

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY PEDECIBA - Biología

TESIS DE DOCTORADO en Ciencias Biológicas



Caracterización de los ARN mensajeros localizados en axones motores y sensoriales, y sus posibles cambios asociados al envejecimiento.

Joaquina Farias

Junio 2020







Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) Área Biología

Tesis de Doctorado

Caracterización de los ARN mensajeros localizados en axones motores y sensoriales, y sus posibles cambios asociados al envejecimiento.

Mag. Joaquina Farias

Orientador: Dr. José R. Sotelo-Silveira

Tribunal

Ángel Caputi (Presidente) Patricia Cassina (Vocal) Nicolás Unsain (Vocal)

Depto. Genómica Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Junio 2020

ÍNDICE

Resumen1
Introducción
Polaridad neuronal: desbalance citoplasmático entre los distintos dominios neuronales 4 Origen de las proteínas axoplásmicas
Hipótesis
Objetivos
Objetivo general
Capítulo I: Caracterización de los ARNs localizados en axones motores maduros mediante
microdisección de axones y RNA-seq
<u>Trabajo II:</u> Axon micro-dissection and transcriptome profiling reveals the in vivo RNA content of fully differentiated myelinated motor axons
envejecimiento
Introducción
Capítulo III: Estudios transcriptómicos y proteómicos en axones de neuronas sensoriales y
<i>m</i> otoras in vivo
Introducción
Discusión, conclusiones y perspectivas 91
Discusión
Diferentes desafíos metodológicos encontrados a la hora del análisis del transcriptoma de axones <i>in vivo</i>

Neuronas con distintas funciones poseen diferencias en el repertorio de ARNs lo	calizado en
sus axones	103
Conclusiones	105
Perspectivas	106
Bibliografía	109
Anexo (material suplementario)	120
Anexo II	121

RESUMEN

Las células neuronales se caracterizan por presentar un gran desbalance del volumen citoplasmático de sus diferentes dominios celulares. Particularmente, el axón de neuronas de proyección puede presentar un volumen cientos de veces mayor al del soma neuronal, provocando un gran desafío bioquímico a la hora de mantener la masa axoplásmica. Respecto a las proteínas, se han descrito tres mecanismos complementarios responsables de su homeostasis: el transporte de proteínas desde el soma, la transferencia desde las glías y la síntesis local en el axón. Una forma de conocer la capacidad que posee el axón para sintetizar proteínas fue mediante el análisis de la presencia de ARNm en el mismo. Actualmente, esto se ha realizado mediante estudios transcriptómicos, y los datos disponibles hasta el momento analizan el transcriptoma de axones en condiciones *in vitro*, siendo todavía limitado el conocimiento de lo que ocurre en condiciones *in vivo*.

Con el objetivo de contribuir a la comprensión de la potencialidad que poseen los axones *in vivo* a la hora de sintetizar proteínas localmente, nos planteamos caracterizar, por primera vez, el repertorio de ARNs localizados en axones mielínicos adultos. El método elegido para la obtención del citoplasma axonal fue la microdisección de axones, y como modelo de estudio se eligieron los axones provenientes de raíces espinales de ratas adultas. Se analizaron axones motores y sensoriales maduros, así como también se caracterizaron los cambios en el transcriptoma de axones motores a lo largo de la maduración y envejecimiento del nervio.

En primer lugar, realizamos ajustes y modificaciones en la técnica de microdisección, de modo de minimizar posibles remanentes no axonales en las muestras de axoplasma y realizamos controles de calidad de las mismas. Los resultados obtenidos indican que el método logra una disminución muy efectiva de los remanentes de mielina en la superficie de los axoplasmas. A nivel molecular, se observó que las muestras de axoplasma presentan un enriquecimiento en ARNs codificantes para proteínas marcadoras neuronales, mientras que aquellos codificantes para proteínas de mielina disminuyen en relación al contenido que presenta la raíz medular entera.

La caracterización del transcriptoma de axones *in vivo* mostró una composición compleja, incluyendo ARNs codificantes de proteínas así como también varios tipos de ARNs no codificantes. Sin embargo, observamos que los axones *in vivo* presentan un menor número de ARNs localizados que lo reportado para axones *in vitro*. Mediante el análisis ontológico de las proteínas que podrían ser sintetizadas localmente observamos que los axones *in vivo* poseen la capacidad de sintetizar proteínas con diversas funciones. La comparación de los transcriptomas de axones *in vivo* e *in vitro*, así como de axones *in vivo* derivados de diferentes tipos neuronales o en distintos estadios madurativos, mostró que todos ellos comparten un enriquecimiento en ARNs codificantes para proteínas con funciones relacionadas al citoesqueleto, mitocondrias o traducción. A su vez, se evidenció una importante regulación de la localización de ARNs en los axones *in vivo*, presentando distinto repertorio los axones motores y sensoriales, así como también axones motores durante el proceso de maduración y envejecimiento de los nervios periféricos. Interesantemente, además de observar la presencia de centenas de mensajeros con funciones esenciales para un axón, observamos que existen ARNm codificantes para proteínas ribosomales, soportando una posible hipótesis de ensamblado/reparación/mantenimiento de ribosomas en el axón.

Globalmente, los resultados presentados constituyen una contribución novedosa en relación al repertorio de ARNs que potencialmente puede ser sintetizados en los axones *in vivo* y su modulación en relación a la edad del individuo. A su vez, se presenta al método de microdisección como una valiosa herramienta para el estudio de la participación axonal en diferentes procesos fisiológicos o patológicos de los nervios periféricos.

INTRODUCCIÓN

Polaridad neuronal: desbalance citoplasmático entre los distintos dominios neuronales.

Uno de los hechos que distingue a las células nerviosas de otros tipos celulares es su particular arquitectura. Si bien pueden tener distintas formas y tamaños, todas las neuronas presentan una alta polaridad celular, siendo los principales dominios o compartimentos morfológicos el soma neuronal, las dendritas y el axón. Para lograr transmitir las señales eléctricas rápidamente, las prolongaciones neuronales suelen ser largas y, en muchos casos, altamente ramificadas. Esto produce que la neurona presente un gran desbalance del volumen citoplasmático entre los distintos dominios celulares, pudiendo el volumen axonal exceder cientos o hasta miles de veces el del cuerpo neuronal.

Más allá de sus particularidades, hay que tener en cuenta que las neuronas siguen siendo simplemente una célula y, como sucede en todas las células, casi todas las proteínas neuronales están codificadas por el genoma almacenado en el núcleo, sin importar qué tan lejos esté el núcleo del sitio de acción de la proteína. A su vez, tanto los axones como las dendritas contienen complementos distintos de proteínas de membrana, así como también difieren en la composición molecular de sus elementos citosólicos y citoesqueléticos (Bentley & Banker, 2016). El correcto desarrollo, señalización y funcionalidad de las neuronas dependen de la localización precisa de los diferentes componentes celulares en los dominios apropiados. Conocer los mecanismos celulares responsables del abastecimiento de macromoléculas y organelos a zonas lejanas del soma fue un objetivo abordado tempranamente en neurobiología. A continuación nos centraremos en describir los mecanismos celulares que participan en el abastecimiento de proteínas hacia el dominio axonal, ya que es este dominio nuestro modelo de estudio.

