EDTA (TE) 0.01 M (pH 8), junto con 2 μ L de la enzima. Esta mezcla fue incubada toda la noche a 25°C en un termoblock. Al día siguiente, se le agregó 1 μ L de Proteinasa K (según especificaciones del fabricante) y se incubó a 37°C durante 10 minutos para terminar la reacción. El plásmido resultante se muestra en la Figura MM-2. Células competentes OneShot TOP10 (ThermoFisher Scientific) fueron transformadas con 3 μ L de la reacción de recombinación, posteriormente fueron sembradas en medio LB Agar con ampicilina e incubadas toda la noche a 37°C. Una vez cumplido este período, las colonias fueron seleccionadas y puestas a crecer en LB líquido. Al día siguiente, se purificaron los plásmidos mediante miniprep utilizando el kit GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), y se llevó a cabo la confirmación por medio de un ensayo de restricción con la enzima PstI, analizando el producto de digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa 1%.

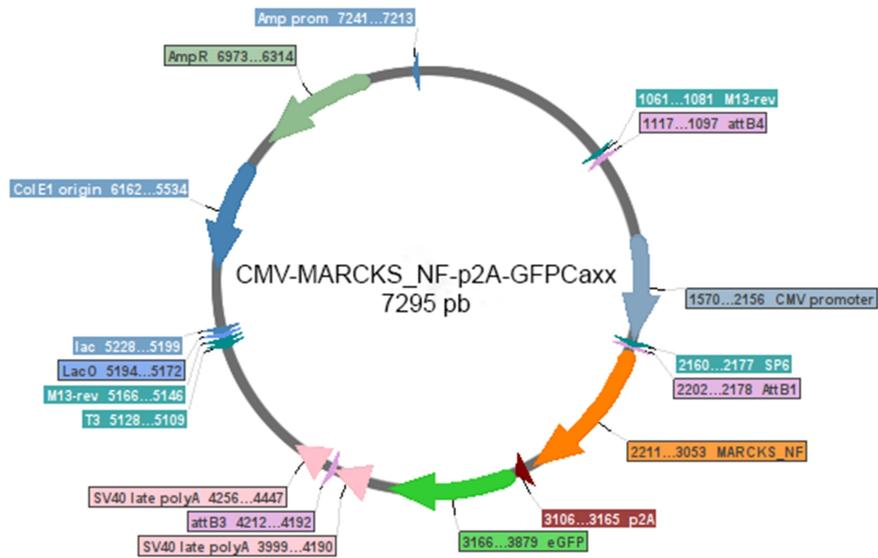


Figura MM-2. Mapa del plásmido obtenido MARCKS-NF

Cortes a congelación

Luego de culminadas las distintas manipulaciones experimentales, los embriones fueron fijados por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS para la inmovilización y la preservación de la estructura interna, y fueron procesados para la realización de criocortes. Para ello se hicieron tres lavados de una hora en PBS para sacar por completo el fijador y luego se realizó la crioprotección del material biológico mediante soluciones de sacarosa 5% y 20% en PBS respectivamente. Las piezas se dejaron en dichas soluciones hasta que se sumergieran por completo. En una etapa posterior se realizó la inclusión de las mismas, el medio de inclusión utilizado fue gelatina al 7.5%, en una solución de sacarosa al 15% en PBS (Stern, 1993). Los bloques fueron realizados en placas de petri de 3.5 cm de diámetro y fue-

ron guardados a 4°C hasta la utilización de los mismos, por un tiempo nunca mayor a 7 días. Al momento del procesamiento, los bloques fueron cortados con una hoja de bisturí para que las superficies fueran lo más paralelas posible y fueron colocados en el soporte del crióstato (Cryocut E Reichert-Jung), utilizando como pegamento el medio de inclusión para congelación Jung (Leica Microsystems). Los bloques fueron congelados rápidamente con nitrógeno líquido y luego colocados por aproximadamente 10 minutos dentro del crióstato hasta que alcanzaran la temperatura a la cual se realizarían los criocortes. Se hicieron cortes transversales en crióstato, a -25°C, de 10 µm de espesor aproximadamente. Los cortes fueron levantados en portaobjetos (previamente lavados y cubiertos con gelatina crómica) y secados a temperatura ambiente. Luego de realizados los cortes, los preparados fueron mantenidos en vasos coplin a 4°C, hasta su posterior utilización.

Inmunofluorescencia indirecta sobre cortes

Para realizar la inmunodetección, primero se extrajo el exceso de gelatina incubando los cortes en un baño de PBS a 38°C, durante media hora. Posteriormente, se realizaron 3 lavados en PBS durante 2 minutos cada uno. Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados mediante una incubación en albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS durante 1 hora, en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes fueron incubados en presencia del anticuerpo primario en cámara húmeda a 37°C, durante 40 minutos. Para ello se utilizaron de 30 a 50 µl de anticuerpo por grupo de cortes. Se utilizaron varios anticuerpos primarios (Tabla MM-4), que fueron diluidos en solución de bloqueo a las concentraciones diversas dependiendo del anticuerpo en cuestión.

Tabla MM-4. Dilución y especificidad de los anticuerpos primarios utilizados en criocortes y/o preparaciones *in toto*.

Anticuerpos	Dilución	Estructura que reconoce	Origen/descripción
Polo52	1/5000	MARCKS total	(Toledo et al. 2013)
Anti-aPKC	1/500	aPKC, marcador de polaridad apical	Santa Cruz Biotech, sc-216
Anti-ZO-1	1/100	ZO-1, marcador de polaridad apical	Sigma-Aldrich, 33-9100
Anti-Miosina IIB	1/250	Proteína motora miosina II	DSHB, CMII 23s
Anti-laminina	1/200	Laminina 1	Sigma-Aldrich, L9393
Anti-pH3	1/200	Histona H3 fosforilada, marcador de células en fase M	Santa Cruz Biotech, sc-8656-R
Anti-GFP	1/200	Proteína fluorescente verde (GFP)	DSHB, DSHB-GFP-12A6
Anti-Tubulina acetilada	1/500	Sub-población tubulina acetilada	Sigma-Aldrich, T-7451
Anti-Caspasa 3 activada	1/500	Marcador de apoptosis	AbCam, ab13847

En todos los casos fueron realizados controles negativos por omisión del anticuerpo primario. Después se realizaron cinco lavados en PBS de 2 minutos para extraer el anticuerpo primario que no fue unido al antígeno. Inmediatamente después, se incubaron los cortes en presencia del anticuerpo secundario (Tabla MM-5) en BSA al 1% en PBS, en las mismas condiciones que el primario.

Tabla MM-5. Dilución y especificidad de los anticuerpos secundarios utilizados en criocortes y/o preparaciones *in toto*.

Anticuerpo	Dilución	Empresa y número de catálogo
Anti-conejo Alexa488	1/1000	ThermoFisher Scientific, A11034
Anti-ratón Alexa555	1/1000	ThermoFisher Scientific, A21424
Anti-conejo Alexa633	1/1000	ThermoFisher Scientific, A21070
Anti ratón TRITC	1/250	Sigma-Aldrich, T5393

En ciertos casos se agregó el marcador de actina filamentosa faloidina conjugado a rodamina (TRITC) en una dilución 1:2000. Posteriormente se realizaron 5 lavados en PBS en los cuales se incluyó el marcador de ADN Hoechst 33342, en una proporción 1:8000 en PBS o verde de metilo (Prieto et al. 2014) en una proporción 1:10000. En ambos casos, los cortes se incubaron con el marcador nuclear durante 10 minutos, a temperatura ambiente, y se realizó un último lavado en PBS, previo al montaje en glicerol 70% en Tris 20 mM pH8. El sellado entre los bordes del cubre y el portaobjetos fue llevado a cabo con esmalte para uñas incoloro.

Inmunofluorescencia indirecta sobre embriones enteros

Una cierta proporción de embriones fue procesada para inmunofluorescencia indirecta *in toto*. Para ello, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS seguidos de una incubación con tripsina al 0.25% en hielo, por 10 minutos, con el objetivo de permeabilizar el material biológico. Luego se llevaron a cabo tres lavados de 30 minutos cada uno en PBS-T (PBS 0.1% Tritón X100) para eliminar por completo la tripsina (así como trazas remanentes de fijador), y continuar el proceso de permeabilización de las muestras. Inmediatamente después, se procedió al bloqueo de los sitios inespecíficos por 12 horas a 4°C en agitación suave utilizando BSA 1%

en PBS-T y suero de cabra al 5%. Terminado el bloqueo, se incubó con el anticuerpo primario pH3, en una dilución 1:200 en BSA al 1% en PBS-T y suero de cabra al 5%, por 12 horas a 4°C en agitación suave. Para eliminar el anticuerpo primario que no se unió a su antígeno se llevaron a cabo 5 lavados de 1 hora en PBS-T. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo, conjugado a Alexa488, en una dilución 1:1000 en BSA al 1% en PBS-T y suero de cabra al 5%. Además, se incluyó el marcador de actina filamentosa faloidina conjugado a TRITC en una dilución 1:2000, y el marcador de ADN verde de metilo en una proporción 1:5000. La incubación fue por 36 horas, en agitación suave y a 4°C. Luego se realizaron 2 lavados en PBS de 2 horas cada uno y los embriones fueron montados en glicerol al 70% en Tris 20mM pH8, en una cámara realizada con cinta aisladora sobre un portaobjetos. El sellado entre los bordes del cubre y portaobjetos fue llevado a cabo con esmalte para uñas incoloro.

Adquisición y análisis de imágenes

La observación de los preparados y posterior adquisición de imágenes fue realizada en un microscopio de barrido láser confocal Leica TCS-SP5 con detectores espectrales y varias líneas de excitación (de 405 a 633 nm). La separación entre secciones ópticas fue optimizada dependiendo de la lente objetiva utilizada: 20X (NA: 0.7, inmersión en aceite) y 63X (NA: 1.4, inmersión en aceite). El procesamiento de las imágenes fue realizado con el programa FIJI (Schindelin et al. 2012). Salvo donde se diga lo contrario, las imágenes mostradas en esta tesis son proyecciones de máxima intensidad a partir de stacks de entre 1 y 3 μm de espesor, compuestos por entre 5 y 10 secciones ópticas, separadas entre 0.2 y 0.5 μm .

Resultados

Estudio del efecto de la activación de PKC sobre néurulas de pollo

A partir de los resultados obtenidos anteriormente (Aparicio 2012), decidimos profundizar los estudios sobre los efectos de la activación de PKC en néurulas de pollo. Observamos que los embriones sometidos a un tratamiento de 3 horas con 5 μ M PMA fueron más cortos en el sentido céfalo-caudal (medido desde el neuroporo anterior hasta el nodo de Hensen) que los embriones control (Figura R-1 A-C). A su vez, al medir la distancia comprendida entre los pliegues neurales utilizando cortes transversales, los embriones tratados presentaron una placa neural más ancha (Figura R-1 D). Al analizar la cantidad de células en fase M, evidenciada por la señal de la histona H3 fosforilada, no observamos cambios drásticos entre los distintos grupos experimentales, tanto en cortes como en preparaciones de embriones enteros (Figura R-1 E-J).

Por otro lado, extendimos el estudio del efecto de la activación de PKC a distintos componentes del citoesqueleto que poseen una expresión diferencial en células polarizadas, o una localización subcelular particular. En ambos casos se pueden utilizar como "marcadores de polaridad". En particular analizamos la distribución de tubulina acetilada, sub-población de tubulina estable particularmente enriquecida en células epiteliales polarizadas (Quinones et al. 2011). En un tejido control (Figura R-2 A-B), los haces de tubulina acetilada se disponen en sentido ápico-basal ocupando toda la extensión de las células pero enriquecidos en la región apical (región donde además se encuentran cilias primarias que presentan tubulina acetilada). Sin embargo, los embriones expuestos a PMA presentan una reorganización de su distribución, encontrándose acumulada en la región central del tejido (puntas de flecha Figura R-2 C).

Figura R-1 Efecto de la activación de PKC sobre la neurulación de embriones en cultivo. **A-B** Efectos sobre la morfología general del embrión. **A** Embrión control (DMSO). **B** Embrión tratado por 3 horas con 5 μ M PMA desde HH8. Se distingue el neuroporo anterior abierto y un pronunciado ensanchamiento de la placa neural que abarca desde el romboencéfalo presuntivo hasta el nivel del primer somite. **C** Efecto del tratamiento con 5 μ M PMA por 3 horas sobre la longitud del embrión (medida desde el extremo cefálico hasta el nodo de Hensen y marcada por la línea negra en A-B); promedio \pm desvío estándar. Test de la t de Student: $p \leq 0,05$. **D** Efecto del tratamiento con 5 μ M PMA sobre el ancho de la placa neural (medida entre los pliegues neurales, sobre cortes transversales); promedio \pm desvío estándar. **E-F** y **H-I** Imágenes confocales a partir de criocortes transversales de placa neural inmunomarcados para detectar Histona H3 fosforilada (pH3; cabezas de flecha) y marcados con verde de metilo (ADN). **E-F** Embrión control. **H-I** Embrión tratado con 5 μ M PMA por 3 horas desde HH8. **G** y **J** Reconstrucciones tridimensionales a partir de planos confocales de embriones de pollo inmunomarcados *in toto* para histona H3 fosforilada (pH3) y con faloidina conjugada a TRITC (Actina-F). **G** Embrión control. **J** Embrión tratado con 5 μ M PMA por 3 horas desde HH8. na: neuroporo anterior; pn: placa neural; s: somite; nh: nodo de Hensen; ec: ectodermo no neural; me: mesodermo; ce: región cefálica; cau: región caudal; izq: lado izquierdo; der: lado derecho; línea punteada: F e I, borde basal del epitelio; G y J, pliegue neural. Barras de escala: A-B, 400 μ m; E-F y H-I, 50 μ m; G y J, 70 μ m.