Origen de las proteínas axoplásmicas.

Hasta fines del siglo pasado se planteaba que todas las proteínas axonales provenían del soma neuronal. Esta postura dogmática, conocida como modelo "centralista", se basó en la identificación de polirribosomas y retículo endoplásmico rugoso principalmente en los somas neuronales, y en la dificultad de identificar la maquinaria traduccional en axones, salvo en las secciones iniciales (Zelená, 1970; Pannese & Ledda, 1991). Estas observaciones llevaron a especular que la síntesis local de proteínas no ocurría en los axones. Los resultados de

experimentos de marcaje radioactivo de "pulse-chase", realizados a partir de la década de los 60, indicaron que las proteínas sintetizadas en el soma neuronal son transportadas a lo largo del axón (**Fig. 1**) mediante dos mecanismos (Droz & Leblond 1963; Lorenz & Willard 1978; Lasek et al. 1984). Por un lado, se planteó que las proteínas asociadas a vesículas y otros organelos membranosos viajan a través del transporte axonal rápido, a velocidades en el rango de 50-400 mm/día. Por otro lado, las proteínas citosólicas solubles y del citoesqueleto producidas en el cuerpo celular viajan a través del transporte axonal lento, a velocidades de 0.1-10 mm/día (revisado en Roy, 2014). Mientras que los principios básicos que subyacen al transporte axonal rápido son bien comprendidos, los que subyacen al transporte axonal lento aún no se conocen en profundidad (Campenot & Eng 2000; Scott et al. 2011; Tang et al. 2012; Conway & Ross 2013). Actualmente, se plantea el debate de si existen dos modos de transporte diferentes o uno único, donde pueda variar la velocidad de transporte. Evidencia reciente apoya la segunda hipótesis, donde la diferencia estaría dado sólo por el número de motores moleculares asociados al cargo (Lee & Mitchell, 2015).



Figura 1. Fuentes complementarias de proteínas axonales. Se representa de manera esquemática una neurona periférica y los mecanismos celulares responsables de proporcionar proteínas al axón. A través del transporte axoplásmico se transportan hacia el axón las proteínas sintetizadas en el soma neuronal. Por otro lado, las células gliales contribuyen al proteoma axonal mediante la transferencia de proteínas, ARN y ribosomas. Por último, la síntesis local de proteínas en los axones se documentó como otro mecanismo complementario para el mantenimiento de la proteostasis axonal. Se planteó la hipótesis de que la síntesis de proteínas en los axones podría tener lugar en las placas periaxoplásmicas (PARPs), en las que se describieron ARNm y ribosomas.

La identificación de que proteínas claves y abundantes en los axones (como los neurofilamentos) son transportados mediante el transporte axoplásmico lento (Black & Lasek, 1980) planteó una importante inconsistencia del modelo "centralista" (Alvarez & Torres, 1985). En axones periféricos

de grandes mamíferos (que pueden extenderse más de 1 metro en longitud), estas proteínas tardarían un año en llegar a los extremos distales de los axones. Estudios de las vidas medias de proteínas citoesqueléticas realizados en esa época indicaban que las mismas se encontraba en el rango de pocos días a semanas (Hemminki, 1973; Forgue & Dahl, 1978; Safaei & Fisher, 1990). Aún cuando trabajos recientes indican que existe un grupo de proteínas con vidas medias muy superiores a lo primariamente estipulado (algunas llegando a durar varios años) (Cohen et al., 2013; Dörrbaum et al., 2018; Heo et al., 2018; Ko et al., 2018; Mathieson et al., 2018), la incongruencia persiste, ya que este no es el caso de los neurofilamentos. Si bien la asociación de enfermedades neurodegenerativas con defectos en el transporte axonal indica un rol clave de este mecanismo en el correcto mantenimiento de los axones (Millecamps & Julien, 2013), la existencia de mecanismos que proporcionen nuevas proteínas a nivel local permitiría una respuesta rápida y adecuada a las señales externas en diferentes circunstancias.

A principios de la década del 2000 dos estudios independientes demostraron de manera convincente que la síntesis de proteínas axonales (**Fig. 1**) es necesaria para procesos biológicos específicos, como las respuestas quimiotrópicas de los conos de crecimiento (Campbell & Holt, 2001) y la potenciación de la liberación de neurotransmisores (Zhang & Poo, 2002). Estos descubrimientos llevaron al renacimiento del campo de la síntesis local de proteínas en los axones. Son abundantes los avances que se han logrado en estos años respecto a la capacidad que poseen los axones de sintetizar proteínas localmente, tanto durante el desarrollo, en la edad adulta, como frente condiciones patológicas. Estos avances fueron revisados y recopilados en el Trabajo I de la presente tesis (Farias et al., 2019), haciéndose énfasis en los trabajos realizadas a escalas "ómicas" para caracterizar el proteoma axonal.

Por otro lado, desde principio de los años setenta ha sido documentado en diversos estudios que existe un mecanismo de transferencia (**Fig. 1**) de proteínas desde la glía hacia el axón (revisado en Tytell et al., 2016). Estudios realizados en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) demostraron que las células de Schwann no sólo transfieren proteínas a los axones sino también ARNs (Benech et al., 1982; Lopez-Verrilli et al., 2013; Sotelo el al., 2013) y ribosomas (Kun et al., 2007; Court et al., 2011; Müller et al., 2018). Recientemente, fue posible cuantificar la contribución relativa de la célula de Schwann al conjunto de ribosomas axonales, tanto en nervios ciáticos normales como lesionados. Curiosamente, se demostró que los niveles de ribosomas axonales aumentan después de una lesión, siendo las células de Schwann una fuente predominante de ribosomas en los axones del SNP (Müller et al., 2018).

Si bien estos tres mecanismos de abastecimiento de proteínas al axón son complementarios (**Fig.** 1), el aporte relativo que cada uno realiza al proteoma axonal podría variar de acuerdo al estadio o condición del axón.

Rol de la síntesis local axonal en la regeneración, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas.

Como se mencionó anteriormente, el trabajo del grupo de Holt, realizado a principios de los años 2000, demostró de manera concluyente que la síntesis local de proteínas es necesaria para las respuestas quimiotrópicas de los axones a señales de orientación atractivas y repulsivas (Campbell & Holt, 2001). A partir del mismo se evidencia una fase extremadamente productiva de investigaciones acerca del rol de la traducción local en axones en desarrollo, y es actualmente aceptado que la síntesis local de proteínas en los axones es crucial para el comportamiento del cono de crecimiento, la guía de axones durante la búsqueda de sus blancos, el mantenimiento del axón y la señalización retrógrada en axones en desarrollo (revisado en Trabajo I). Sin embargo, se conoce mucho menos sobre el alcance y la importancia de la síntesis local de proteínas en los axones maduros.