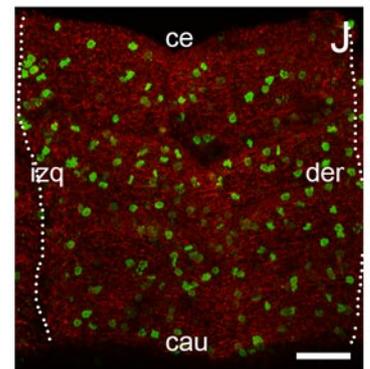
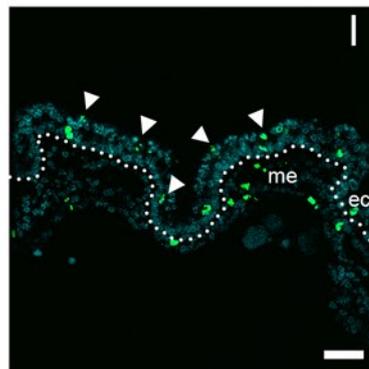
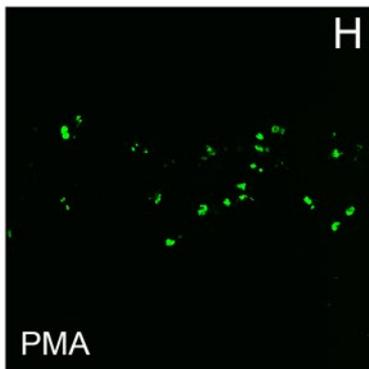
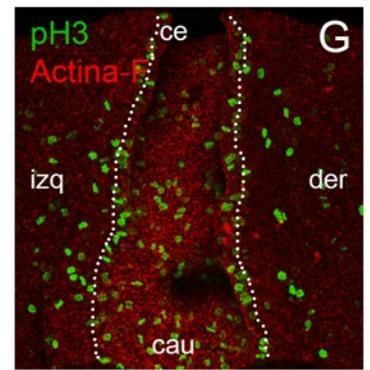
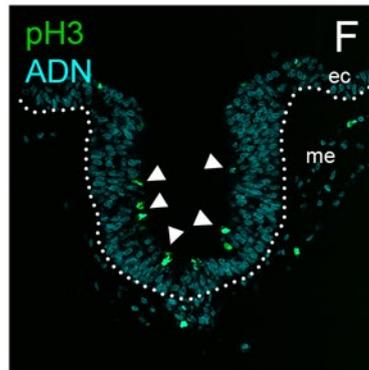
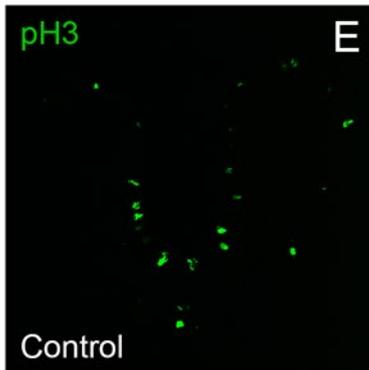
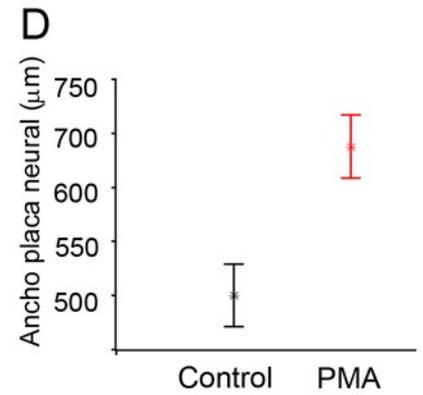
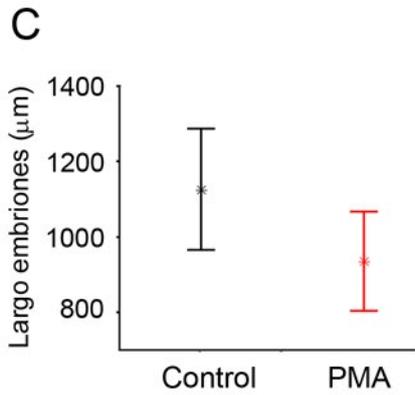
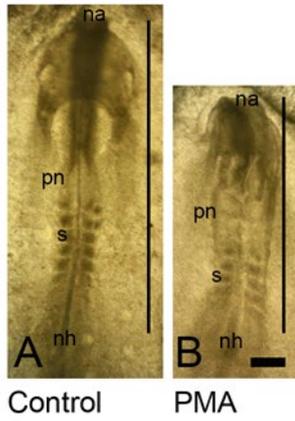
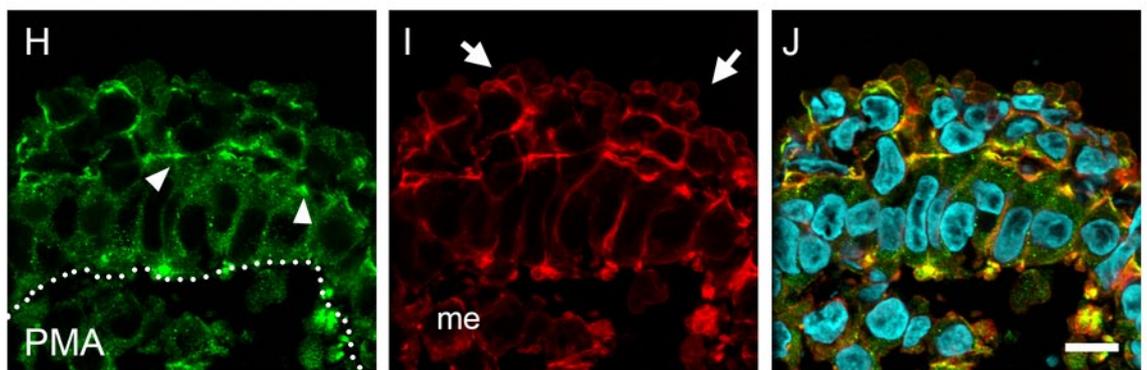
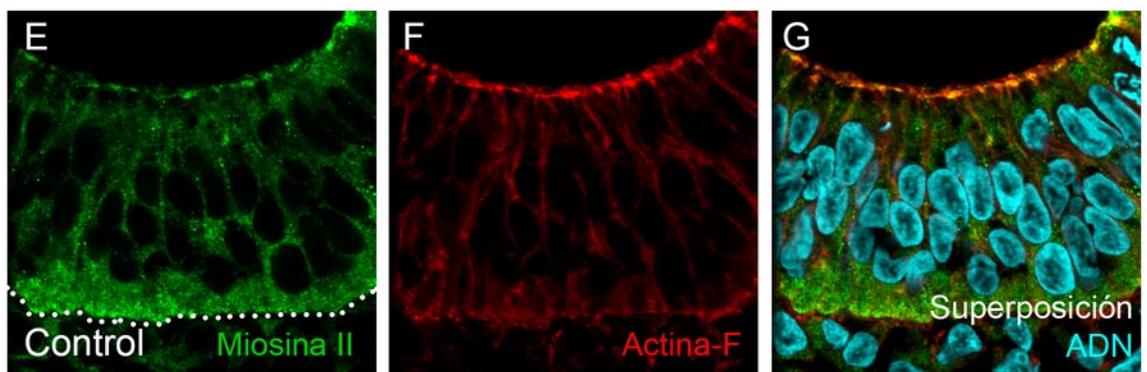
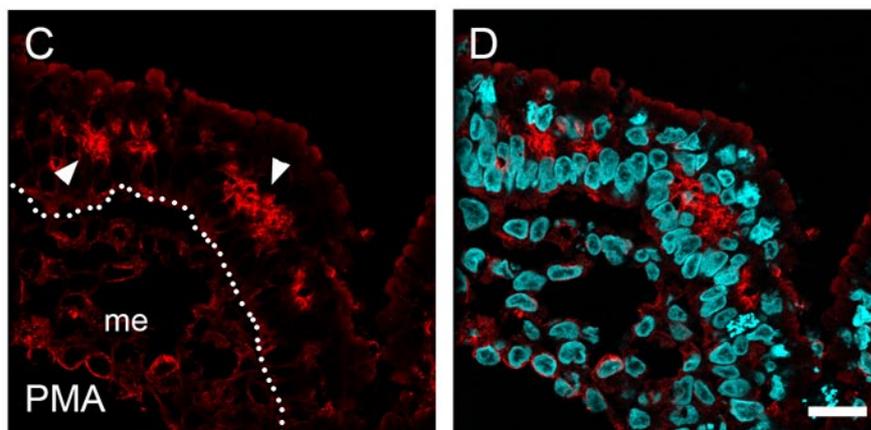
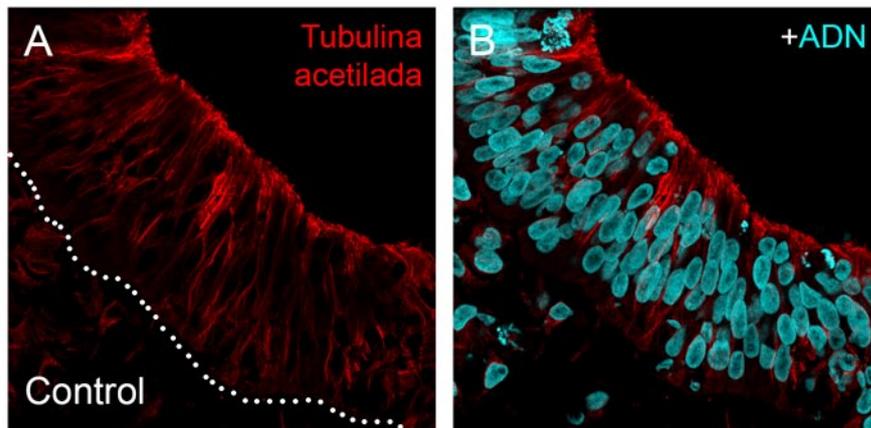


Figura R-2 Distribución de distintos elementos del citoesqueleto en cortes transversales de placa neural de embriones control y tratados con PMA. **A-D** Imágenes confocales a partir de criocortes transversales de placa neural, inmunomarcados para detectar tubulina acetilada y marcados para ADN con verde de metilo **A-B** Embrión control. **C-D** Embrión tratado con 5 μ M PMA por 3 horas desde HH8. **E-J** Imágenes confocales a partir de criocorte transversal de placa neural, inmunomarcado para miosina II, y marcado para filamentos de Actina (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). **E-G** Embrión control. **H-J** Embrión tratado con 5 μ M PMA por 3 horas desde HH8. Cabezas de flecha en C: acumulación de tubulina acetilada en la región central del neuroepitelio; cabezas de flecha en H: haces irregulares de miosina II; flechas en I: protrusiones apicales de citoplasma y núcleos. me: mesodermo; línea punteada: borde basal del neuroepitelio. Barras de escala: A-D, 20 μ m; E-J, 10 μ m.



A su vez, analizamos el efecto sobre el citoesqueleto contráctil de actina y miosina (citoesqueleto que posee una distribución polarizada en las células neuroepiteliales). En los embriones control observamos inmunorreactividad para miosina II tanto en el citoplasma como acumulada en la región apical del neuroepitelio (Figura R-2 E). Los filamentos de actina se encuentran distribuidos en la periferia de las células y acumulados en la región apical, formando el cinturón contráctil con los filamentos de miosina (Figura R-2 F-G). Los embriones expuestos a PMA presentaron protrusiones de citoplasma y núcleos en la región supra-apical (flechas en Figura R-2 I), como fuera previamente descrito (Aparicio 2012). La distribución de los filamentos de actina se vio alterada formando haces irregulares, encontrándose tanto en regiones centrales del tejido como en la periferia de las protrusiones. De modo interesante, este cambio de distribución fue acompañado por los filamentos de miosina, co-localizando ambas proteínas en gran parte del neuroepitelio (puntas de flecha Figura R-2 H).

A partir de estos resultados de acumulación irregular de filamentos de acto-miosina, nos propusimos determinar si el efecto generado por la activación de PKC en la placa neural podría deberse, por lo menos en parte, a una hipercontracción del citoesqueleto de actina y miosina. Para ello, realizamos experimentos de co-tratamiento de néurulas con PMA y un inhibidor de la miosina II, blebistatina (Figura R-3). Los embriones expuestos únicamente a blebistatina presentaron defectos en el cierre del tubo neural (Figura R-3 C), de una manera similar a lo descrito por Kinoshita y colaboradores (Kinoshita et al. 2008). Sin embargo, los embriones expuestos al co-tratamiento (PMA-blebistatina) presentaron efectos similares a los embriones que fueron expuestos al activador de PKC (Figura R-3 H). Estos resultados sugieren que la generación de protrusiones de citoplasma y núcleos en la región supra-apical no se debe a una hipercontracción del

citoesqueleto de acto-miosina.

Por otra parte, encontramos un efecto hasta el momento no descrito para los embriones expuestos con blebistatina. En los pliegues neurales, se observa en embriones control una clara yuxtaposición entre el ectodermo no neural y el neuroepitelio (Figura R-4 A), característica que se conserva en parte en los embriones tratados con PMA (Figura R-4 B). Sin embargo, la exposición a blebistatina generó una separación muy dilatada entre el ectodermo no-neural y el neural en la región en que debería existir aposición. En dichas regiones constatamos la presencia de núcleos picnóticos (Figura R-4 C-D).

Al observar la presencia de protrusiones apicales de citoplasma y núcleos, nos preguntamos si las células expuestas a PMA se encuentran en un proceso de extrusión (separación de la lámina basal y desprendimiento apical). Para demostrarlo, realizamos un marcado en mosaico de células de placa neural con GFP, mediante electroporación de ADN plasmídico en estadio HH4 (12 horas de incubación), y expusimos los embriones a PMA 2 μ M a partir del estadio HH8 por 3 horas (28-30 horas de incubación). Los embriones control electroporados presentaron una expresión de GFP en mosaico que permite observar la morfología de las células y si existe contacto con la lámina basal (puntas de flecha Figura R-5 B). En los embriones tratados con el activador de PKC, observamos que células que expresaban GFP y que presentaban protrusiones de citoplasma y núcleos, no presentaban contacto con la lámina basal, lo que sugiere un proceso temprano de desprendimiento de estas células del tejido (ver puntas de flecha en Figura R-5 E y H). A su vez, encontramos que células en proceso de extrusión son positivas para caspasa 3 activada, marcador de muerte celular programada, indicando que también se encuentran en un proceso de muerte celular (ver Figura R-6).

Figura R-3 Efecto del co-tratamiento de embriones de pollo en neurulación con PMA y blebistatina. Todos los tratamientos tuvieron una extensión de 3 horas desde HH8. **A** Embrión control. **B** Embrión tratado con 2 μ M PMA. **C** Embrión tratado con 200 μ M blebistatina. **D** Embrión bajo co-tratamiento PMA-blebistatina. **E-H** Imágenes confocales a partir de criocortes transversales de placa neural de los embriones mostrados en A-D, marcando Actina filamentosa (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). **E** Embrión control. **F** Embrión tratado con PMA. **G** Embrión tratado con blebistatina. **H** Embrión bajo co-tratamiento PMA-blebistatina. Barras de escala: A-D, 400 μ m; E-H, 20 μ m.

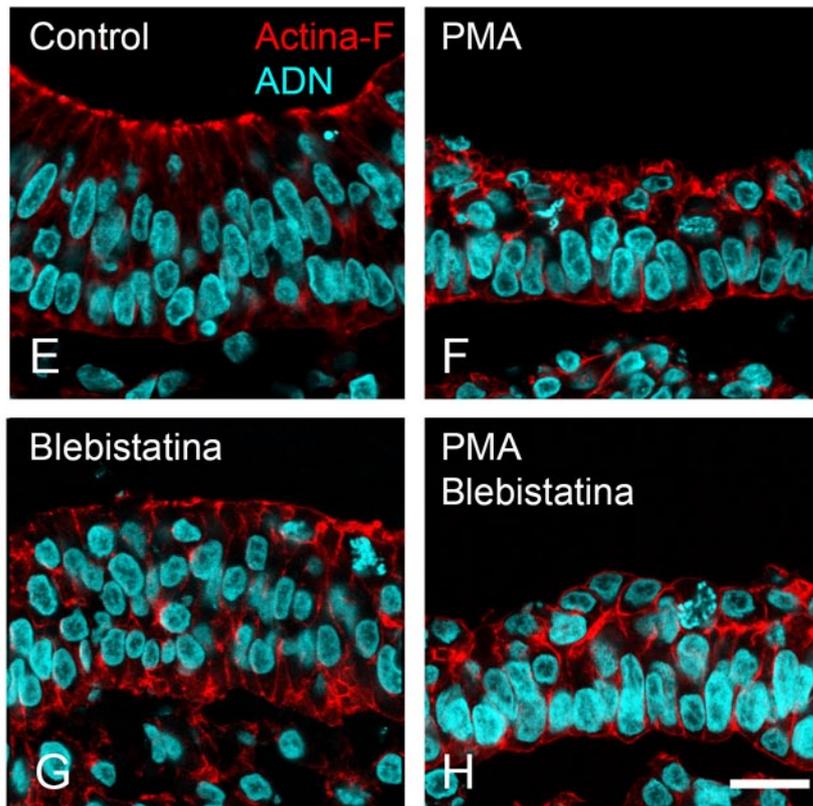
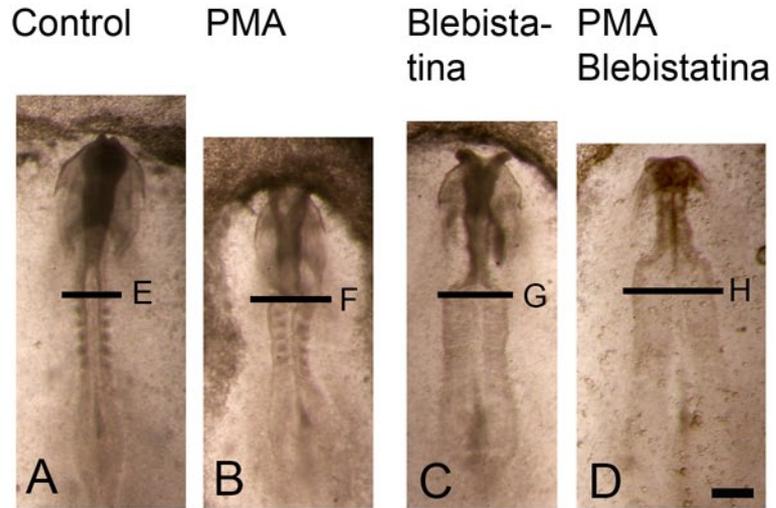


Figura R-4 Morfología de los pliegues neurales de embriones de pollo tratados con PMA y blebistatina. Todos los tratamientos tuvieron una extensión de 3 horas desde HH8. Imágenes confocales a partir de criocortes transversales de pliegues neurales, inmunomarcados para detectar laminina y marcados para Actina filamentosa (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). **A** Embrión control. **B** Embrión tratado con 2 μ M PMA. **C-D** Ejemplos de dos embriones tratados con 200 μ M blebistatina. ec: ectodermo no neural; me: mesodermo; pn: placa neural. Barras de escala: A, C y D, 20 μ m; B, 10 μ m.

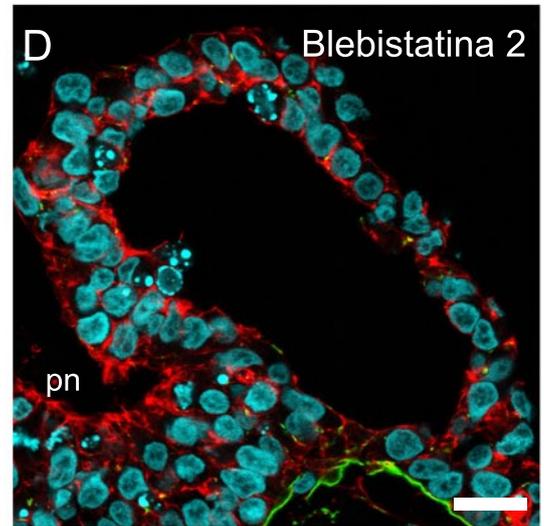
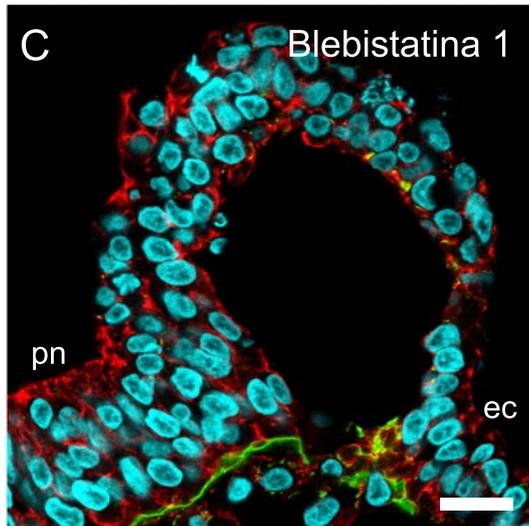
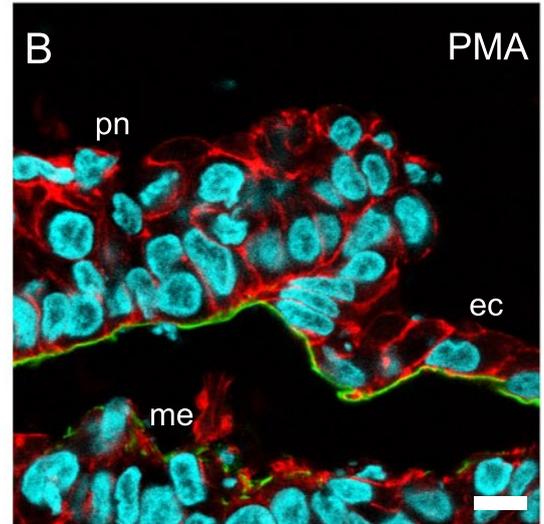
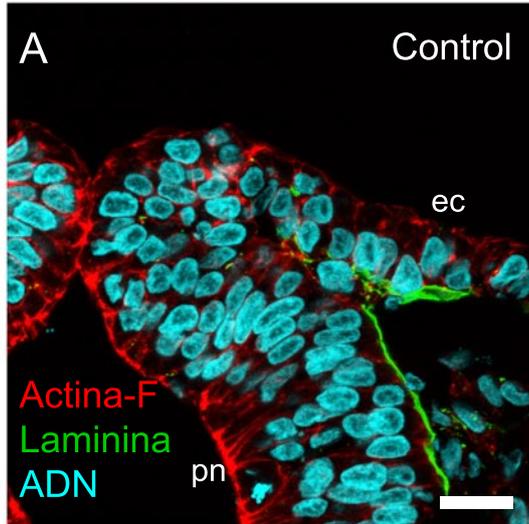


Figura R-5 Pérdida de contacto con la lámina basal de células neuroepiteliales al activar PKC. Imágenes confocales a partir de criocortes transversales de placa neural de embriones que expresan GFP en mosaico (por electroporación de ADN plasmídico en HH4) y expuestos a 2 μ M PMA por 3 horas desde HH8. Inmunomarcado para detectar GFP y laminina, marcado de Actina filamentosa (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). **A-C** Embrión control. **D-I** Ejemplos de dos embriones tratados con PMA. Cabezas de flecha en B: célula elongada que contacta la superficie basal; cabezas de flecha en E y H: células desplazadas apicalmente y que no tienen un contacto visible con la superficie basal. Barra de escala: 10 μ m.