En procesos de regeneración, se ha documentado que tanto la síntesis como la degradación local de proteínas es necesaria para la formación de un nuevo cono de crecimiento luego de una axotomía en axones en desarrollo *in vitro* (Verma et al., 2005). Así mismo, al lesionarse axones maduros, los ARNm y la maquinaria de síntesis de proteínas se reclutan rápidamente en los axones y la traducción local axonal aumenta (Zheng et al., 2001; Hanz et al., 2003; Willis et al., 2005; Ben-Yaakov et al., 2012). Las proteínas sintetizadas localmente son necesarias para la comunicación entre los axones lesionados y su soma, y probablemente participen en la formación del bulbo de crecimiento en el sitio de la lesión (Yoo et al., 2010; Perry et al., 2012).

El aumento de la síntesis local de proteínas en axones en respuesta a la lesión nerviosa ha sido el primer ejemplo del rol que posee la traducción local en situaciones patológicas. Recientemente, se han investigado los cambios que ocurren a nivel axonal en modelos de enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, algunos casos de esclerosis lateral amiotrófica son causados por mutaciones en la proteína de unión al ARN TDP-43 (Transactive response DNA binding Protein 43 kDa), lo que lleva a un transporte deficiente de ARNs hacia el dominio axonal (Alami et al., 2014). Por otro lado, la atrofia muscular espinal es causada por mutaciones en el gen SMN1

(Survival of Motor Neuron 1), que codifica la proteína SMN (Survival Motor Neuron protein). La disminución de los niveles de SMN altera la localización axonal de los ARNs asociados a los gránulos que contienen SMN (Rage et al., 2013).

Por otro lado, se ha reportado que existe una extensa pérdida de axones durante el envejecimiento normal, la cual precede a la pérdida de los cuerpos celulares neuronales (Spencer & Ochoa, 1981; Chung et al., 2017). Por este motivo, resulta interesante comprender cuál es la base molecular involucrada en el desarrollo, mantenimiento y envejecimiento de las neuronas, haciendo énfasis en lo que ocurre a nivel axonal. Dos trabajos se centraron en caracterizar el repertorio de ARNs presentes en el cono de crecimiento (Zivraj et al., 2010) o axón (Gumy et al., 2011) durante el desarrollo. Ambos trabajos encontraron que la localización de ARNs en el dominio axonal está regulada dinámicamente con la edad, adaptándose a las demandas funcionales de cada estadio. Por otro lado, al estudiar los ARNs asociados a ribosomas en terminales axonales *in vivo* se observó que el translatoma axonal se compone de dos partes, una constitutiva y la otra más específica de la etapa (Shigeoka et al., 2016), demostrando que el repertorio de proteínas sintetizadas localmente en diferentes estadios puede variar según las necesidades funcionales del mismo.

Análisis "ómicos" de axones maduros y mielinizados: estrategias para su estudio.

En la última década se han realizado grandes avances que nos acercan al entendimiento del proceso de síntesis local axonal. La posibilidad de estudiar los componentes axonales a escalas "ómicas" se produjo principalmente gracias a los avances tanto en las técnicas de cultivo compartimentalizado de neuronas (Taylor et al., 2005; Campenot et al., 2009), que permiten la separación del dominio somatodendrítico del axonal, como también a los avances en la sensibilidad de las técnicas de extracción, amplificación e identificación de ARNs (microarreglos y RNA-Seq). Si bien la presencia de un ARNm en el axón no implica su traducción *per se*, da indicios del repertorio de posibles proteínas a ser traducidas localmente en el axón. Actualmente, hay casi 20 publicaciones que estudiaron el transcriptoma axonal proveniente de diversos tipos neuronales y condiciones fisiológicas, la mayoría de ellos obtenidos de sistemas de cultivo celular *in vitro* (revisado en Farias et al., 2019, Trabajo I). Sin embargo, el repertorio de ARNm disponible para traducirse localmente en axones *in vivo* continúa siendo poco conocido.

La particular morfología que presentan las fibras nerviosas, con axones envueltos por la vaina de mielina (formada por células gliales), implica un gran desafío para el estudio bioguímico y molecular de los componentes de axones in vivo. Para ello, es fundamental lograr separar y purificar el axoplasma del citoplasma somático y de otras células circundantes. Los primeros trabajos realizados en axones in vivo utilizaron como modelo los axones gigantes del calamar. Estos axones proporcionan un modelo biológico único para analizar la bioquímica y biología celular del axón, ya que pueden superar las 500 um de diámetro y pueden disecarse fácilmente mediante extrusión mecánica (Fig. 2A). Este método fue ampliamente utilizado tanto por el grupo de Giuditta, para el análisis de síntesis local axonal (revisado en Koenig & Giuditta, 1999), como por el de Brady y Lasek, para el análisis del transporte axonal rápido (Song et al., 2016; revisado en Roy, 2014). Por otro lado, los axones de Mauthner de peces dorados también fueron un modelo biológico ampliamente utilizado. El aislamiento del axón de Mauthner se realiza mediante la técnica de microdisección de axones, originalmente desarrollada por Koenig (1979). Con este método es posible obtener axones desnudos "in toto", extravendo el axoplasma de la envoltura mielínica mediante la utilización de pinzas de microdisección. El método se basa en el comportamiento del axón como un gel viscoelástico debido al abundante contenido de neurofilamentos (Gilbert, 1975). La resistencia a la tracción que se requiere para el aislamiento depende del diámetro del axón y del contenido de neurofilamentos (Gilbert, 1975; Koenig, 2009). Utilizando la microdisección de axones fue posible reportar ARNr en axones de vertebrados (Koenig, 1979), y describir los dominios ribosomales periaxoplasmicos (PARPS, del inglés Periaxoplasmic Ribosome Plaque) (Koenig & Martin, 1996).



Figura 2. Imágenes de axoplasmas obtenidos mediante diferentes métodos . A. Axón gigante de calamar aislado mediante extrusión mecánica. Imagen tomada de Mathur et al., 2018. **B.** "Ramilletes" de axones derivados de raíces espinales ventrales de conejo aislados mediante micro-disección de axones. Escala: 1 mm. Imagen tomada de Koenig et al., 2000. **C.** Imagen de microscopia electrónica de una sección longitudinal de nervio ciático luego de la separación manual de los fascículos y la incubación durante 2 horas en medio hipotónico (0.2X PBS). Ax: axón. Imagen tomada de Rishal et al., 2010.

El método de microdisección también fue utilizado para el estudio de axones periféricos de mamíferos, provenientes de motoneuronas en las raíces medulares (**Fig. 2B**). Debido al menor diámetro que poseen estos axones en comparación al axón de Mauthner, el nervio es desnaturalizado en soluciones de zinc previo a su microdisección. La desnaturalización transforma el gel viscoelástico axonal en un sólido plástico, lo que mejora la resistencia a la tracción y permite el aislamiento de axones desnudos "*in toto*" de fibras de diámetro pequeño (revisado en Koenig, 2009). Esta transformación se basa en la inhibición dependiente de zinc de la proteasa activada por calcio endógena, la cual degrada a los neurofilamentos en presencia de una concentración elevada de calcio (Gilbert, 1975; Frankel y Koenig, 1978). El método de microdisección fue ampliamente utilizado tanto por Koenig como por nuestro grupo para caracterizar los componentes de la maquinaria traduccional en axoplasmas, principalmente los de las PARP (Koenig & Martin, 1996; Koenig et al., 2000; Sotelo-Silveira et al., 2004, 2008; Kun et al., 2007; Calliari et al., 2014).

A su vez, el método de extrusión "bioquímica" de axoplasma es también utilizado para el estudio de axones periféricos de mamíferos *in vivo* (**Fig. 2C**). Este método se basa en la incubación de nervios periféricos en medio hipotónico (Rishal et al., 2010), proceso que separa la vaina de mielina del axón. El método fue desarrollado y ampliamente utilizado por el grupo de Fainzilber, principalmente para el análisis axonal a nivel proteico (Rishal et al., 2010; Michaelevski et al., 2010a; Michaelevski et al., 2010b; Terenzio et al., 2018).

Los tres métodos anteriormente mencionados han sido utilizados para el estudio de los componentes de axones in vivo a nivel "ómico". El grupo de Giuditta realizó los primeros aportes, analizando una genoteca de ADNc a partir del ARN extraído de axones gigantes de calamar (Gioio et al., 1994). Recientemente, estos datos fueron ampliados, publicándose por primera vez el transcriptoma de axones in vivo (Mathur et al., 2018). Este último trabajo describe alrededor de 8000 ARNm presentes en el axón gigante y, adicionalmente, muestra que proteínas de membrana pueden sintetizarse localmente e insertarse en la membrana axonal (Mathur et al., 2018). Por otro lado, durante la tesis de doctorado de José Sotelo-Silveira, se comenzó con la exploración de los ARNs localizados en axones adultos de vertebrados, utilizando la técnica de microdisección de axones asociada a la secuenciación de ESTs (marcador de secuencia expresada, del inglés Expressed Sequence Tag). En este trabajo se destaca la identificación de ARNs mitocondriales (tanto ARNm como ARNr), así como también ARNm codificantes de motores moleculares y proteínas ribosomales, entre otras (Sotelo-Silveira, 2003). Por otro lado, durante mi tesis de Maestría comenzamos con la caracterización del transcriptoma de axones in vivo de mamíferos, utilizando la técnica de microdisección de axones con algunas modificaciones. Los controles de calidad realizados a las muestras axoplásmicas indicaron que este método es útil para el análisis

de los componentes axonales a niveles "ómicos", ya que se alcanza una buena purificación del citoplasma axonal, reduciendo los contaminantes gliales. Los datos obtenidos mostraron que los axones *in vivo* presentan un número de ARNs considerablemente menor al reportado para axones *in vitro*. A su vez, una gran proporción de los ARNm localizados en los axones codifican proteínas de función mitocondrial, traduccional y citoesquelética (Farias, 2014). Por último, el grupo de Fainzilber ha utilizado la técnica de extrusión de axones para caracterizar tanto el proteoma de axones periféricos de mamíferos (Rishal et al., 2010), como las modificaciones que ocurren en el mismo en respuesta a una lesión (Michaelevski et al., 2010a; Michaelevski et al., 2010b).

En la última década se realizaron múltiples avances acerca de la síntesis local de proteínas en el dominio axoplásmico, y cuál es el rol funcional de esta fuente de proteínas en diferentes condiciones. Grande es el esfuerzo que varios grupos de trabajo, incluido el nuestro, están realizando para poder entender este proceso y sus implicancias en condiciones *in vivo*.

Como se mencionó anteriormente, la evidencia que existe hoy en día en cuanto a los aportes de la síntesis local axonal en diferentes condiciones es muy vasta. Al comenzar esta Tesis, el primer paso fue realizar una revisión exhaustiva del estado actual del arte en lo que respecta al transcriptoma de axones y la síntesis local axonal, la cual fue publicada recientemente y se presenta a continuación como Trabajo I.

En este trabajo se hace especial hincapié en los estudios realizados a escalas "ómicas", donde se describen el transcriptoma, traductoma y proteoma de axones. A su vez, también se comentan diversos trabajos donde se demuestra la síntesis local de algunas proteínas candidatas y las posibles ventajas que traería acarreado la síntesis de las mismas en el axón (e.g., mecanismo favorable energéticamente debido a que de una molécula de ARNm se pueden sintetizar varias copias de la proteína, permite una rápida respuesta frente a estímulos locales, permite un recambio de proteínas nuevas por sus pares dañados, ampliando el tiempo de vida media de complejos proeticos u organelos, y proporciona oportunidades para un procesamiento postraduccional único, el cual es crucial para funciones específicas en el compartimento axonal maduro). Por último, se destacan los desafíos actuales que quedan por resolver y las nuevas metodologías disponibles para definir la proteostasis del axón.

TRABAJO I

Toward axonal system biology: genome wide views of local mRNA translation

Joaquina Farias, José R. Sotelo, and José R. Sotelo-Silveira

Toward Axonal System Biology: Genome Wide Views of Local mRNA Translation

Joaquina Farias, José Roberto Sotelo, and José Sotelo-Silveira*

Neurons present a highly polarized morphology, often displaying a significantly imbalanced distribution of the cytoplasm between the somatic and axonal domains. This imbalance requires cell-specific mechanisms for the maintenance of the axoplasmic mass during development, neuronal homeostasis, and recovery after injury. Although it has been clearly demonstrated that axoplasmic transport contributes a large amount of proteins to the axons, local protein synthesis has been fully accepted as an important complementary source of proteins, which aids in the maintenance of the axoplasmic mass in both normal and regenerating conditions. This review analyzes and highlights the most important advances in the knowledge of the axonal transcriptome, translatome, and proteome at a genome-wide scale. It is discussed how this knowledge has provided researchers with new insights regarding the involvement of local protein synthesis in many key neuronal functions. In addition, challenges, open questions, and methods currently available to study axonal mRNA localization and protein synthesis are addressed.

1. Introduction

Neurons often possess elaborate axonal and dendritic arbors, and it is frequently implied that the cytoplasm in axonal projections exceeds that of the soma by orders of magnitude. This cytoplasm mass can be localized at distances up to meters away from the nucleus. The significantly imbalanced distribution of the cytoplasm between the soma and axon domains requires cell-specific mechanisms to maintain this axoplasmic mass during development, neuronal homeostasis, and recovery after injury. The nature of these mechanisms has been a strong venue of research in neuroscience for decades. Although it has been clearly demonstrated that axoplasmic transport contributes large amount of proteins to the axons (reviewed in [1,2]), it is now accepted that local protein synthesis (reviewed in [3-5]) and the transference of macromolecules from glia to axons (reviewed in [6,7]) are additional and important sources of proteins that help in the maintenance of axoplasmic mass.

J. Farias, Prof. José Roberto Sotelo Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable Montevideo, CP 11600, Uruguay

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under https://doi.org/10.1002/pmic.201900054

DOI: 10.1002/pmic.201900054

This review analyzes and highlights the main advances made towards understanding the axonal proteome, and the contribution of local protein synthesis to axonal proteome dynamics under different conditions. In the last decade there has been a wave of system biology approaches focused on axons (mainly in vitro studies) using transcriptomic and proteomic approaches that are being very useful to delve into the basis of axonal proteome dynamics and assembly. These, in turn, generate challenges, open questions and new methodologies to define axon proteostasis.