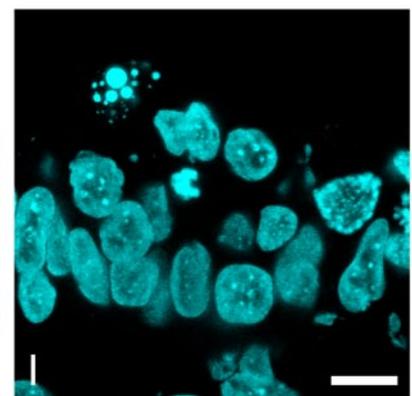
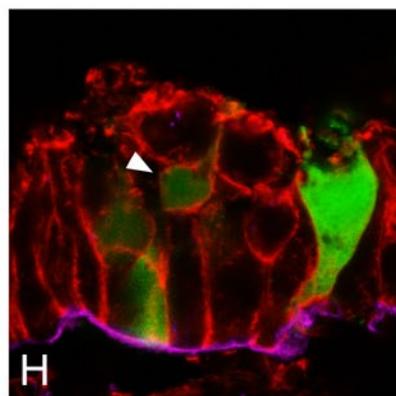
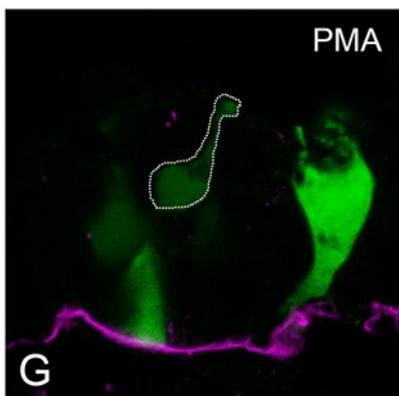
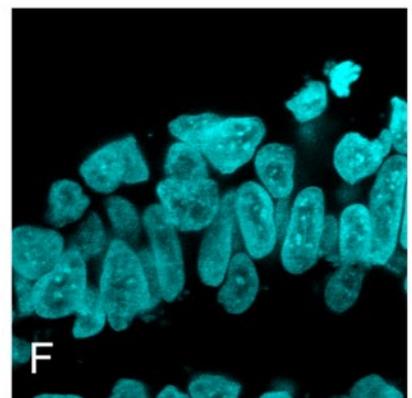
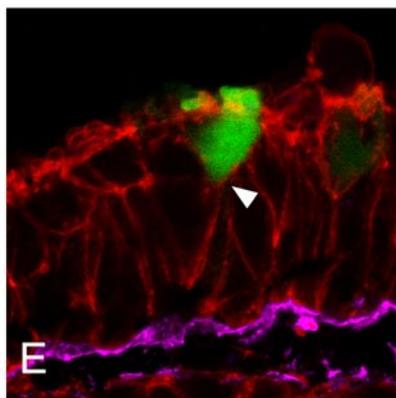
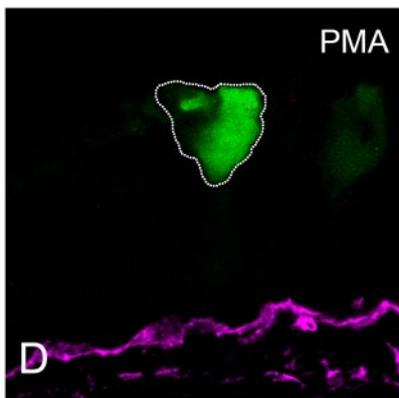
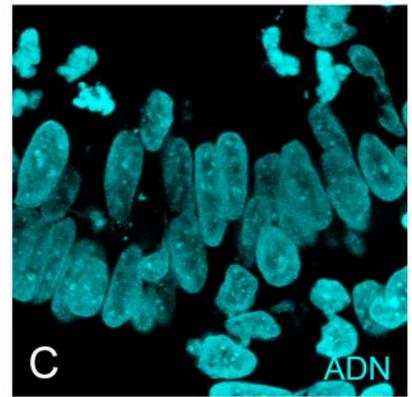
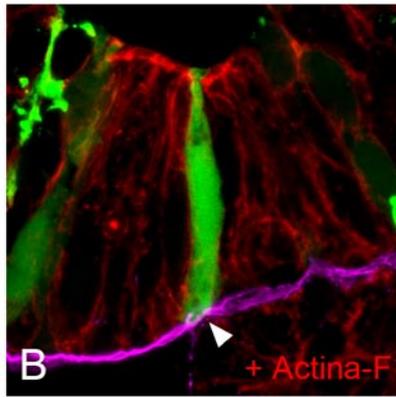
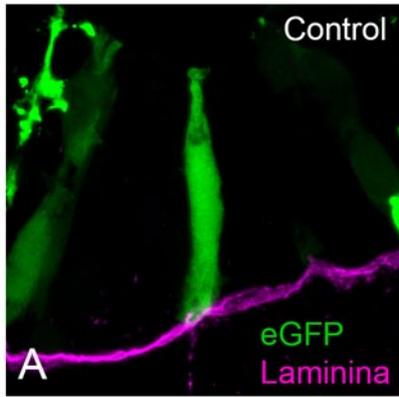
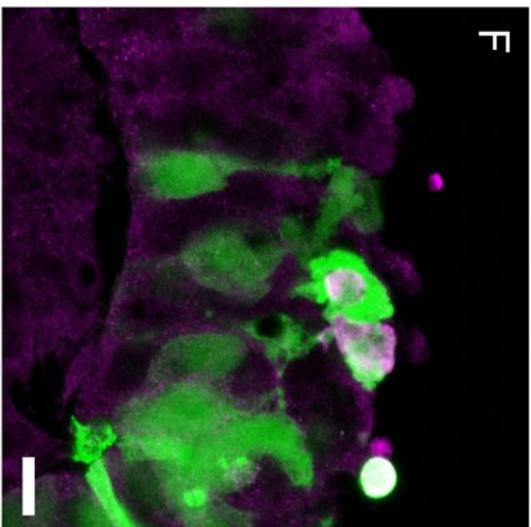
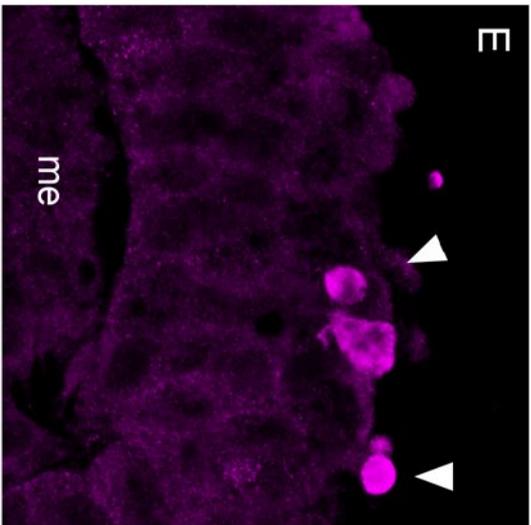
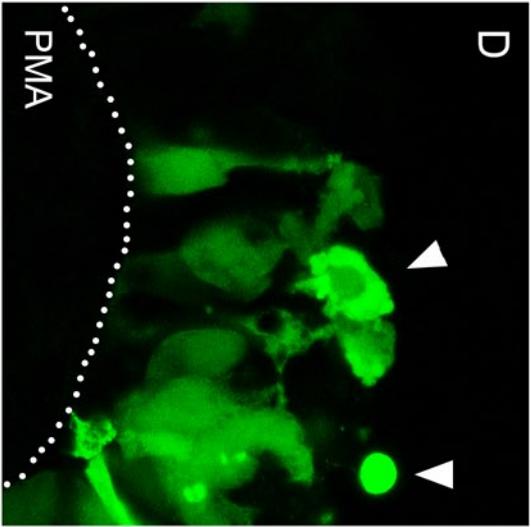
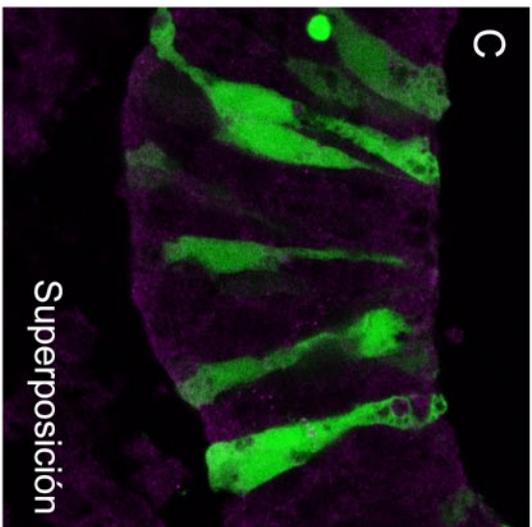
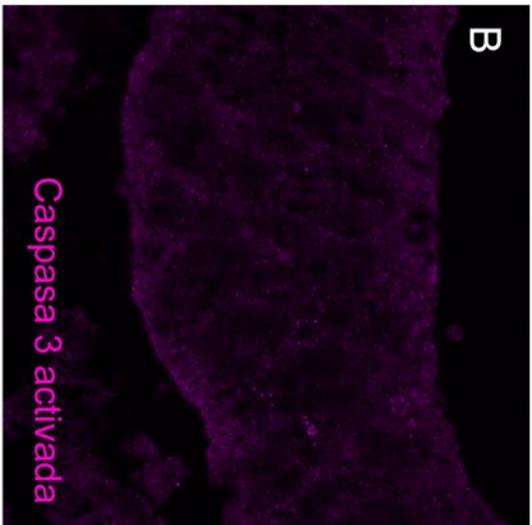
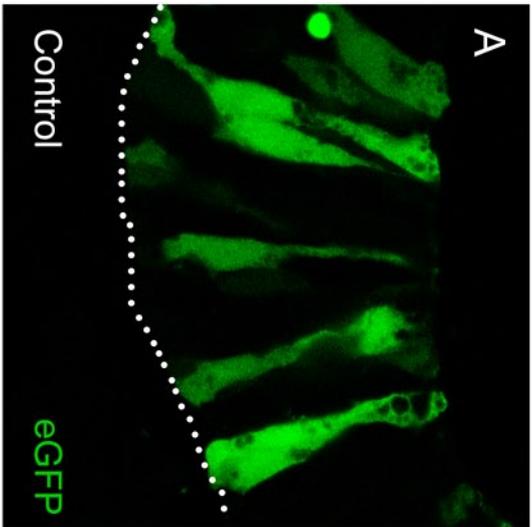


Figura R-6 Pérdida de contacto con la lámina basal y muerte celular de células neuroepiteliales al activar PKC. Imágenes confocales a partir de criocortes transversales de placa neural de embriones que expresan GFP en mosaico (por electroporación de ADN plasmídico en HH4) y expuestos a 2 μ M PMA por 3 horas desde HH8. Inmunomarcado para detectar GFP y caspasa 3 activada. **A-C** Embrión control. **D-F** Embrión tratado con PMA. Cabezas de flecha: células separadas de la superficie basal y positivas para Caspasa 3 activada; me: mesodermo; línea punteada: borde basal del neuroepitelio. Barra de escala: 10 μ m.



Relación entre la integridad del citoesqueleto de actina y la localización subcelular de MARCKS

Con el fin de estudiar la posible relación entre los filamentos de actina y la localización subcelular de MARCKS en las células neuroepiteliales, tratamos embriones de pollo en cultivo con citocalasina D. Luego de una puesta a punto de la dosis y tiempo de exposición a la droga, desarrollamos un protocolo (10 $\mu\text{g/ml}$ de citocalasina D por 30 minutos) que genera defectos en el cierre del tubo neural (ver Figura R-7 B) y permite el desensamblaje parcial del anillo de actina apical, observado como una señal de actina discontinua a lo largo de la región apical del epitelio (Figura R-7 G). A su vez, este protocolo no causa muerte celular (evidenciada por la ausencia de núcleos picnóticos) (Figura R-7 H). A bajo aumento, no observamos una pérdida de la localización subcelular de MARCKS en los embriones tratados con citocalasina D (Figura R-7 F), sin embargo esto podría deberse a que el desensamblaje del cinturón de actina no es completo y MARCKS podría mantenerse asociada a acúmulos de actina. Para resolver esto, observamos a gran resolución la región apical del neuroepitelio (Figura R-8). En embriones sin tratamiento observamos que MARCKS se encuentra parcialmente co-localizando con los haces de actina apical (Figura R-8 A-C), pero también se encuentra en regiones más apicales (puntas de flecha en Figura R-8 C) seguramente asociada a la membrana apical, y en regiones donde, no hay cables de actina-F (flecha en Figura R-8 C). En los embriones tratados con citocalasina D MARCKS se encuentra parcialmente co-localizando con los acúmulos de actina, pero también se encuentra en regiones donde no hay filamentos de actina, de igual manera que en la situación sin tratamiento (ver flechas en Figura R-8 EFI).

En resumen, encontramos que MARCKS se encuentra parcialmente co-

localizando con los haces de actina apical pero también se encuentra en regiones sin haces de actina, a su vez, su localización subcelular no depende de la integridad de los filamentos de actina.

Figura R-7 Efecto del tratamiento de embriones de pollo en neurulación con citocalasina D. **A-B** Efectos sobre la morfología general del embrión. **A** Embrión control (DMSO). **B** Embrión tratado con 10 µg/ml citocalasina D por 30 minutos desde HH8. **C-H** Imágenes confocales a partir de criocortes transversales panorámicos de placa neural, inmunomarcados para detectar a la proteína MARCKS y marcados para Actina filamentosa (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). **C-E** Embrión control. **F-H** Embrión tratado con 10 µg/ml citocalasina D por 30 minutos desde HH8. me: mesodermo; nt: notocorda; pn: placa neural; ec: ectodermo no neural; en: endodermo. Barras de escala: A-B, 400 µm; C-H, 50 µm.