2. Assembling the Axonal Proteome from Complementary Sources: Axonal Transport, Local Protein Synthesis, and Glial-to-Axon Transfer

Axoplasmic transport is the process by which organelles, proteins, and RNA synthesized in the neuronal cell body are delivered to the axon (reviewed in ref. [8]). "Fast" (200–400 mm per day) and "Slow" (0.1–20 mm per day) moving components were described early using pulse-chase labeling approaches. The "fast axonal transport" includes membrane bound proteins and organelles, but it was striking that cytoskeletal elements move very slowly (reviewed in ref. [1]). Although molecular motors were identified as the movers of fast transport, the mechanisms for the slow movement of cytoskeletal proteins were obscure for decades. In 2000, Brown and colleagues focusing on neurofilaments determined that the slow net velocity of this transport is due to short-lived motor-driven movements punctuated by extended pauses.^[9] There is still an ongoing debate as to whether there are two modes of transport, or a single mode, albeit at

J. Farias, Prof. J. Sotelo-Silveira Departamento de Genómica Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable Montevideo, CP 11600, Uruguay E-mail: jsotelosilveira@iibce.edu.uy Prof. J. Sotelo-Silveira Sección Biología Celular Facultad de Ciencias, Universidad de la República Montevideo, CP 11400, Uruguay



different transport speeds. It was recently proposed that fast and slow transport may not be two modes of transport, but rather are single versus multi-motor transport.^[10]

As noted above, the axon provides an unusual situation in which a large fraction of the cytoplasm is separated from the primary protein synthetic machinery by distances up to meters. Considering the rates of axoplasmic transport and the lifetimes reported earlier for some proteins,^[11] it is questionable if this mechanism is able to adequately supply proteins to axons with large dimensions. The case of cytoskeletal proteins is interesting, since a large proportion of axoplasmic proteome belongs to this category. In particular, neurofilaments would require to travel from cell bodies for extended periods of time in very long axons,^[12] implicating that these proteins would need to have a long half-life. In the context of neurons, key progress has been made studying the half-life of proteins, aiming at characterizing protein kinetics in process such as learning, memory formation, and maintenance.[13-16] These studies revealed that neurofilaments have a half-life of days in cultured neurons,^[13,14,17] in accordance with the results obtained for heavy neurofilaments by transient transfection with green fluorescent protein under the control of an inducible promoter.^[18] Interestingly, in the synaptosomes of in vivo hippocampal neurons, neurofilament half-life can reach up to 3 months.^[16] These new data reveal a surprising capability for regulating the half-life of these very important structural proteins of the axon, opening a window to new research. However, it still does not clarify the initial question posed regarding if these proteins can survive lengthy journeys at the slow axoplasmic transport pace. Furthermore, it has been demonstrated that proteins with long half-lives can have high translation rates,^[19] indicating that the particular characteristic of having long half-lives is not necessarily determined by their levels of expression.

The association of neurodegenerative diseases with defects in axonal transport indicates that this mechanism has a key role in the correct maintenance of axons.^[20] As we describe in section 4, it is important to take into account that the existence of local mechanisms for providing the axons with new proteins allows for a fast and appropriate response to external cues during development and recovery after injury. These local mechanisms also have a role in disease conditions.

An axonal proteome picture will not be complete unless we take into account the contribution of glial cells. The transference of proteins from glia to axons has been documented in various studies since the early nineteen seventies (reviewed in ref. [21]). Schwann cells transfer not only proteins to axons but also RNA^[22-24] and ribosomes.^[25-28] The relative contribution of Schwann cell to the axonal pool of ribosomes has been recently quantified in normal and injured sciatic nerves. The levels of axonal ribosomes increase after injury and, in these cases, the Schwann cells are a predominant source of ribosomes in axons of peripheral nervous system (PNS).^[27] Although these studies speak to the complementarity of sources of axonal RNA and proteins, the characterization of the full mRNA complexity in the axonal territory was only accomplished in the past decade. This task was achieved through considerable efforts to develop genomic approaches to characterize the mRNAs localized and translated in the axon.



Joaquina Farias is presently in the last year of her Ph.D. in cellular and molecular biology at Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas—PEDECIBA, UdelaR—(Montevideo, Uruguay). Her current research (under José Sotelo Silveira advisorship) focuses on the identification of mRNAs local-

www.proteomics-iournal.com

ized in axons of mature myelinated peripheral neurons and the study of their changes through aging.



José Roberto Sotelo (right) devoted most of his scientific career to understand the cell biology of axon maintenance and repair. In particular, at the peripheral nervous system,

Sotelo's key contributions supporting the hypothesis of local mRNA translation in the axonal compartment include the early demonstration of protein translation in sciatic nerve axons, the presence of ribosomes in axons, and also the transference of RNA from glia to axons.

José Sotelo Silveira (left) (Sotelo's son) also joined, in the mid-1990s, the efforts to unravel the mechanism of local protein synthesis in axons working together with Edward Koenig (SUNY Buffalo, NY), focusing on the molecular characterization of periaxoplasmic ribosomal plaques (PARPs), as translation centers in the axon. Now he leads a Genomics laboratory at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable at Montevideo Uruguay.

3. Transcriptomic, Translatomic, and Proteomic Data of Axons: Key Advances in the Understanding of Axonal Protein Synthesis

Evidence of translational machinery in adult myelinated axons was initially difficult to find, but it is increasingly clear that ribosomes are located at the initial segment, discrete ribonucleoprotein particles at the axon core, or in the actin cortical layer of the axon in domains called Periaxoplasmic Ribosomal Plaques or PARPs (reviewed in ref. [29]). In addition, many efforts have been directed since the early seventies to elucidate whether axons have the capability to translate proteins (reviewed in ref. [29]) or not. A series of elegant experiments provided robust evidence of local synthesis in axons in vivo, using transgenic mouse models.^[30–32] Thus, solid support was provided for mRNA localization and local protein synthesis of particular proteins (β -actin^[30,31] and importin $\beta 1^{[32]}$) in adult sensory axons in vivo. This was put forth as an important mechanism in the response to injury of adult sensory axons. Additionally, this discovery has opened several venues of research that would lead to a better understanding of the mechanisms of RNA transport in mature axons.^[33]

The number of mRNAs that are available to be translated locally in the axon was still an open question until now.

www.advancedsciencenews.com

Proteomics-journal.com

 Table 1. Summary of axonal transcriptome, translatome and proteome profiles.

	Type of neuron (animal)	Stage	Method	No. of RNAs detected in axons	Enriched GO terms	Observation/Comments	Reference
Transcriptomic	DRG injury- conditioned (Rat)	Adult	Microarray	206*	Transmembrane proteins, translation	Identification of the positive roles of neurotrophins in stimulating mRNA localization	[36]
	Cortical (Rat)	E18	Microarray	Naive: ≈310*	Translation, intracellular transport, cytoskeleton, mitochondria	First evidence that matured cortical axons contain mRNA	[37]
				Regenerating: \approx 850 [*]	Cell-cell signaling, cell differentiation, secretion		
	Sympathetic neuron (Rat)	P1	SAGE	≈350	Mitochondria, signal transduction, translation, cytoskeleton		[38]
	RGC (<i>Xenopus -X-</i> Mouse-M)	, Stage 24 (X) Stage 32 (X)	Microarray	171 [*] 444 [*]	Translation, metabolic/glycolytic cytoskeleton	, The transcriptome of growth cones is regulated dynamically	[39]
		E16 (M)		1800*	Translation, mitichondria, axon guidance	with age	
	DRG (Rat)	E16	Microarray	2627*	Translation, mitochondria, neurological disease, cytoskeleton, axon guidance	Comparative profiling of "young" (pathfinding) vs "old" (target-arriving) growth cones	[40]
		Adult		2924 [*]	Translation, mitochondria, neurological disease, inflammatory, and immune response	revealed that the number and complexity of transcripts increases dramatically with age	
	CA1 synaptic neuropil (Rat)	Adult	RNA-Seq	2550 (dendritic-axon)	Synapsis related proteins, translation, degradation of proteins	Synaptic region (dendrites and axons). First RNA-Seq study	[41]
	Cortical (Mouse)	E16	qPCR	105 miRNAs (6 [*])		Identification of miRNA in axons	[42]
	DRG (Mouse)	E13.5	RNA-Seq	6118	Translation, mitochondria, cytoskeleton, intracellular trafficking	First transcriptomic analysis at nucleotide level resolution of sub cellular compartment.	[43]
	Hippocampal (Rat) [#]	E18	RNA-Seq	775 mRNAs changes levels with A $\beta_{1.42}$ treatment	Cell death, transcription, intracellular signaling cascade	Alteration of mRNAs levels when axons are treated with $A\beta_{1.42}$	[44]
	Motorneuron (Mouse) [#]	E12.5	Microarray	Wild-type axons Smn-deficient axons Down-regulated Up-regulated	Translation, protein transport, mitochondria, RNA-binding Synaptic localization Translation, protein localization, RNA-binding	Study performed in a SMA model (knockdown of Smn protein)	[45]
	Motorneuron (Mouse)	E12.5	RNA-Seq	>11.000 (468*)	Translation, actin binding, cell cycle,	Identification of non-coding RNA species in axons, specially IncRNAs	[46]
	N2A y CAD cells	E18.5	RNA-Seq	778 in common	Translation, mitochondria, proteasome	Identification of hundreds of alternative 3' UTRs associated with mRNA localization to neurites	[47]
	Motorneuron (Mouse) [#]	E12.5	RNA-Seq	mRNAs: 16391 (1812*)	Translation, acting binding, cytoskeleton, metabolic process	Study performed in two ALS models (SOD1 ^{G93A} and TDP43 ^{A315T})	[48]
				miRNAs: 401 miRNA (34 [*])	-		
				SOD1: 95 up- and 80 down-regulated	Calcium ion binding, extracellular matrix binding, motor activity, cargo receptor activity, and monosaccharide binding		
				TDP43: 176 up- and 271 down-regulated			

(Continued)

www.advancedsciencenews.com

Proteomics-journal.com

Table 1. Continued.

	Type of neuron (animal)	Stage	Method	No. of R	NAs detected in axons	Enriched GO terms	Observation/Comments	Reference
	hESC-neurons: — Microarray 3696 (highest ex glutamatergic transcripts)		nest expressed pts)	Translation, mitochondria, cytoskeleton, extracellular proteins	-	[49]		
	mESC: iNeurons	_	RNA-Seq	18111 (129	92*)	Regulation of cell migration, angiogenesis	Mass spectrometry, RNA-seq, Ribo-seq, and bioinformatic analyses to identify neuronal proteins and RNAs with distinct patterns of localization and translation in neurites and some	[50] A
	iCell neurons: GABAergic and glutamatergic	_	RNA-Seq	≈930		Translation, protein targeting to endoplasmic reticulum, and mRNA metabolism	 Single-cell nanobiopsy: subcellular mRNA pools showed great mosaicism, cell regions are fundamentally different from each other in terms of their mRNA composition 	. [51]
	Gigant axon of Stellate cell (Squid)	Adult	RNA-Seq	≈8000		Translation, protein modification and folding	First transcriptome of in vivo axons	[52]
	Type of neuron (animal)	Stage	Technique u	sed No	o. of RNAs detected	Enriched GO terms	Observation/Comments	Reference
Translatomic	R cell (Drosophila)	Pupa	T-TRAP (Rpl	10)	9806	Cell surface proteins, phototransduction	Characterization of global patterns of gene expression during conversion of a growth cone to a presynaptic terminal	[57]
	RGC (Mouse)	E17.5	axon-TRAP (Rpl22)		1783	Neuron projection morphogenesis, axon extension	RGC axonal translatome changes in a developmental- stage-specific manner, proteins	[58]
		P0.5			2117	Neuron projection developmen	t that play a key role at specific periods are synthesized when	
		P7.5			1419	Neuron remodeling		
		Adult			1217	Regulation of synaptic transmission	needed	
	mESC: iNeurons (Mouse)	_	Ribo-Seq		_	_	The authors adapted the original methodology of Ribo-Seq to low input amount of axonal ribosome footprints	[50]
	Cortical (Mouse)	P21	Synap-TRAP (Rpl10a)	13	398 (153*)	Cytoskeleton, synapse, cell projection, regulation of cell shape	Carefully look on the TRAPped mRNAs lists indicate presynaptic markers associated with ribosomes	[59]
	Type of neuron (animal)		Stage I	No. of proteins detected	s Enric	hed GO terms	Observation/Comments	Reference
Proteomic	mESC: iNeurons		— Pr	oteome: 7323 (661 [*])	Cytoskeleto trafficking molecule	n, vesicular mRNAs g, adhesion appro s, synaptic markers neuri	enriched in neurites encode ximately half of the te-localized proteome, ribo-seq	[50]
	Nascent proteome: :		ascent proteome: 380	Translation, protein folding, ne: 380 cell-cell adhesion, regulation cytoskeleton		confirmed that this group of genes shows higher relative translation in neurites		
	Cortical (Rat)		E18 Pr	oteome: 2548 (103 [*])	Proteins co organelle	nstituent of s, cytoskeleton		[64]

(Continued)

www.advancedsciencenews.com

Table 1. Continued.

Type of neuron (animal)	Stage	No. of proteins detected	Enriched GO terms	Observation/Comments	Reference
RGC (Xenopus)	E34-36	Proteome: > 1000 Nascent proteome: ≈350	— Translation, proteasome, extracellular region part	Characterization of basal and cue induced axonal nascent proteome, providing data of the magnitude and dynamics of de novo protein regulation	[65]
		Nascent proteome in response to cues: 300	Cytoskeletal, cell adhesion, nuclear proteins and proteins involved in endo- and exocytosis, and several proteasomal subunits were similarly regulated by all three cues		

*Number of mRNAs enriched in axonal domain; #Models of neurodegenerative diseases. DRG, dorsal root ganglion; GO, gene ontology; RGC, retinal ganglion cell; mESC, mouse embryonic stem cell; hESC, human embryonic stem cell; TRAP, translating ribosome affinity purification.