Control Citocalasina

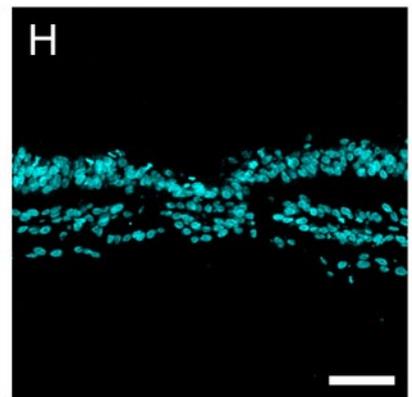
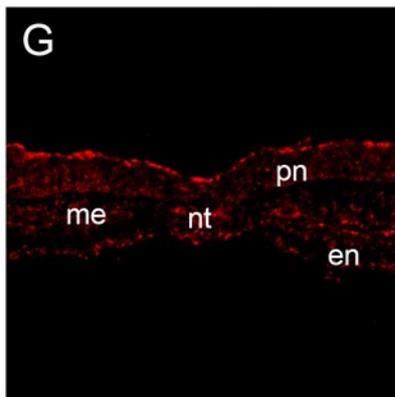
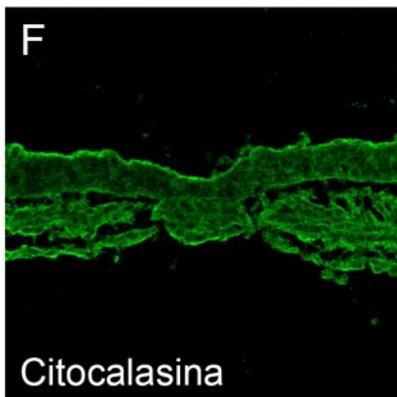
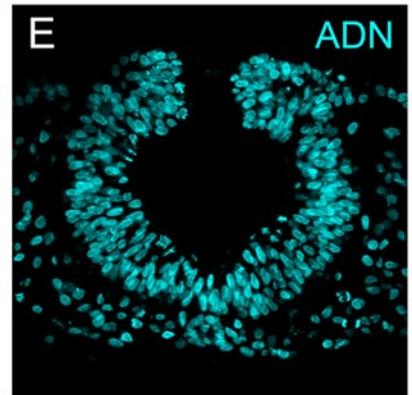
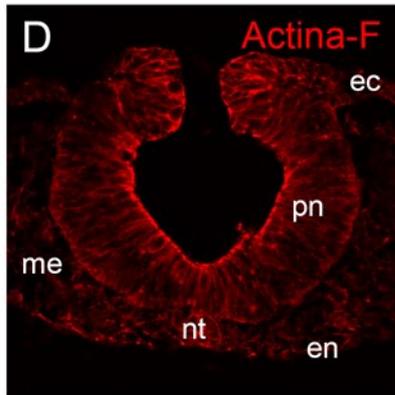
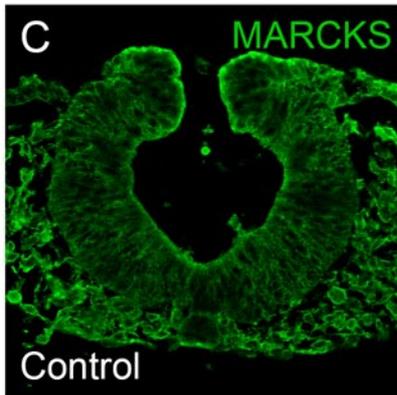
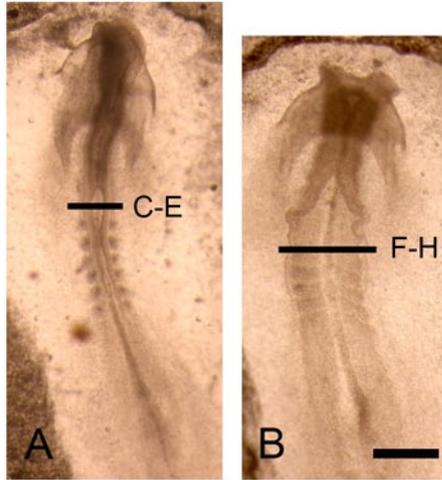
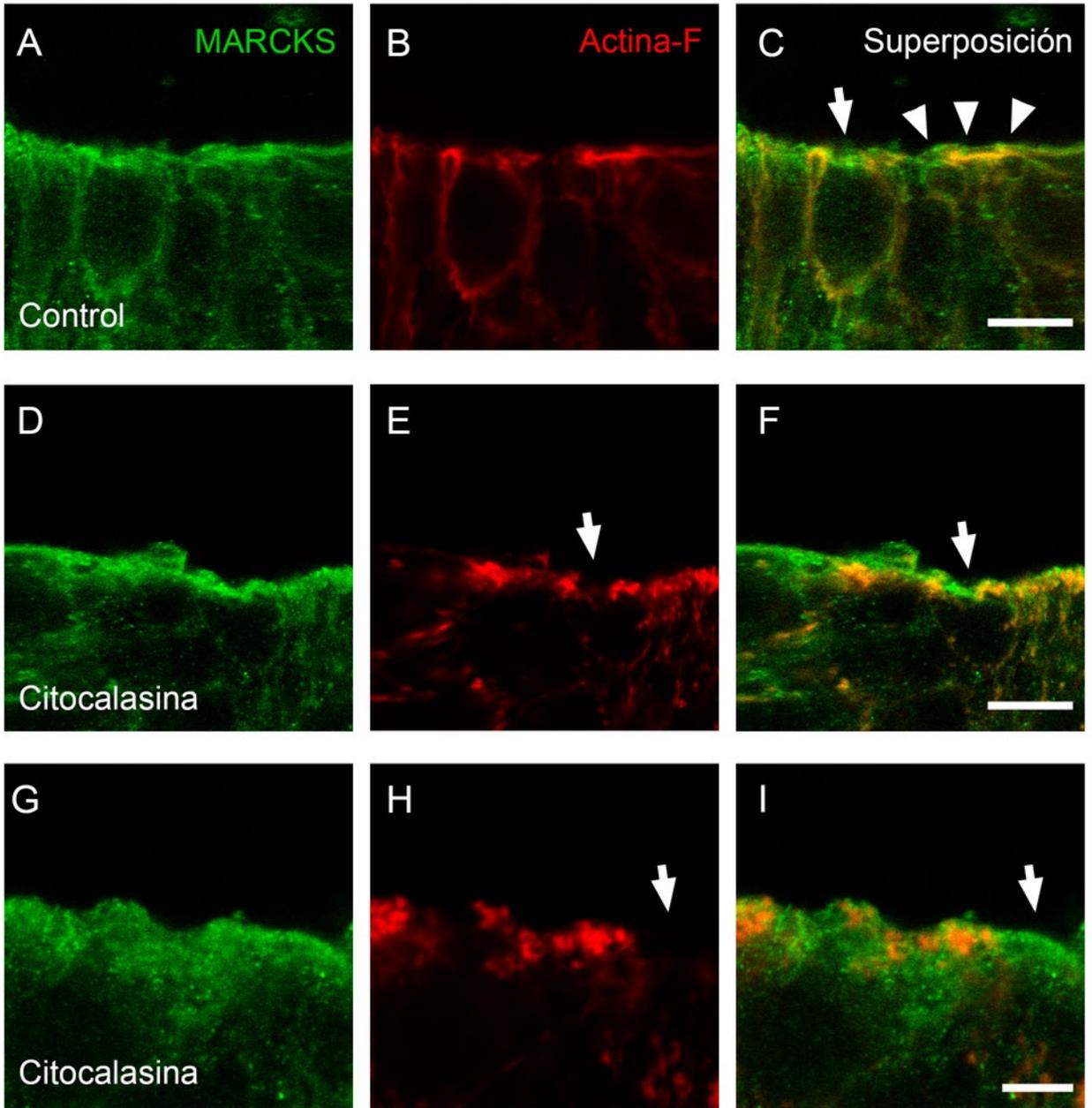


Figura R-8 Cortes transversales de placa neural de embriones tratados con citocalasina D. Imágenes confocales de alta resolución de la región apical del neuroepitelio, a partir de criocortes transversales. Inmunomarcado para detectar a la proteína MARCKS y marcado de filamentos de Actina con faloidina-TRITC **A-C** Embrión control. **D-I** Distintas secciones de embrión tratado con 10 µg/ml citocalasina D por 30 minutos desde HH8. Cabezas de flecha en C: acumulación de MARCKS en la membrana apical; flecha en C: MARCKS acumulada en regiones sin haces de Actina; flecha en E, F e I: acumulación de MARCKS en regiones sin haces de Actina. Barras de escala: A-F, 10 µm; G-I, 5 µm.



Efecto del *knock-down* de MARCKS en células neuroepiteliales

Estudiamos el efecto del silenciamiento de MARCKS en néurulas de pollo. Para ello electroporamos oligómeros de morfolino antisentido que bloquean la traducción de su ARNm.

Electroporamos embriones en estadio HH4, microinyectando la solución a electroporar en la región anterior al nodo de Hensen, células que tendrán como destino la formación del tubo neural (Sánchez-Arrones et al. 2009). Luego de finalizado el protocolo de electroporación, los embriones se mantuvieron en cultivo (entre 18 y 20 horas aproximadamente) hasta llegar al estadio de interés (HH8). Los embriones electroporados con el morfolino control no presentaron defectos en la morfogénesis del tubo neural como se puede observar en la Figura R-9 A-C. Analizamos la morfología del neuroepitelio evaluando tanto la posición de los núcleos como la distribución de los filamentos de actina. En términos generales, no observamos cambios en los embriones electroporados en comparación con situaciones sin ningún tratamiento como las anteriormente descritas (Figura R-9 D-H). Por lo tanto, el morfolino control no genera efectos fenotípicos detectables en las concentraciones utilizadas.

Comenzamos analizando si efectivamente el morfolino contra MARCKS disminuía la expresión de la proteína. Para ello medimos intensidad de fluorescencia utilizando el anticuerpo Polo52 en embriones electroporados con morfolino. Medimos sobre el mismo corte la señal de MARCKS en 5 células que incorporaron el morfolino y 5 que no lo hicieron. Luego promediamos los valores obtenidos y normalizamos en función de las células sin morfolino. Encontramos que las células con morfolino presentaban una disminución de más de un 60% de intensidad de fluorescencia con respecto al control (Figura R-10 D). Cuando analizamos el efecto

de la electroporación del morfolino para MARCKS en HH4, observamos un defecto sobre el plegamiento de la placa neural en las regiones donde fue incorporado el morfolino (Figura R-10 A-C, puntas de flecha en A). A su vez, encontramos una masa celular ectópica positiva para el morfolino en el surco neural (flechas en Figura R-10 C). Al analizar secciones de placa neural, observamos extrusiones de núcleos hacia la región apical del neuroepitelio (puntas de flecha en Figura R-10 I). Pudimos constatar una disposición irregular de los filamentos de actina tanto en la región apical como en regiones basales del tejido, en células positivas para FITC (puntas de flecha en Figura R-10 F).

Al observar la extrusión celular extendida al electroporar en estadios tempranos del desarrollo, decidimos realizar ensayos de electroporación desde el estadio HH6 (6 a 8 horas antes del estadio de análisis, HH8) con el objetivo de observar eventos anteriores al desprendimiento celular. Los embriones electroporados con el morfolino control no presentaron defectos, tanto en el proceso de plegado de la placa como en la morfología general del tejido (Figura R-11), del mismo modo que los embriones electroporados en HH4. Sin embargo, los embriones electroporados con el morfolino de MARCKS mostraron defectos en el plegado de la placa (ver puntas de flechas en Figura R-12 A y recuadro C'). Al analizar secciones de surco neural, encontramos protrusiones apicales que contienen actina filamentosa (flechas en Figura R-12 E) y núcleos (puntas de flecha en R-12 E).

Figura R-9 Efecto del *knock-down* temprano de MARCKS sobre néurulas de pollo I. Embrión electroporado desde estadio HH4 con morfolino control. **A-C** Morfología general del embrión y localización de la región de incorporación del morfolino. **D-H** Imágenes confocales a partir de criocorte transversal de placa neural de embrión electroporado con 2 mM de morfolino control desde HH4 hasta HH8. Se observan las células que adquirieron el morfolino (FITC), más el marcado de filamentos de Actina (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). Barras de escala: A-C, 400 μm ; D-H, 20 μm .

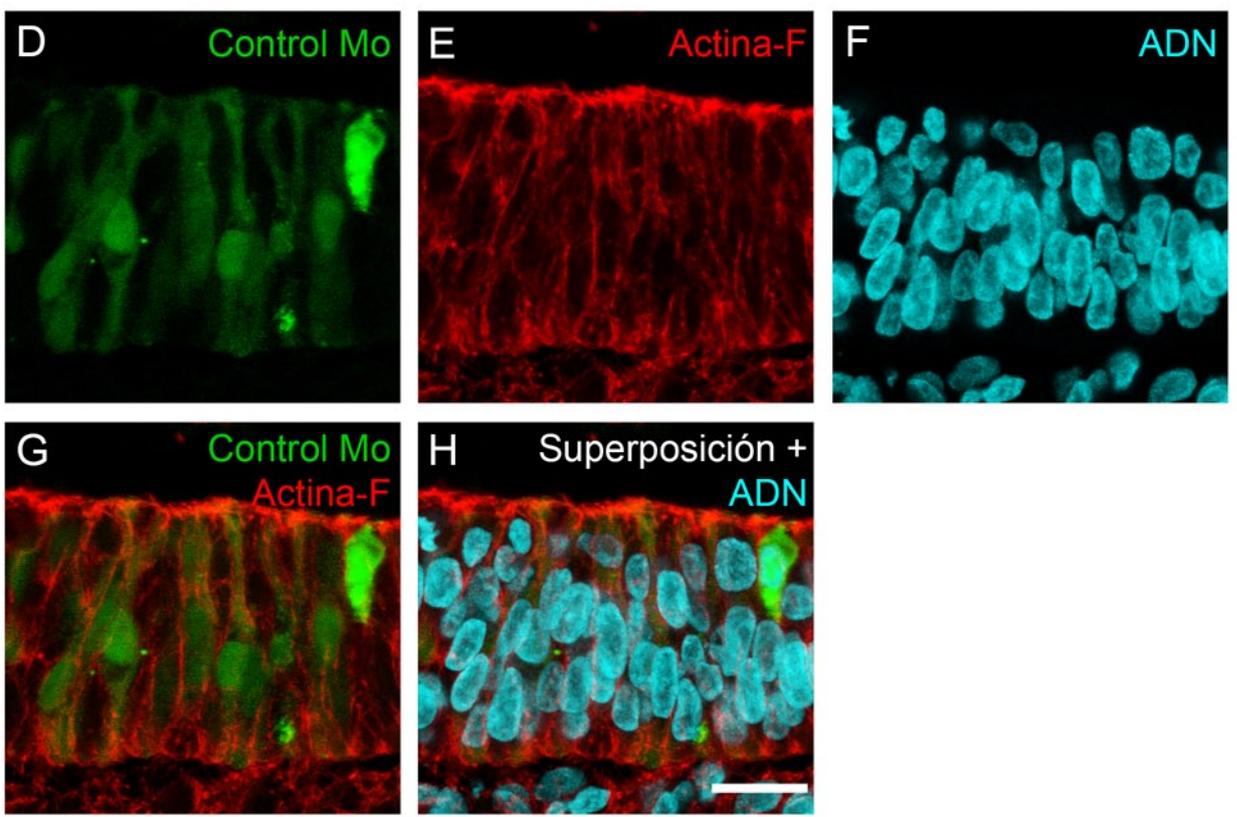
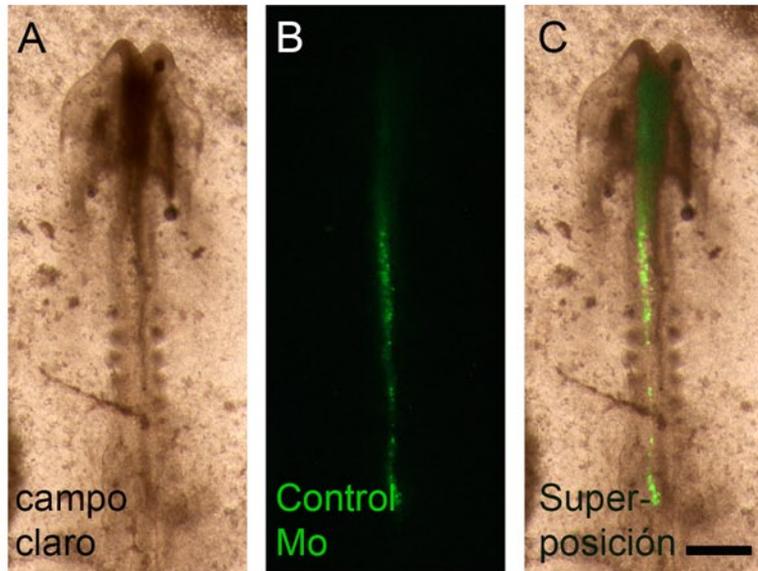


Figura R-10 Efecto del *knock-down* temprano de MARCKS sobre néurulas de pollo II. Embrión electroporado desde estadio HH4 con morfolino anti MARCKS. **A-C** Morfología general del embrión y localización de la región de incorporación del morfolino. **D** Comparación de la intensidad de fluorescencia de una inmunodetección de MARCKS total (anticuerpo Polo52) en células con o sin morfolino, en un embrión electroporado con morfolino anti MARCKS. La señal de fluorescencia de las células con morfolino fue normalizada con respecto a las células sin morfolino (promedio \pm desvío estándar). **E-I** Imágenes confocales a partir de criocorte transversal de placa neural de embrión electroporado con 2 mM de morfolino anti MARCKS desde HH4 hasta HH8. Se observan las células que adquirieron el morfolino (FITC), más el marcado de filamentos de Actina (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). Cabezas de flecha en A: plegado irregular de la placa neural; flechas en C: masa celular ectópica en el surco neural, positiva para morfolino; cabezas de flecha en F: haces irregulares de filamentos de Actina en regiones apicales y basales; cabezas de flecha en I: células aisladas en la región apical de la placa neural. Barras de escala: A-C, 400 μ m; E-I, 20 μ m.