Transcriptomic approaches have been recently used to make progress in the field. Although the localization of a transcript does not imply that it is locally translated per se, it does provide evidence, from a genome wide (or "omic") point of view, of the repertoire of transcripts present in different types of axons. This progress was possible thanks to advances both in neuronal cell culture techniques (allowing for the separation of cell bodies from axons^[34,35]) and in mRNAs identification techniques (first microarrays and later more sensitive and comprehensive RNA-Seq methods). There are currently almost 20 publications where axonal transcriptome of different species, diverse neuronal types, and physiological conditions were studied (**Table 1**), most of them obtained from in vitro cell culture systems.^[36–52]

The gene ontology (GO) analysis of the mRNAs enriched in axons compared with the soma reveals many shared GO terms (also analyzed in ref. [53]), including those related to translation, mitochondria, and cytoskeleton. Other categories are represented in some data sets, for example intracellular trafficking,^[37,43] axon guidance,^[39,40] and synaptic-related proteins^[40,41] (Table 1). It must be considered that most of these studies report analyses performed only on the axonal-enriched mRNAs in comparison with the somatodendritic domain mRNAs, and not all the mRNAs identified in this domain. This lessens the functional relevance of core mRNAs likely localized both in cell bodies and axons. Such as β -actin, which usually does not appear enriched in axons but which is locally synthesized^[54–56] and is possibly functional after being produced locally^[56] (see Section 4).

Axonal transcriptomics of in vitro neuronal models were also investigated in the context of two important motor neuron degenerative diseases: amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and spinal muscular atrophy (SMA). In studies of SMA motor neurons, it was observed that the RNA binding protein Smn downregulated many axonal transcripts enriched for biological processes related to RNA processing and codified proteins located in neuron projections including axons and growth cones.^[45] Using two ALS models, alterations in mRNA and miRNA profiles from neurons expressing ALS-related mutations were characterized for both the soma and the axons.^[48] Studies in these models of neurodegenerative diseases provide evidence that subcellular localization of mRNAs of diverse functions is disturbed and likely contributes to the pathology of the disease. This is of great value to further investigate the biology of motor neurons and develop therapeutic approaches to tackle neurological disorders.

To understand how localized mRNAs contribute to the steady state proteome of the axon, we need to pinpoint which of them are actually being translated. The development of the translating ribosome affinity purification (TRAP) methodology has contributed to this aim. Here, a tagged ribosomal protein is expressed using transgenesis in specific neurons and then isolated by affinity purification together with the mRNAs being translated at that moment (the translatome). To be effective in answering which mRNAs are axonally translated, neurons must have cell bodies and axons anatomically separated. In 2016, two studies used the TRAP technology, one in R cells of fruit fly^[57] and the second on retinal ganglion cells of mouse.^[58] The results obtained showed a changing landscape of local translatome during axon development, expressing proteins required for stage-specific events (Table 1). In addition, the translatome of mature axons in the central nervous system (CNS) was reported for the first time, revealing translation of functional categories associated to axon survival, neurotransmission, and neurodegenerative disease.^[58] By combining the TRAP methodology with subcellular fractionation, the translatome of the synaptoneurosomal fraction of cortical neurons in vivo was reported and shown to be enriched in mRNAs encoding cytoskeletal and synaptic proteins (Table 1). The methodology developed (SynapTRAP) could be a good approximation to identify perturbations in local translation in disease models, such as Fragile X syndrome or Autism Spectrum Disorder.^[59] The TRAP method is very useful because it permits the study of mRNAs most probably translated in axons in vivo. However, ribosomes in the axon domain originating from a source other than soma, like the glial cells, would not be analyzed in the TRAP experiments, likely resulting in the acquisition of partial pictures of the axonal translatome, for example in injury conditions.^[27]

Recent studies have gone a step further to characterize the axonal proteome. The first studies performed large-scale proteomic analysis of axonal growth cones,^[60,61] identifying almost 2000 proteins in this axonal domain.^[61] Chekulaeva and colleagues analyzed protein and RNA expression, as well as their translation rates in isolated cell bodies and growing neurites at a genomewide scale (Table 1). It was proposed that mRNA localization is the primary mechanism for protein localization in neurites, comprising half of the neurite-localized proteome.^[50] In addition, the authors assessed translation rates by Ribo-Seq (for review of the technique see refs. [62,63]) observing that this group of mRNAs shows higher relative translation in neurites. This study was the first to combine omics analysis at different layers of gene expression, providing data of the local transcriptome, the local translatome, and the local proteome in neurites.^[50] The later study identified \approx 7000 proteins, and Chang and colleagues analyzed the proteome of cortical axons (Table 1), identifying ≈ 2500 proteins containing constituents of organelles (such as mitochondria, ribosome, endoplasmic reticulum) and cytoskeleton.^[64] Finally, the data obtained by the Holt laboratory reveal that approximately one-third of the axonal proteome is synthesized locally under basal conditions (Table 1). The analysis of the nascent proteome under different cues provided information about the dynamics of the novo protein regulation.^[65] Regulation of local translation in vivo in different situations regarding, for example, the role of major regulatory pathways involved in control of translation in the mature axon^[66–69] is also extremely interesting.

4. Axonal Local Translation Is Involved in Key Aspects of Cell Biology of the Neuron

The studies discussed Section 3 show that the core components of the translational machinery are present and are functional in developing and mature axons, both in vitro and in vivo. Recent evidence indicates that local protein synthesis has an important role in many aspects of neuronal development, during regeneration as well as in neuronal homeostasis in adult neurons (reviewed in refs. [70,71]).

During axon pathfinding, the growth cones receive and integrate several signals from the environment on route to their synaptic partner. It was demonstrated that this process is affected by the inhibition of protein synthesis since the growth cones are not able to respond to different cues,^[72] although axons separated from their cell body continue to grow.^[73] A series of experiments performed in growth cones in vitro identified that attractive cues (Netrin-1, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF)) induce local and asymmetric increase of axonal protein synthesis of cytoskeletal components^[54,55] or assembling complex.^[74] Conversely, repulsive cues (Sema3A, Slit2) induce the local synthesis of proteins involved in the cytoskeletal disassembling (RhoA,^[75] cofilin^[76]), even producing a growth cone collapse. Additionally, appropriate navigation of spinal cord commissural axons to their targets requires intra-axonal translation of the Eph receptor A2 (EphA2).^[77]

Once the target is reached, the axon can branch, forming terminal arbors which establish connections with the post-synaptic counterpart (reviewed in ref. [78]). It has been shown that translation machinery and mitochondria are located at the site where the branch will occur (**Table 2**).^[56,79,80] In in vivo experiments, it was shown that axon branches are formed at sites where RNA granules and mitochondria dock. More specifically, local translation of β -actin contributes to the stabilization of new branches, and most likely helps in branch emergence.^[56] Newly synthesized nascent proteins may provide opportunities for unique post-translational processing crucial to specific functions in the mature axonal compartment.^[81,82] For example, it has been proposed that newly synthesized β -actin can polymerize or nucleate polymerization more efficiently than "older" actin due to chaperone binding to the nascent β -actin chain (reviewed in ref. [83]).