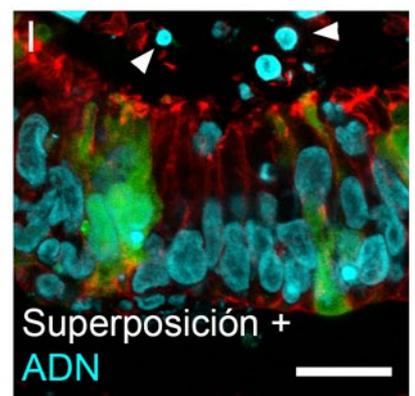
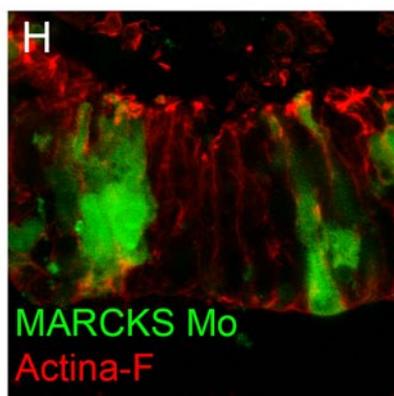
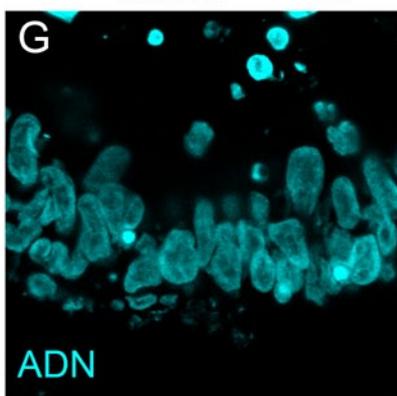
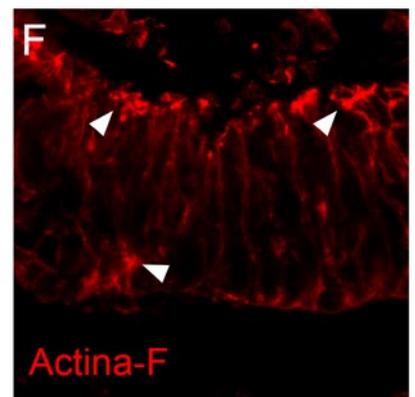
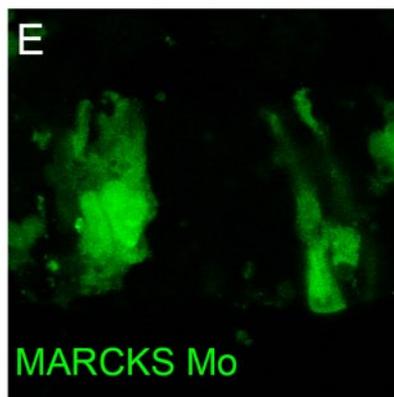
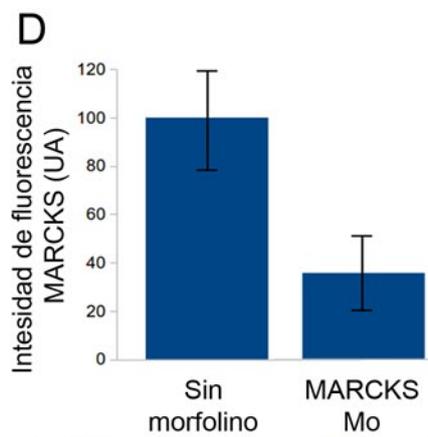
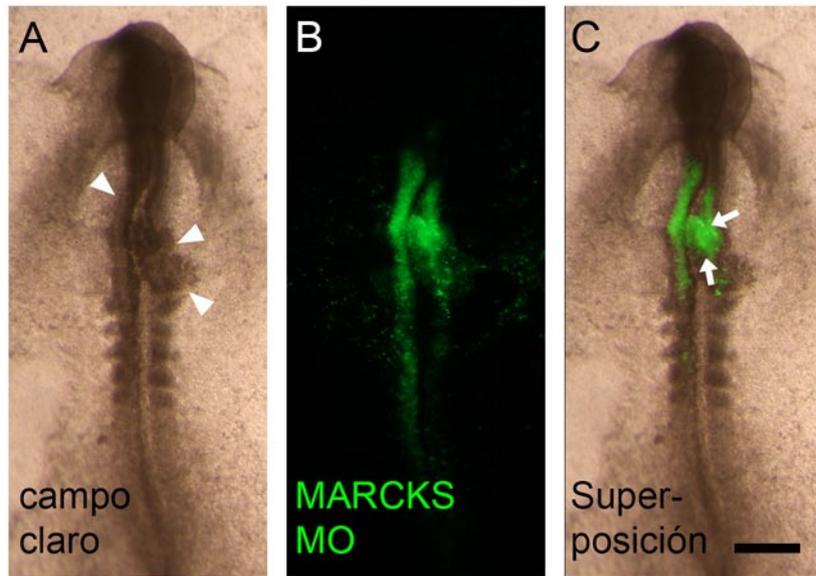


Figura R-11 Efecto del *knock-down* tardío de MARCKS sobre néurulas de pollo I. Embrión electroporado desde estadio HH6 con morfolino control. **A-C** Morfología general del embrión y localización de la región de incorporación del morfolino. Imágenes confocales a partir de criocorte transversal de placa neural de embrión electroporado con 2 mM de morfolino control desde HH6 hasta HH8. Se observan las células que adquirieron el morfolino (FITC), más el marcado de filamentos de Actina (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). Barra de escala: A-C, 400 μm ; D-H, 15 μm .

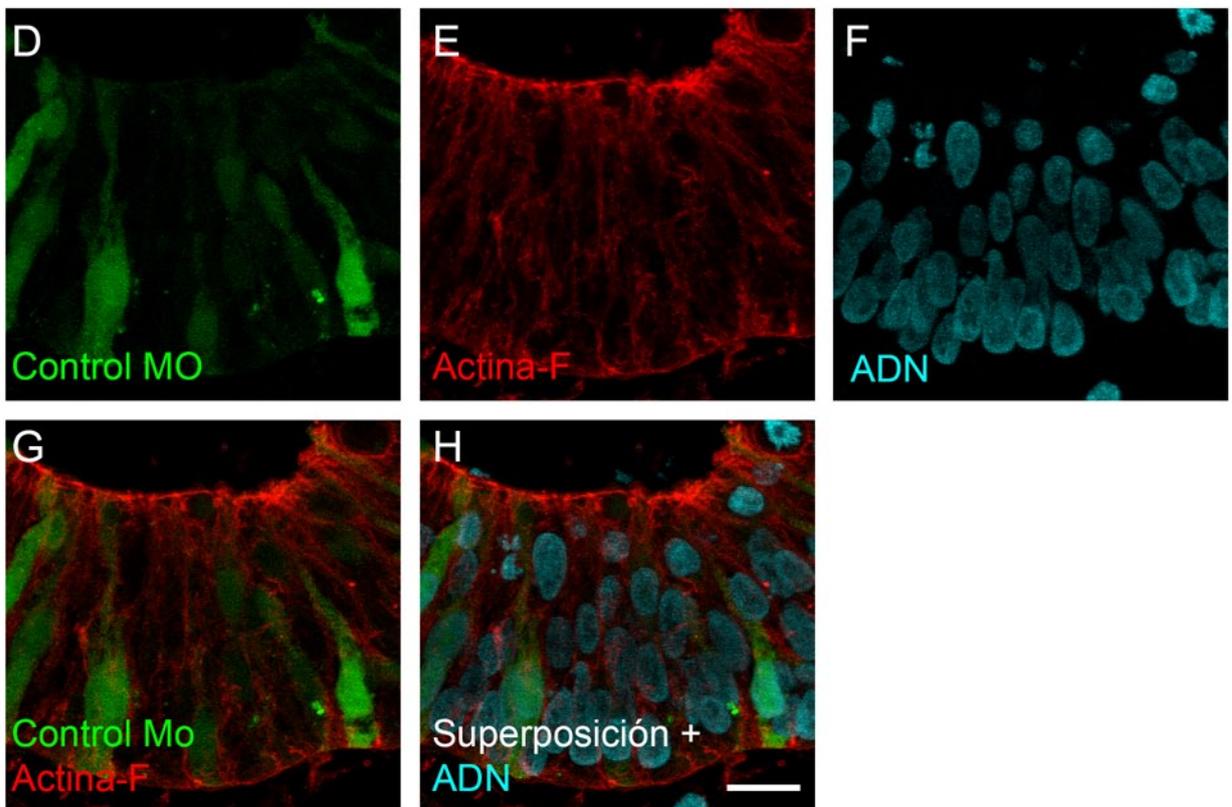
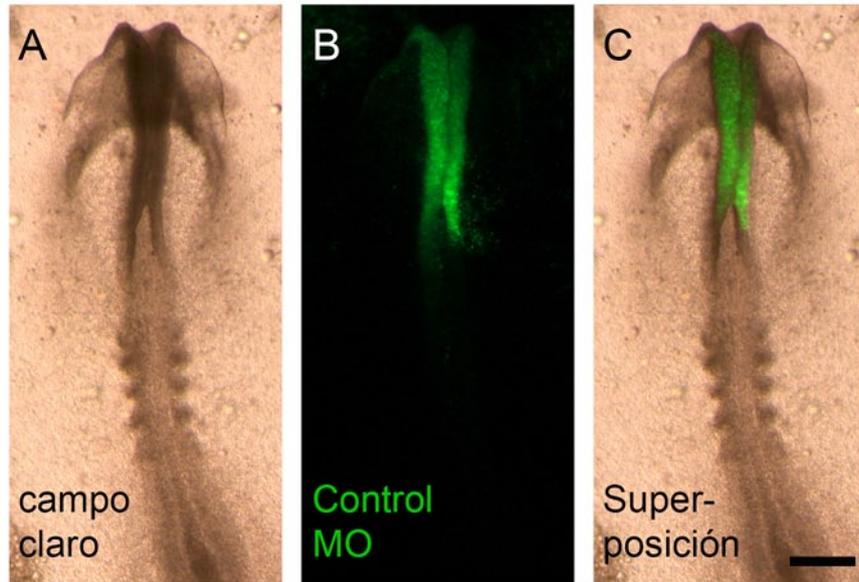
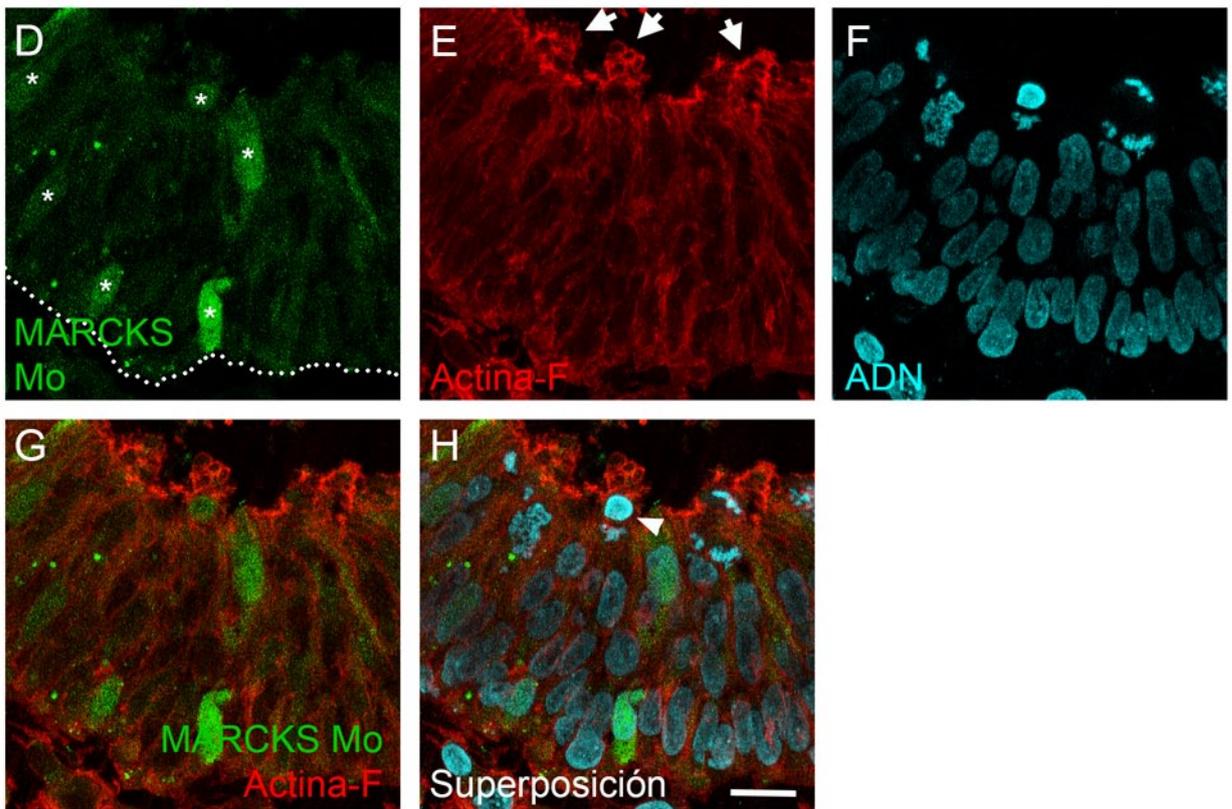
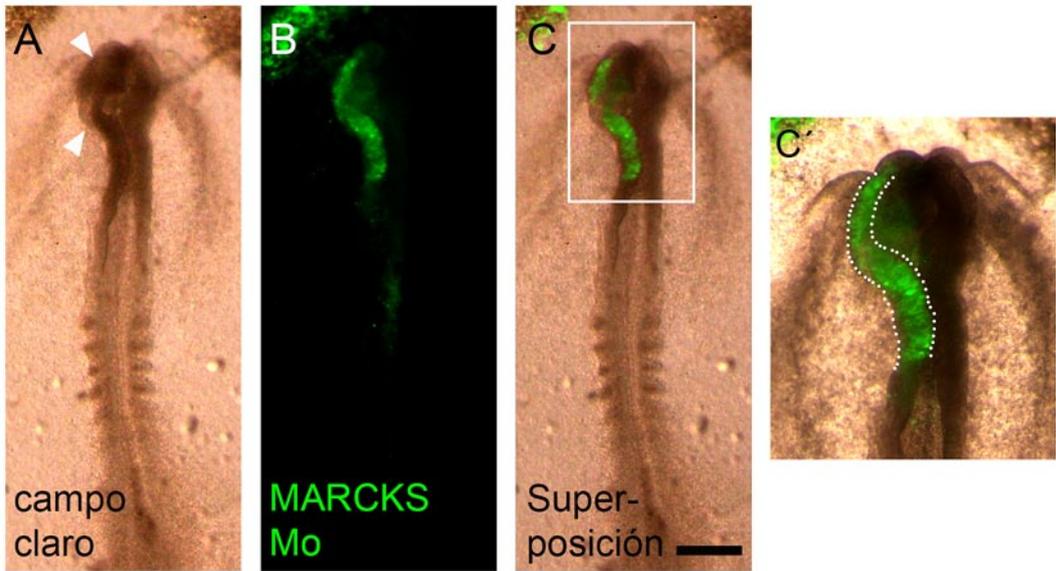


Figura R-12 Efecto del *knock-down* tardío de MARCKS sobre néurulas de pollo II. Embrión electroporado desde estadio HH6 con morfolino anti MARCKS. **A-C** Morfología general del embrión y localización de la región de incorporación del morfolino. Imágenes confocales a partir de criocorte transversal de placa neural de embrión electroporado con 2 mM de morfolino anti MARCKS desde HH6 hasta HH8. Se observan las células que adquirieron el morfolino (FITC; asteriscos en D), más el marcado de filamentos de Actina (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). Cabezas de flecha en A: región de placa neural abierta; cabeza de flecha en H: núcleo picnótico supra-apical; flechas en E, regiones de protrusión citoplásmica; línea punteada: borde basal del epitelio. Barras de escala: A-C, 400 μm ; D-H, 15 μm .



Contribución de MARCKS al efecto generado por la activación de PKC

Con el fin de determinar el rol de la fosforilación de MARCKS en el efecto obtenido por la activación de PKC por ésteres de forbol en la placa neural, electroporamos una construcción plasmídica que posee una variante de MARCKS incapaz de ser fosforilada por PKC.

Electroporamos embriones en estadio HH4 con la construcción MARCKS-NF y los mantuvimos en cultivo hasta el estadio HH8, en ese momento expusimos los embriones a PMA 1 μ M o vehículo por un período de 3 horas. En el caso del grupo de embriones sin electroporación de ADN plasmídico, los embriones fueron sometidos al mismo protocolo de electroporación pero sin microinyección de ADN. Posteriormente fueron mantenidos en cultivo hasta HH8 y expuestos a PMA 1 μ M por 3 horas.

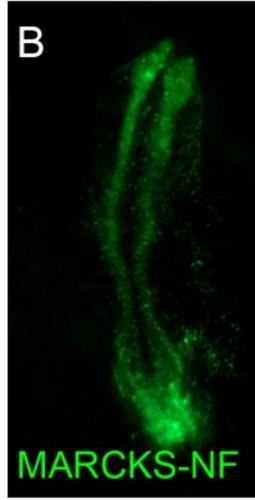
A nivel macroscópico, los embriones electroporados con la construcción (evidenciada por la expresión de GFP) y expuestos a vehículo no cerraron el tubo neural a nivel de la región cefálica, como se puede observar en la Figura R-13 A-C. Los embriones sin plásmidos pero expuestos a PMA tuvieron defectos en el pliegue de la placa neural al nivel del romboencéfalo presuntivo (puntas de flecha Figura R-13 D), defectos anteriormente descritos ante la activación de PKC. Por último, los embriones electroporados con la construcción MARCKS-NF y luego expuestos a PMA también presentaron defectos en el cierre del tubo neural a nivel del romboencéfalo y médula espinal presuntiva (ver puntas de flecha en Figura R-13 E).

A continuación evaluamos (al igual que en los experimentos de *knock-down* con morfolinis) la posición de los núcleos así como la distribución de los filamentos

de actina de la placa neural. Para el caso de los embriones que expresaron la construcción y fueron expuestos a vehículo no encontramos núcleos en posiciones ectópicas, pero sí constatamos la presencia de haces irregulares de actina (puntas de flecha en Figura R-14 B). Los embriones expuestos únicamente a PMA presentaron las ya descritas protrusiones de citoplasma y núcleos en la región apical (puntas de flecha en Figura R-14 E). Por último, los embriones que poseían expresión de la construcción y que fueron expuestos a PMA no presentaron protrusiones apicales de filamentos de actina ni núcleos ectópicos (Figura R-14 F-H). Sin embargo, presentaron núcleos picnóticos en las regiones con mayor expresión de la construcción (ver puntas de flecha en Figura R-14 H).

Figura R-13 Contribución de MARCKS al efecto de la activación de PKC en embriones de pollo I. Morfología de embriones electroporados en HH4 con ADN plasmídico que expresa la construcción MARCKS-NF y luego sometidos a 1 μ M PMA. **A-C** Embrión electroporado con MARCKS-NF y luego sometido a vehículo por 3 horas desde HH8. **D** Embrión sometido a electroporación sin plásmidos y tratado con 1 μ M PMA por 3 horas desde HH8. **E-G** Embrión electroporado con MARCKS-NF y sometido a 1 μ M PMA por 3 horas desde HH8. Cabezas de flecha: regiones de placa neural abierta. Barra de escala: 400 μ m.

DMSO + MARCKS-NF



PMA



PMA + MARCKS-NF

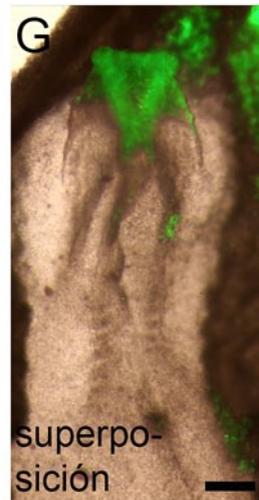
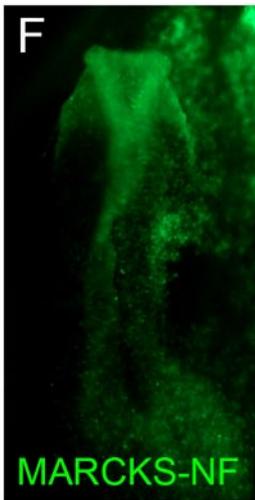
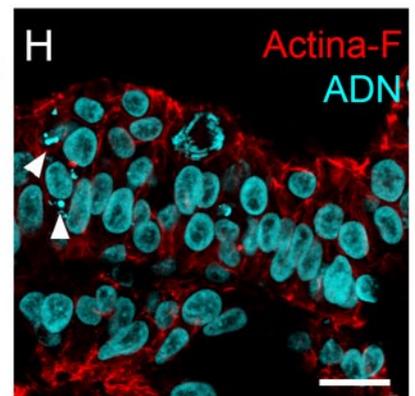
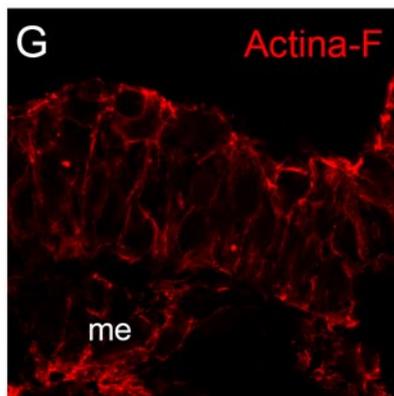
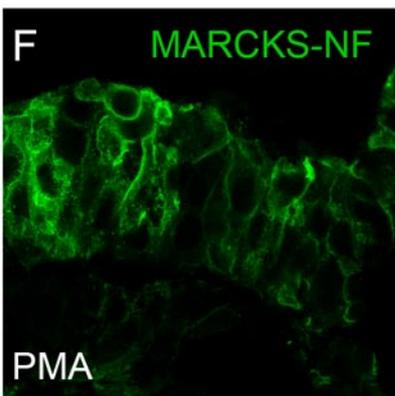
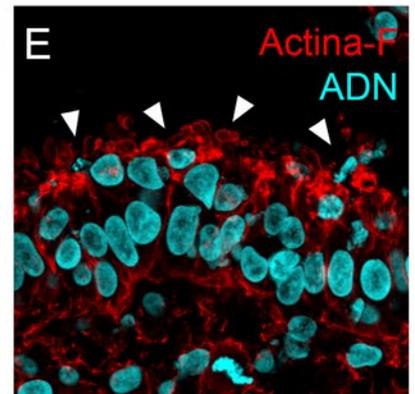
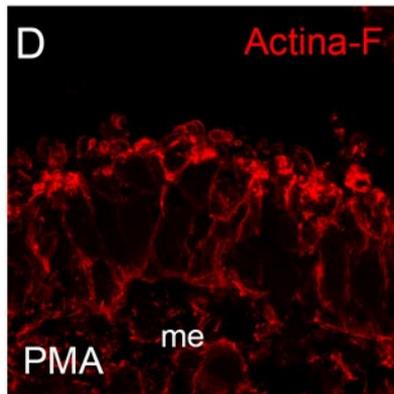
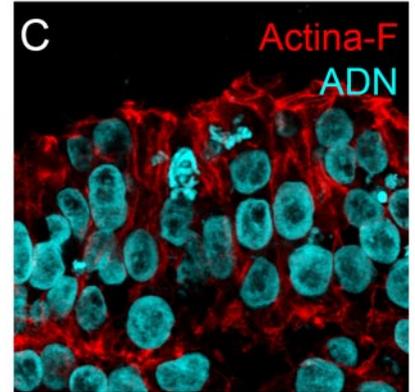
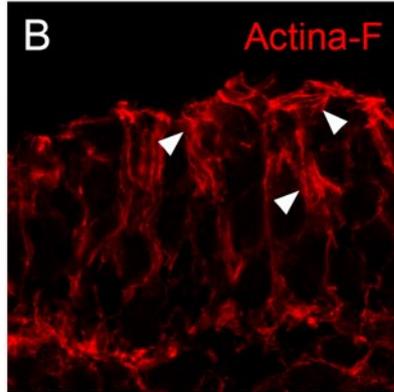
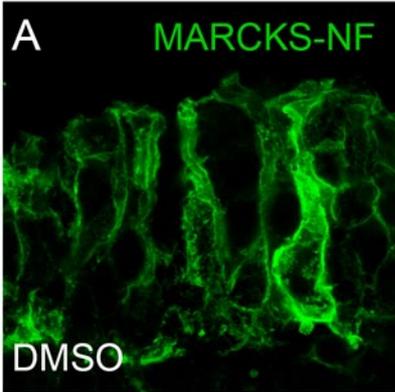


Figura R-14 Contribución de MARCKS al efecto de la activación de PKC en embriones de pollo II. Imágenes confocales a partir de criocortes transversales de placa neural de embriones electroporados en HH4 con ADN plasmídico que expresa la construcción MARCKS-NF y sometidos a 1 μ M PMA. Inmunomarcado para detectar GFP y marcado de Actina filamentosa (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). **A-C** Embrión electroporado con MARCKS-NF y luego sometido a vehículo por 3 horas desde HH8. **D-E** Embrión sometido a electroporación sin plásmidos y tratado con 1 μ M PMA por 3 horas desde HH8. **F-H** Embrión electroporado con MARCKS-NF y sometido a 1 μ M PMA por 3 horas desde HH8. Cabezas de flecha en B: haces irregulares de Actina-F; cabezas de flecha en E: protrusiones apicales de citoplasma y núcleos; cabezas de flecha en H: núcleos picnóticos. me: mesodermo. Barra de escala: 15 μ m.



Localización subcelular de MARCKS en distintas placodas ectodérmicas

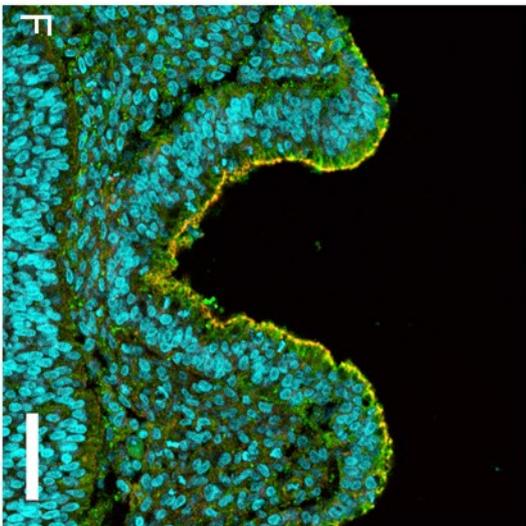
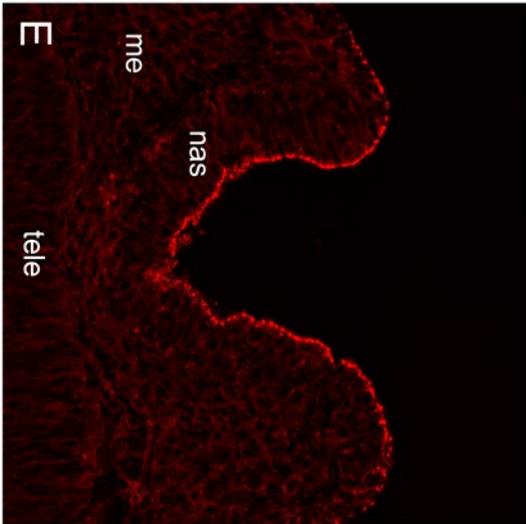
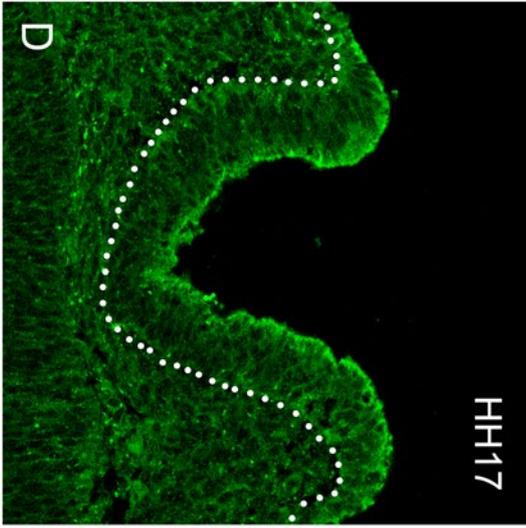
Con el objetivo de determinar la localización subcelular de MARCKS en otros epitelios en proceso de invaginación, procedimos al estudio de distintas placodas ectodérmicas en embriones de pollo. Para ello, procesamos embriones en distintos estadios para inmunofluorescencia indirecta sobre cortes (ver materiales y métodos). Dado que el tamaño de los embriones a procesar es bastante mayor a las néurulas utilizadas hasta el momento, no es posible realizar una correcta inclusión de los embriones enteros en gelatina, por lo cual disecamos las distintas regiones de interés previo a la inclusión. Comenzamos con el estudio de la placoda ótica en embriones en estadio HH13, los cuales presentan una clara invaginación del epitelio ectodérmico al nivel del romboencéfalo (Bancroft & Bellairs 1977). Al analizar la presencia de MARCKS, encontramos que está presente en todos los tejidos observados incluyendo ectodermo, mesénquima, romboencéfalo y en el epitelio de la placoda ótica (ver Figura R-15 A). Es en este último donde constatamos un enriquecimiento de MARCKS en la región apical del epitelio, cercano al cinturón de actina (ver Figura R-15 A-C).

A su vez, estudiamos la localización de MARCKS en la placoda nasal en embriones HH17. En estos embriones, la placoda nasal se distingue como una depresión ectodérmica en el extremo del telencéfalo (Bancroft & Bellairs 1977). De nuevo, MARCKS se encuentra en todos los tejidos en altas proporciones, pero posee una distribución asimétrica únicamente en las células de la placoda nasal, enriquecida en la región apical (ver Figura R-15 D).

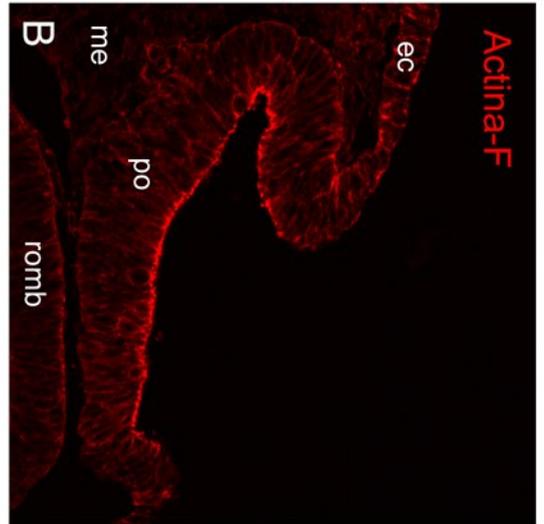
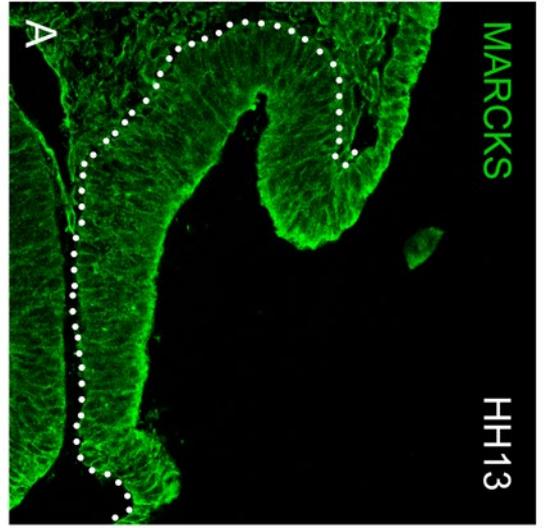
En suma, encontramos que la localización subcelular asimétrica de MARCKS es compartida por distintos tejidos en invaginación.

Figura R-15 Localización subcelular de MARCKS en placodas ectodérmicas. Imágenes confocales a partir de criocortes transversales de distintas placodas. Inmunomarcado de MARCKS (anticuerpo Polo52), marcado de Actina F (con faloidina -TRITC) y ADN (con verde de metilo). **A-C** Placoda ótica, HH13. **D-F** Placoda nasal, HH17. ec: ectodermo; me: mesénquima; po: placoda ótica; romb: romboencéfalo; nas: placoda nasal; tele: telencéfalo; línea punteada: borde basal del epitelio. Barras de escala: 50 μ m.

Placoda nasal



Placoda ótica



Efecto de la activación de PKC sobre distintas placodas ectodérmicas

Luego de observar que el enriquecimiento de MARCKS en la región apical de distintos tejidos epiteliales en invaginación es conservado, nos preguntamos si la activación de PKC en dichos tejidos tendría un efecto similar a los descritos para la placa neural. Para ello ejecutamos un protocolo de activación de PKC similar al utilizado para néurulas. Realizamos cultivos EC de embriones en distintos estadios, los cuales fueron expuestos a una concentración de 5 μ M de PMA durante 3 horas.

Para el caso de la placoda ótica, analizamos la morfología general del tejido evaluando el plegamiento del tejido, la distribución de los filamentos de actina y la posición de los núcleos tanto en condiciones normales como en presencia de PMA. En condiciones fisiológicas se observa el cinturón de actina en la región apical del tejido y la distribución característica de los núcleos a distintas alturas, como se puede observar en los cortes confocales ortogonales (Figura R-16 A). Al observar los embriones tratados con PMA se evidencia un efecto muy similar al descrito para la placa neural, con haces irregulares de actina, núcleos ectópicos y un plegamiento irregular del tejido (Figura R-16 B). Por otro lado, analizamos el efecto de la activación de PKC en la placoda cristalínea, tejido que también posee una distribución asimétrica de MARCKS (Zolessi & Arruti 2001). En condiciones fisiológicas se observa la distribución característica de los filamentos de actina y núcleos, similar a lo descrito para la placoda ótica (Figura R-17 A). Los embriones expuestos a PMA presentaron haces irregulares de actina apical así como protrusiones citoplásmicas apicales conteniendo núcleos y actina filamentosa (Figura R-17 B).

Figura R-16 Efecto de la activación de PKC sobre la morfología de la placoda ótica. Planos confocales ortogonales de placoda ótica entera, marcando los filamentos de Actina (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). **A** Planos XY, YZ y XZ de embrión control. **B** Planos XY, YZ y XZ de embrión tratado con 5 μ M PMA por 3 horas desde HH13. Línea punteada: borde basal del epitelio; cabezas de flecha en B: protrusiones apicales de citoplasma y núcleos. Barra de escala: 50 μ m.

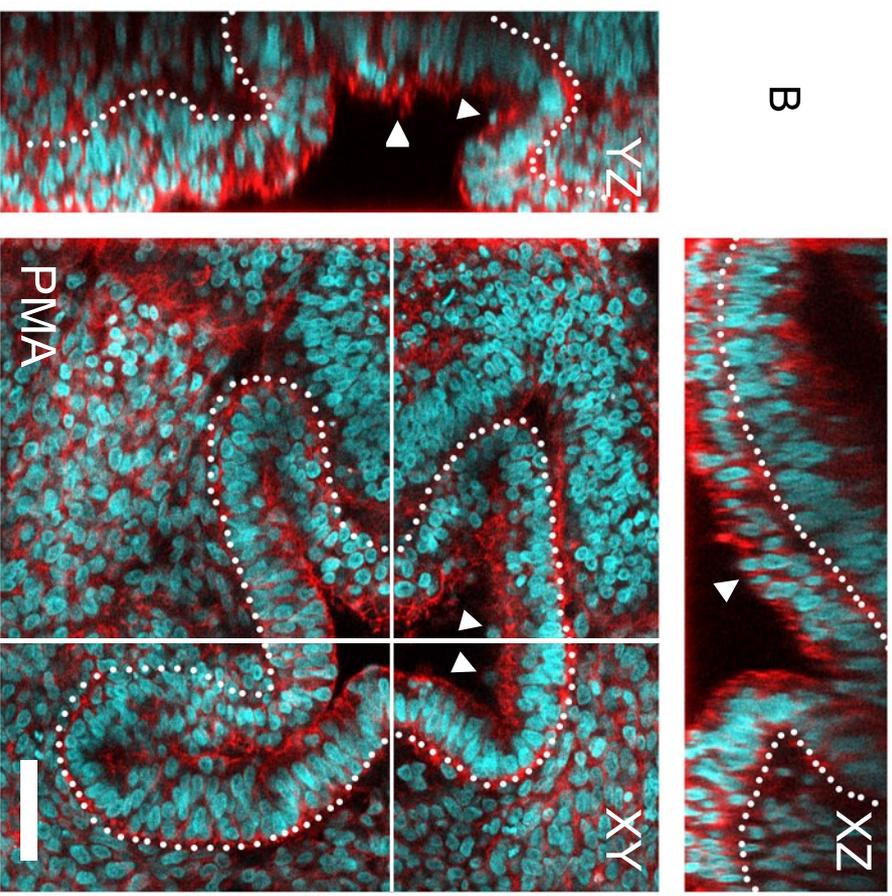
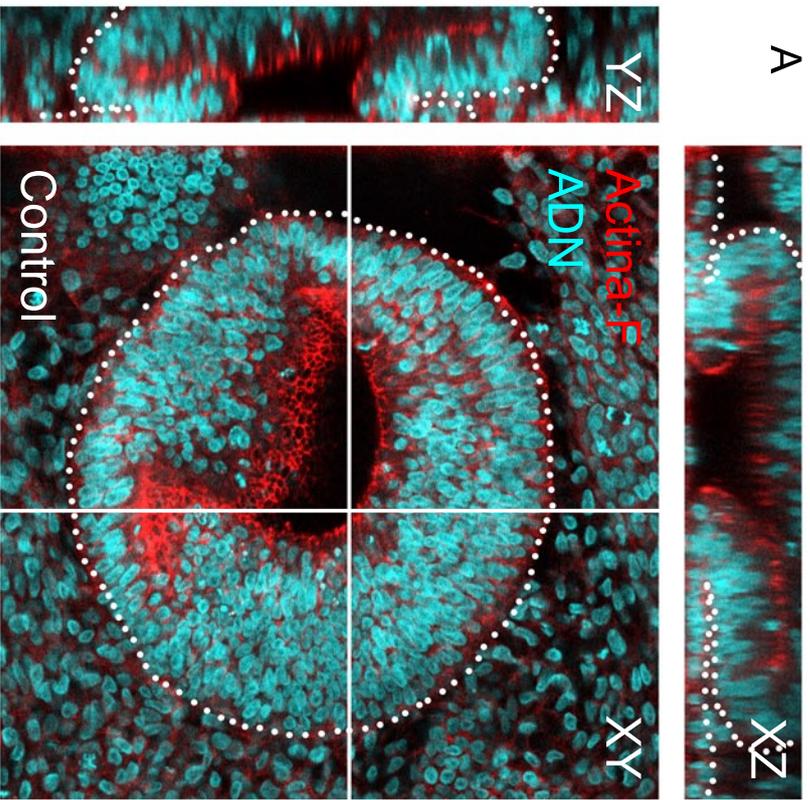
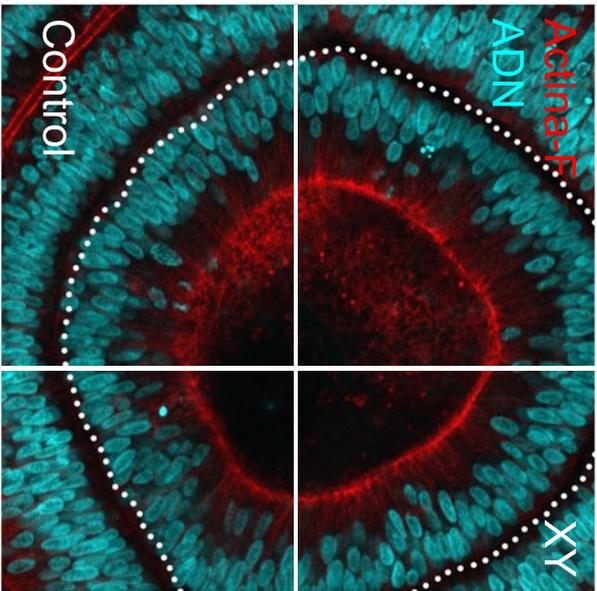
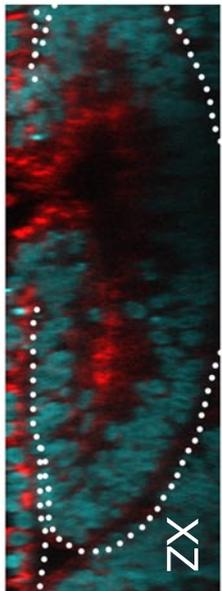
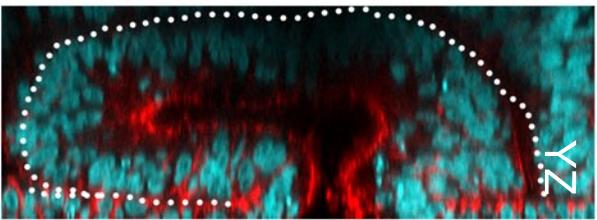
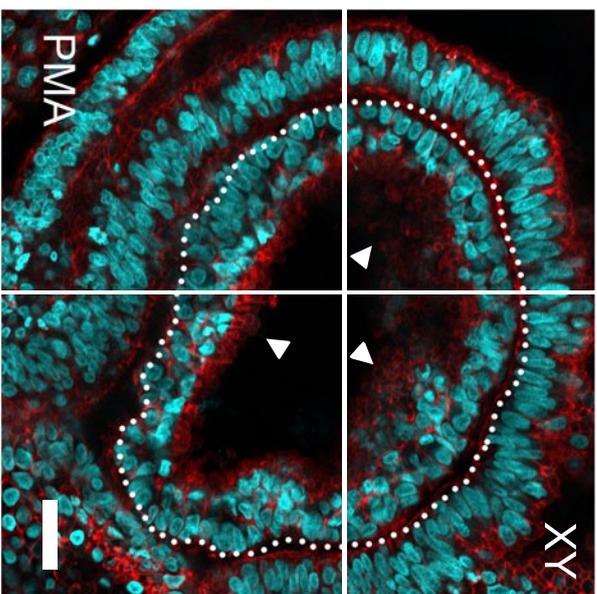
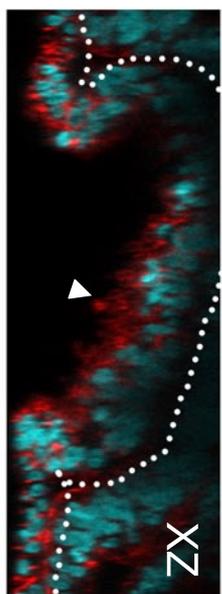
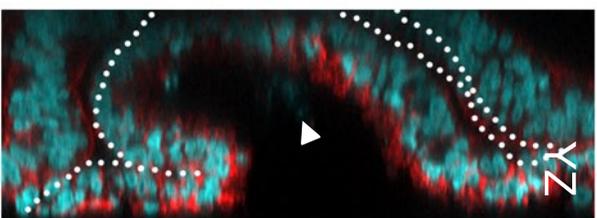


Figura R-17 Efecto de la activación de PKC sobre la morfología de la placoda cristalínea. Planos confocales ortogonales de placoda cristalínea entera, marcando los filamentos de Actina (con faloidina-TRITC) y ADN (con verde de metilo). **A** Planos XY, YZ y XZ de embrión control. **B** Planos XY, YZ y XZ de embrión tratado con 5 μ M PMA por 3 horas desde HH15. Cabeza de flecha en B: protrusiones apicales de citoplasma y núcleos. Línea punteada: borde basal del epitelio. Barra de escala: 50 μ m.

A



B



Discusión

Activación de PKC y su efecto sobre la morfología de la placa neural en embriones de pollo

Con el fin de comenzar a comprender las funciones de PKC y su mayor sustrato, MARCKS durante la morfogénesis del tubo neural en embriones de pollo, desarrollamos un protocolo para la activación farmacológica de PKC utilizando el forbol éster PMA.

A nivel macroscópico, los embriones expuestos a PMA presentaron una disminución de su extensión en el sentido céfalo-caudal y a su vez, una placa neural más ancha en comparación con los embriones control. Morfologías similares se encontraron en embriones que presentan alteraciones en la vía PCP, la cual regula los movimientos morfogénéticos de extensión y convergencia (Wallingford 2012). Por otra parte, está descrito que la disminución de la expresión (*knock-down*) de MARCKS utilizando morfolinós en embriones de *Xenopus* genera defectos en los movimientos de extensión y convergencia durante la gastrulación (Iioka et al. 2004). En particular, se ven afectados los procesos de migración, adhesión e intercalación celular (Iioka et al. 2004). La similitud entre nuestros resultados y los fenotipos observados en embriones mutantes de la vía PCP y los morfantes de MARCKS, abre la posibilidad de que la activación de PKC y posterior fosforilación de MARCKS provoquen una alteración en los movimientos de extensión y convergencia en nuestros experimentos.

La activación de PKC generó defectos en el cierre del tubo neural tanto a nivel del neuroporo anterior como en la región del romboencéfalo presuntivo. En esta última encontramos una placa neural totalmente desplegada, similar a los efectos obtenidos cuando tratamos a los embriones con citocalasina D (desestabilizante de microfilamentos). Teniendo en cuenta los movimientos morfogénéticos necesarios

para la formación del tubo neural, podemos inferir que las fuerzas intrínsecas a la placa neural son seriamente afectadas por el tratamiento con PMA, en particular la constricción apical llevada a cabo por el citoesqueleto de actomiosina y los movimientos de extensión y convergencia (Sawyer et al. 2010; Wallingford & Harland 2002). La interpretación de una incorrecta constricción apical está basada en dos observaciones, por un lado la disposición totalmente desplegada de la placa neural, y por otro los resultados de los experimentos de co-tratamiento PMA/blebistatina. Al inhibir la miosina II e incubar simultáneamente con PMA, no observamos diferencias con los tratamientos que incluían solamente PMA. Estos resultados nos permiten indicar que la activación de PKC estaría inhibiendo la constricción apical, lo que llevaría a los defectos descritos en el cierre del tubo neural. Como se dijo más arriba, en nuestros experimentos de activación de PKC, podrían estar afectados los movimientos de extensión y convergencia, los que al ser alterados impiden el correcto moldeado de la placa neural generando defectos en el cierre del tubo neural (Murdoch et al. 2014; Wallingford & Harland 2002). Por lo tanto, los defectos observados podrían deberse a una combinación de múltiples factores entre los que se destacarían, una falla en la constricción apical de las células neuroepiteliales y las alteraciones en los movimientos de extensión y convergencia.

Cabe destacar que las fuerzas extrínsecas a la placa neural que contribuyen a la formación del tubo neural no parecen estar afectadas en nuestros experimentos. Esta interpretación se basa en las siguientes observaciones: en los embriones tratados con PMA la región de los pliegues neurales presentó una disposición en sentido opuesto al normal (lateral en lugar de medial), sugiriendo que las fuerzas de tracción extrínsecas generadas por el ectodermo (y transferidas a la placa neural a este nivel; (Schoenwolf & Smith 1990)), permanecieron activas. En la misma línea,

el ectodermo no neural, adyacente a los pliegues no presentó protrusiones de citoplasma y núcleos, ni haces irregulares de actina filamentosa aunque sí presentaba inmunorreactividad para MARCKS fosforilada por PKC (Aparicio 2012).

Efecto de la activación de PKC sobre el citoesqueleto de actina

Uno de los mayores efectos que causó el tratamiento farmacológico con PMA, fue la modificación de la Actina F, que resultó acumulada en paquetes irregulares ubicados en el centro de la placa neural. De las múltiples isoformas de PKC que son activadas por ésteres de forbol, se han documentado dos (mediante análisis por Western blot) que se expresan durante la neurulación en embriones de ratón, cPKC- α y nPKC- δ , siendo cPKC- α la única presente en la placa neural (Blackshear et al. 1996). En este mismo trabajo, Blackshear y colaboradores documentaron que la activación de PKC en néurulas de ratón lleva principalmente a la fosforilación de tres proteínas ácidas, MARCKS (sustrato mayoritario), MARCKS-like 1 (fosforilada en menor medida) y otra proteína no identificada (Blackshear et al. 1996). Siendo MARCKS el sustrato mayor de PKC, podría esperarse que posea un rol importante en el efecto presentado por el citoesqueleto de actina al activar esta enzima. Como se describe en la Introducción, MARCKS se une directamente a los filamentos de actina y presenta una actividad de entrecruzamiento de los mismos que es inhibida por la fosforilación por PKC (Hartwig et al. 1992). De esta manera, MARCKS podría modular de forma directa la actina cortical en las células de la placa neural, funcionando como nexo entre la membrana plasmática y el citoesqueleto. La fosforilación de MARCKS eliminaría el puente entre la membrana y el citoesqueleto, generando las protrusiones de membrana (discutido en la próxima sección).

Por otro lado, encontramos que MARCKS, a pesar de estar acumulada en la cercanía, no se encuentra, en su mayor parte, co-localizando con los haces de actomiosina en el borde apical de las células neuroepiteliales. Por lo tanto, es posible pensar que MARCKS podría actuar sobre los microfilamentos de manera indirecta, por ejemplo al secuestrar al fosfolípido de la cara interna de la membrana plasmática PIP₂ (Laux et al. 2000). Algunas evidencias han indicado que la separación de MARCKS de la membrana, mediada por la fosforilación a cargo de PKC, podría determinar un incremento en la disponibilidad de PIP₂, haciéndolo accesible a enzimas como la fosfolipasa D, o iniciando la reorganización del citoesqueleto por el reclutamiento de proteínas promotoras de la polimerización, el “*treadmilling*”, el anclado a la membrana o el entrecruzamiento de filamentos de actina (McLaughlin et al. 2002). Teniendo en cuenta la alta concentración calculada de MARCKS en las células (2 μM en fibroblastos y 10 μM en neuronas) y que cada molécula de MARCKS puede interactuar con hasta tres moléculas de PIP₂, ésta podría unirse a todo el PIP₂ presente en la membrana plasmática (Sheetz et al. 2006). De acuerdo a este modelo, se abre un abanico enorme de posibles moléculas que, moduladas por MARCKS a través del PIP₂, interactuarían directa o indirectamente con el citoesqueleto de actina y podrían explicar el efecto encontrado.

Activación de PKC y las protrusiones de membrana apical

Una de las alteraciones más evidentes que causó el PMA sobre el neuroepitelio fue la inducción de la formación de protrusiones de membrana apical conteniendo citoplasma y núcleos. Una posibilidad es que las protrusiones sean

blebs de membrana. Los *blebs* son estructuras cuasi-esféricas que se encuentran asociadas principalmente con el daño celular (Barros et al. 2003). La contracción del citoesqueleto cortical de actina por la proteína motora miosina II causa la contracción de la membrana plasmática, excepto en regiones donde existe poca adhesión del citoesqueleto a la membrana. Dicha debilidad se genera por una falta de proteínas de unión entre ambas estructuras. La combinación entre la contracción del citoesqueleto y la pérdida de adhesiones genera la formación de las protrusiones (Mills et al. 1999). Consistente con este modelo, en la región apical de las células neuroepiteliales se lleva a cabo una intensa contracción apical, dada por el citoesqueleto cortical de actina y la miosina IIb (Sawyer et al. 2010). El siguiente requisito para la generación de los *blebs* es la pérdida de adhesión entre la membrana y el citoesqueleto. Dado que MARCKS forma puentes entre la membrana plasmática y el citoesqueleto cortical (Arbuzova et al. 2002), podría esperarse que sea una de las proteínas responsables de este fenómeno. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que la generación de las protrusiones en las células neuroepiteliales tratadas con PMA se deba, al menos en parte, a la fosforilación de MARCKS enriquecida en la región apical y su relocalización en el citoplasma.

Otra posibilidad es que las protrusiones apicales sean los primeros eventos de un proceso de extrusión celular, entendido como la separación de las células de la lámina basal y desprendimiento apical (Slattum & Rosenblatt 2014). Nuestros experimentos de expresión de GFP y posterior exposición a PMA nos permitieron determinar que células que expresaban GFP y que presentaban protrusiones de citoplasma y núcleos no presentaban contacto con la lámina basal, lo que sugiere un proceso temprano de desprendimiento de dichas células del tejido. En trabajos realizados utilizando líneas celulares de melanoma, se ha encontrado que MARCKS posee un rol en la estabilización de las uniones célula-matriz mediada por integrinas

(Estrada-Bernal et al. 2009). Al enfrentar células con TPA (un éster de forbol análogo al PMA) encontraron que el sustrato mayoritariamente fosforilado por PKC es MARCKS. Ante dicha activación ocurre una disminución de la adhesión celular, la cual es rescatada cuando se sobre-expresa una construcción de MARCKS. A su vez, encontraron que la simple sobreexpresión de MARCKS (sin activación de PKC) aumenta la adhesión de las células al sustrato (Estrada-Bernal et al. 2009). En esta misma línea, se ha documentado que la inhibición de MARCKS en distintos tipos celulares produce una disminución de la migración y la adhesión celular al sustrato, procesos que son en parte mediados por integrinas (Sheats et al. 2014; Eckert et al. 2010; Iioka et al. 2004). Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, existe la posibilidad de que en nuestros tratamientos con PMA, la fosforilación de MARCKS provoque una disminución de la adhesión de las células neuroepiteliales a la lámina basal, llevando a su extrusión apical. Esta hipótesis, en principio, le confiere un rol a la población de MARCKS que se encuentra asociada o cercana al dominio basal de membrana del neuroepitelio.

Sin embargo no podemos descartar que en realidad ambas hipótesis sean correctas (que los cambios morfológicos de las células se deban al efecto sobre MARCKS tanto en la membrana apical como en la membrana basal), dado que no todas las células marcadas con GFP y que presentaban protrusiones apicales se encontraban despegadas de la lámina basal.

MARCKS como el principal mediador de los efectos de la activación de PKC en la neurulación

Para determinar si existe una relación directa entre los efectos observados al activar PKC y la fosforilación de MARCKS en el DE, electroporamos una variante de MARCKS incapaz de ser fosforilada por PKC (MARCKS-NF). En estos ensayos encontramos que las células y grupos de células que expresaban la construcción revirtieron los efectos generados por la activación de PKC (aparición de protrusiones apicales de citoplasma y núcleos). Estos resultados nos sugieren que los efectos causados por la activación de PKC son debidos en mayor parte a la fosforilación de su mayor sustrato, MARCKS. A nivel macroscópico, no observamos un rescate en los defectos en la morfogénesis del tubo neural. Esto puede deberse a que la expresión de la variante de MARCKS no fue total y se restringió a ciertas regiones y a células más o menos aisladas de la placa neural.

De manera interesante, la simple sobreexpresión de la construcción generó haces irregulares de filamentos de actina y un incorrecto cierre del tubo neural. En este sentido, se ha documentado que en líneas celulares cancerosas, la sobreexpresión de MARCKS genera rearrreglos del citoesqueleto de actina (Estrada-Bernal et al. 2009). Es de esperarse, por otra parte, que variaciones en la expresión de proteínas moduladoras de actina (como es el caso de MARCKS) generen defectos en el cierre del tubo neural. Estos resultados indican que debe existir una regulación fina de la expresión de MARCKS para una correcta morfogénesis del tubo neural.

Como se describió en la Introducción, los embriones de ratón deficientes en MARCKS presentan defectos en la neurulación, adjudicándole un rol esencial a la

proteína durante la morfogénesis del tubo neural (Stumpo et al. 1995). Nuestros resultados van en la misma línea: los embriones de pollo electroporados con morfolino para MARCKS desde estadios tempranos del desarrollo (20 horas antes del estadio de interés), presentaron defectos en el cierre del tubo neural y un desprendimiento de células hacia la región apical de la placa neural. Tras diversos experimentos de inhibición de la expresión, así como de la función de MARCKS en otros tipos celulares, se ha observado en las células una disminución de la adhesión al sustrato (Sheats et al. 2014; Eckert et al. 2010; Iioka et al. 2004), coherente con nuestros resultados. Cabe destacar que los fenotipos observados en estos ensayos de disminución de la expresión fueron leves si los comparamos con los efectos obtenidos en el ratón *knock-out*. Esto podría deberse tanto a la baja eficiencia en la adquisición del morfolino por las células de la placa neural y a que no se alcanza la pérdida total de la expresión de MARCKS en dichas células (*knock-down*).

Los embriones de ratones *knock-out* para el gen que codifica a MARCKS presentaron protrusiones en la región apical del neuroepitelio (Blackshear et al. 1996). Nuestros experimentos de disminución de la expresión de MARCKS desde estadios tardíos (HH6) presentaron efectos similares pero en menor medida. De modo muy interesante, nuestros experimentos de activación de PKC y posterior fosforilación de MARCKS presentan similitudes muy grandes con lo observado en el mutante de ratón (ver Figura D-1).

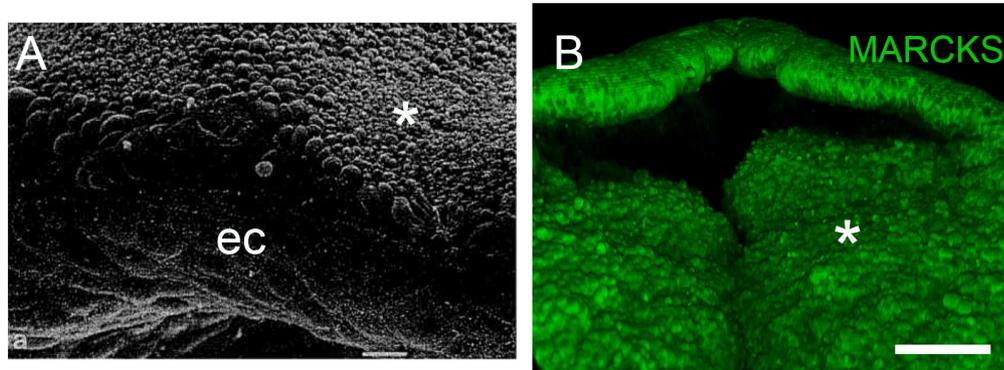


Figura D-1. Similitudes en la morfología de la placa neural entre el ratón *knock-out* de MARCKS y nuestros resultados de activación de PKC en néurulas de pollo. En **A** se muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido de un embrión de ratón en estadio E9.5 *knock-out* para *Macs*. Se puede observar la región apical de la placa neural y protrusiones en las células neuroepiteliales. En **B** se muestra una reconstrucción tridimensional a partir de múltiples planos confocales de un embrión de pollo sometido a 5 μ M PMA por 3 horas desde HH8 inmunomarcado *in toto* para MARCKS. Se pueden observar las protrusiones apicales de las células neuroepiteliales, muy similares a las observadas en el embrión de ratón (asteriscos). ec: ectodermo no neural. Figura A modificada de (Blackshear et al. 1996). Barra de escala: B, 100 μ m.

Consideraciones finales y conclusiones

Considerando en conjunto los resultados experimentales de esta tesis, podemos afirmar que la actividad de PKC debe estar finamente regulada durante el cierre del tubo neural en embriones de pollo. Dichos resultados sugieren fuertemente que parte de los efectos generados por la activación de PKC están mediados por la fosforilación de MARCKS.

Las similitudes de nuestros resultados experimentales de activación de PKC e inhibición de la expresión de MARCKS con los obtenidos por distintos grupos de investigación al inhibir MARCKS en células aisladas y organismos intactos, nos permiten postular que la fosforilación de MARCKS en el DE mediada por PKC inhibiría la función que posee esta proteína durante el cierre del tubo neural.

Referencias bibliográficas

- Aaku-Saraste, E., Hellwig, A. & Huttner, W.B., 1996. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Developmental Biology*, 180(2), 664-79.
- Aderem, A., 1992. The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell*, 71(5), 713-6.
- Albert, K.A. et al., 1986. Widespread occurrence of "87 kDa," a major specific substrate for protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), 2822-6.
- Anderson, J.M., 2001. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News in Physiological Sciences*, 16, 126-130.
- Andrew, D.J. & Ewald, A.J., 2010. Morphogenesis of epithelial tubes: Insights into tube formation, elongation, and elaboration. *Developmental Biology*, 341(1), 34-55.
- Aparicio, G., 2012. MARCKS en la neurulación de embriones de pollo: localización subcelular en función de la actividad de interactores moleculares. Tesina para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Arbuzova, A., Schmitz, A. & Vergeres, G., 2002. Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochemical Journal*, 12(362), 1-12.
- Bancroft, M. & Bellairs, R., 1977. Placodes of the chick embryo studied by SEM. *Anatomy and Embriology*, 108, 97-108.
- Barros, L.F. et al., 2003. Apoptotic and necrotic blebs in epithelial cells display similar neck diameters but different kinase dependency. *Cell Death and Differentiation*, 10(6), 687-697.

- Blackshear, P.J. et al., 1996. Developmental expression of MARCKS and protein kinase C in mice in relation to the exencephaly resulting from MARCKS deficiency. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 62-75.
- Blackshear, P.J. et al., 1992. Chromosomal mapping of the human (MACS) and mouse (Macs) genes encoding the MARCKS protein. *Genomics*, 14(1), 168-74.
- Blackshear, P.J., 1993. The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(3), 1501-4.
- Blackshear, P.J. et al., 1997. Widespread neuronal ectopia associated with secondary defects in cerebrocortical chondroitin sulfate proteoglycans and basal lamina in MARCKS-deficient mice. *Experimental Neurology*, 145(1), 46-61.
- Catala, M., Teillet, M. A. & Le Douarin, N.M., 1995. Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system. *Mechanisms of Development*, 51(1), 51-65.
- Chapman, S.C. et al., 2001. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Developmental Dynamics*, 220(3), 284-9.
- Chen, Z.F. & Behringer, R.R., 1995. twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes & Development*, 9(6), 686-99.
- Chenn, A et al., 1998. Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 11(4), 183-93.
- Colas, J.F. & Schoenwolf, G.C., 2001. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics*, 221(2), 117-45.
- Dady, A. et al., 2014. Junctional Neurulation: A Unique Developmental Program Shaping a Discrete Region of the Spinal Cord Highly Susceptible to Neural Tube Defects. *Journal of Neuroscience*, 34(39), 13208-13221.

- Delaune, E., Lemaire, P. & Kodjabachian, L., 2005. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development*, 132(2), 299-310.
- Eckert, R.E. et al., 2010. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein regulation of human neutrophil migration. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(5), 586-94.
- Eom, D.S. et al., 2011. Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway. *Development*, 138(15), 3179-88.
- Estrada-Bernal, A., et al., 2009. Dynamic adhesions and MARCKS in melanoma cells. *Journal of Cell Science*, 122(13), 2300-2310.
- Gilbert, S.F., 2010. *Developmental biology*. 9^{na} edición, Sunderland, Sinauer Associates.
- Goldstein, B. & Macara, I.G., 2007. The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Developmental Cell*, 13(5), 609-22.
- Hamburger, V. & Hamilton, H.L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental Dynamics*, 195(4), 231-272.
- Hartsock, A. & Nelson, W.J., 2008. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(3), 660-9.
- Hartwig, J.H. et al., 1992. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature*, 356(6370), 618-22.
- Hatakeyama, J. & Shimamura, K., 2008. Method for electroporation for the early

- chick embryo. *Development Growth and Differentiation*, (50), 449-452.
- Heo, W. D. et al., 2006. PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science*, 314(5804), 1458-61.
- Herget, T. et al., 1995. The myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) is sequentially phosphorylated by conventional, novel and atypical isoforms of protein kinase C. *European Journal of Biochemistry*, 233(2), 448-57.
- Hildebrand, J.D., 2005. Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *Journal of Cell Science*, 118, 5191-203.
- Iioka, H., Ueno, N. & Kinoshita, N., 2004. Essential role of MARCKS in cortical actin dynamics during gastrulation movements. *The Journal of Cell Biology*, 164(2), 169-74.
- Itoh, M. et al., 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, 154(3), 491-7.
- Kinoshita, N. et al., 2008. Apical accumulation of rho in the neural plate is important for neural plate cell shape change and neural tube formation. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 2289-2299.
- Kwan, K.M. et al., 2007. The Tol2kit: A multisite gateway-based construction Kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Developmental Dynamics*, 236(11), 3088-3099.
- Laux, T. et al., 2000. GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *The Journal of Cell Biology*, 149(7), 1455-72.
- Linker, C. & Stern, C.D., 2004. Neural induction requires BMP inhibition only as a

- late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development*, 131(22), 5671-81.
- Lowery, L.A. & Sive, H., 2004. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mechanisms of Development*, 121(10), 1189-97.
- McLaughlin, S. et al., 2002. PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 31, 151-175.
- McNamara, R.K. et al., 1998. Effect of reduced myristoylated alanine-rich C kinase substrate expression on hippocampal mossy fiber development and spatial learning in mutant mice: transgenic rescue and interactions with gene background. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), 14517-22.
- Mehta, K.D., 2014. Emerging role of protein kinase C in energy homeostasis: A brief overview. *World Journal of Diabetes*, 5(3), 385-92.
- Mellor, H. & Parker, P.J., 1998. The extended protein kinase C superfamily. *The Biochemical Journal*, 332, 281-92.
- Mills, J.C., Stone, N.L. & Pittman, R.N., 1999. Extranuclear apoptosis: The role of the cytoplasm in the execution phase. *Journal of Cell Biology*, 146(4), 703-707.
- Moury, J.D. & Schoenwolf, G.C., 1995. Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis, and interactions in the neural plate/epidermis transition zone. *Developmental Dynamics*, 204(3), 323-37.
- Murdoch, J.N. et al., 2014. Interactions between planar cell polarity genes cause

- diverse neural tube defects. *Disease Models & Mechanisms*, 447(10),1153-63.
- Niessen, C.M., 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2525-32.
- Nishimura, T. & Takeichi, M., 2008. Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. *Development*, 135(8), 1493-502.
- Nishizuka, Y., 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB Journal*, 9(7), 484-96.
- Prieto, D. et al., 2014. A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and Cell Biology*, 142(3), 335-45.
- Quinones, G.B. et al., 2011. The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Molecular Biology of the Cell*, 22(7), 1045-1057.
- De Robertis, E.M. & Kuroda, H., 2004. Dorsal-Ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 285-308.
- Roh, M.H. et al., 2002. The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27501-9.
- Ron, D. & Kazanietz, M.G., 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB journal*, 13(13), 1658-76.
- Rosen, A. et al., 1990. Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(4), 1211-5.

- Saito, N., Kikkawa, U. & Nishizuka, Y., 2002. The family of protein kinase C and membrane lipid mediators. *Journal of Diabetes and its Complications*, 16(1), 4-8.
- Sánchez-Arrones, L. et al., 2009. Incipient forebrain boundaries traced by differential gene expression and fate mapping in the chick neural plate. *Developmental Biology*, 335(1), 43-65.
- Sawyer, J.M. et al., 2010. Apical constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis. *Developmental Biology*, 341(1), 5-19.
- Scarlett, C.O. & Blackshear, P.J., 2003. Neuroanatomical development in the absence of PKC phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein. *Brain research. Developmental Brain Research*, 144(1), 25-42.
- Schindelin, J. et al., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-82.
- Schoenwolf, G.C. & Powers, M.L., 1987. Shaping of the chick neuroepithelium during primary and secondary neurulation: role of cell elongation. *The Anatomical Record*, 218(2), 182-195.
- Schoenwolf, G.C. & Smith, J.L., 1990. Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development*, 109(2), 243-70.
- Sheats, M.K. et al., 2014. Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate (MARCKS) is essential to β 2-integrin dependent responses of equine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 160(3-4), 167-176.
- Sheetz, M.P., Sable, J.E. & Döbereiner, H.G., 2006. Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and

- cytoskeleton dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 35, 417-34.
- Shimokita, E. & Takahashi, Y., 2011. Secondary neurulation: Fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud. *Development Growth and Differentiation*, 53(3), 401-410.
- Slattum, G.M. & Rosenblatt, J., 2014. Tumour cell invasion: an emerging role for basal epithelial cell extrusion. *Nature Reviews. Cancer*, 14(7), 495-501.
- Smith, J.L. & Schoenwolf, G.C., 1988. Role of cell-cycle in regulating neuroepithelial cell shape during bending of the chick neural plate. *Cell and Tissue Research*, 252(3), 491-500.
- Stern, C.D., 2006. Neural induction: 10 years on since the “default model”. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), 692-7.
- Stern C.D., 1993. Immunocytochemistry of embryonic material. En: Stern C.D., Holland W.H. *Essential Developmental Biology A practical approach*. New York, Oxford University Press, 193-212.
- Stumpo, D.J. et al., 1995. MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), 944-8.
- Stumpo, D.J. et al., 1989. Molecular cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding the “80- to 87-kDa” myristoylated alanine-rich C kinase substrate: a major cellular substrate for protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(11), 4012-6.
- Swierczynski, S.L. et al., 1996. Nonmyristoylated MARCKS complements some but not all of the developmental defects associated with MARCKS deficiency in

- mice. *Developmental Biology*, 179(1), 135-47.
- Tanentzapf, G. & Tepass, U., 2003. Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nature cell biology*, 5(1), 46-52.
- Taniguchi, H. et al., 1994. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), a major protein kinase C substrate, is an in vivo substrate of proline-directed protein kinase(s). A mass spectroscopic analysis of the post-translational modifications. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(28), 18299-302.
- Tepass, U. et al., 2001. Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, 35, 747-84.
- Thelen, M. et al., 1991. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature*, 351(6324), 320-2.
- Toledo, A., Zolessi, F.R. & Arruti, C., 2013. A novel effect of MARCKS phosphorylation by activated PKC: the dephosphorylation of its serine 25 in chick neuroblasts. *PloS one*, 8(4), e62863.
- Towler, D.A. et al., 1988. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 69-99.
- Uberall, F. et al., 1997. Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4072-8.
- Voiculescu, O., Papanayotou, C. & Stern, C.D., 2008. Spatially and temporally controlled electroporation of early chick embryos. *Nature Protocols*, 3(3), 419-26.

- Wallingford, J.B., 2005. Neural tube closure and neural tube defects: studies in animal models reveal known knowns and known unknowns. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 135C(1), 59-68.
- Wallingford, J.B., 2012. Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 627-53.
- Wallingford, J.B. & Harland, R.M., 2002. Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development*, 129(24), 5815-5825.
- Wang, J. et al., 2001. The effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate binds strongly to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 5012-9.
- Weimer, J.M. et al., 2009. MARCKS modulates radial progenitor placement, proliferation and organization in the developing cerebral cortex. *Development*, 136(17), 2965-75.
- Wodarz, A. et al., 1995. Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell*, 82(1), 67-76.
- Yarmola, E.G. et al., 2001. Actin filament cross-linking by MARCKS: characterization of two actin-binding sites within the phosphorylation site domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22351-8.
- Ybot-Gonzalez, P. & Copp, A.J., 1999. Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments. *Developmental Dynamics*, 215(3), 273-83.
- Zolessi, F.R. et al., 2004. Identification of the chicken MARCKS phosphorylation site

specific for differentiating neurons as Ser 25 using a monoclonal antibody and mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 3(1), 84–90.

Zolessi, F.R. & Arruti, C., 2001. Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in the chick embryo. *BMC Developmental Biology*, 1, 7.