It has also been demonstrated that local protein synthesis is necessary for a correct synaptogenesis^[84–86] (Table 2). Using polyp-lysin (PDL)-coated beads, which induce functional presynaptic terminal formation, it was observed that β -catenin^[84,86] and SNAP25^[86] are locally synthesized at nascent presynaptic sites and, moreover, that localized protein synthesis is a required step in the formation of presynaptic sites.^[86] The accumulation of the newly synthesized proteins at presynaptic terminal regulates the dynamics of synaptic vesicle release.^[84,86] In addition, the study of the Castillo laboratory provided direct evidence of ribosomes in axonal presynaptic boutons of interneurons using superresolution STORM microscopy, quantifying their nanoscale spatial distribution. The results suggest that presynaptic local protein synthesis controls neurotransmitter release during longterm plasticity in the mature mammalian brain.^[85]

In addition, several studies reveal a role of local protein synthesis in mediating communication between the axon and the nucleus of cognate neurons providing signals that promote axon survival and maintenance (Table 2). The transcriptional responses of the soma to peripheral stimuli could be elicited by transcription factors locally synthesized in axons and retrogradely transported to the nucleus (reviewed in ref. [87]). This mechanism has also been reported to be involved in the axonal transmission of the neurodegenerative signal carried by ATF4 in Alzheimer's disease.^[44] In addition, the NGF signal causes the local translation of CREB^[88] and impa 1^[38] mRNA and their retrograde trafficking to the nucleus, promoting neuronal survival by increasing CRE-dependent transcription. Moreover, it was shown that the retrograde transport of different cargos stimulated by NGF requires the local synthesis of different dynein cofactors, such as Lis1 and p150^{Glued}.^[89]

The role of local protein synthesis in mitochondrial function and viability has also been studied.^[90] For example, the protein lamin B2 is synthesized in response to extrinsic cue stimulation, regulating mitochondrial integrity and axon maintenance.^[91] Additionally, the bclw mRNA is transcribed and anterogradely transported to the axon in response to neurotrophin stimulation. The locally synthesized proteins interact with Bax, promoting axon survival through inhibition of caspasedependent apoptosis.^[92] Bclw also interacts with axonal IP₃R1 (ER-associated IP3-receptor), by inhibiting the pro-degenerative effect of IP3R1 activity.^[93] The fundamental role of mitochondria in synaptic function and the association between mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases, stimulated the study of mechanisms of axonal maintenance of mitochondrial activity. As mentioned previously, the axonal transcriptome is enriched in mRNA encoding mitochondrial proteins (Table 1), and it has also been demonstrated that many of these are translated locally (see refs. [94–98] and Table 2).

Despite the important progress the field has seen in recent years, many questions are still unanswered. Little is known

www.advancedsciencenews.com

 Table 2. mRNAs locally synthesized in axons under different conditions.



Function	Cue	Effect	mRNA translated		Cell	Reference
Axon	PKA inhibition	Repulsive	β -actin	Chicken	Retinal	[77]
pathfinding	Sema3A	Repulsive	RhoA	Rat	DRG	[75]
	BDNF/Ca ²⁺	Attractive	β -actin	Xenopus	Spinal cord	[55]
	Netrin-1	Attractive	β -actin	Xenopus	RGCs	[54]
	Slit2	Repulsive	Cofilin	Xenopus	RGCs	[76]
	NGF	Attractive	PAR complex (PAR3)	Rat	DRG	[74]
	Netrin-1	Attractive	6 :			
Branching	NGF	Inductive	WAVE1	Chicken	DRG	[79]
	NCE	Industive	Aipz	Chielen	DRC	[80]
	NGF			Chicken	DRG	[56]
	—	Stabilization and emergence	ρ-αςτιή	Xenopus	RUCS	[]
Function	Treatment	Effect	mRNA translated		Cell	Reference
Synapse formation and function	PDL-coated beads PDL-coated beads	Regulate release of synaptic vesicle Inhibition of synthesis reduced vesicle release	β-catenin SNAP25	Rat Rat	Hippocampal Hippocampal	[84] [86]
Surviving	Inhibition of protein synthesis	Decrease axon viability and mitochondrial function	_	Rat	SCG	[98]
	NGF	Axon survive	CREB	Rat / Mouse	DRG	[88]
	Transfection of miR-338	Decrease mitochondrial activity	COX IV	Rat	SCG	[94]
	Silencing local COX IV	Attenuation of axon elongation	COX IV	Rat	SCG	[95]
	NGF	Axon survive	Impal	Rat	Sympatetic	[38]
	Inhibition of lb2 in vivo	Axon degeneration, mitochondrial dysfunction, defect in axonal transport	LB2	Xenopus	RGC	[91]
	Silencing local ATP5G1	Production of ROS, attenuation of elongation of axons	ATP5G1	Rat	Sympatetic	[96]
	Knockout of importin- <i>β1</i>	Attenuates cell body transcription response to nerve injury and delays functional recovery	Importin-β1	Mouse	DRG	[32]
	Neurotrophin stimulation	Transcription, transport to axon, and translation of bclw mRNA	bclw	Rat	DRG	[92]
	Injury	Locally translated in axon after injury, transported retrogradely to modulate neuronal survival	Stat3	Rat/Mouse	Sciatic nerve and DRG	[69]
	Knockdown with miR16	Inhibition of local protein synthesis and axon growth	eIF2B2 eIF4G2	Rat	Sympatetic	[68]
	NGF	Transport of large vesicles requires local synthesis of Lis 1, while smaller signaling endosomes require both Lis 1 and p150Glued.	Lis1 p150 ^{Glued}	Rat	DRG	[89]
	Injury	Locally translated in axon after injury, transported retrogradely to modulate neuronal injury response	$PPAR\gamma$	Rat/Mouse	Sciatic nerve/DRG	[67]
	Injury	Subcellular reduction in axonal mTOR affects overall local protein synthesis in injured axons and reduces the survival of lesioned neurons	mTOR	Mouse	DRG	[66]

BDNF: brain-derived neurotrophic factor; NGF: nerve growth factor; PDL-coated beads: Poly-D-lysin (PDL)-coated beads; DRG: dorsal root ganglion; RGC: retinal ganglion cell; SCG: superior cervical ganglion.

ADVANCED SCIENCE NEWS _____ www.advancedsciencenews.com Proteomics-journal.com

about the transcriptome and proteome of axons in vivo, probably due to difficulties in isolating the axoplasm from the glia, as well as in the scarcity of material obtained under these conditions for further analysis. In addition, we still need to account for proteins and mRNA transferred from the glia as contributing partners of the axonal proteome, a scenario not yet modeled either in vitro or in vivo.

5. Challenges Ahead in the Study of Axoplasmic Omics

The particular morphology of the nerve fiber, with axons ensheathed by the myelin formed by glial cells, still makes the study the transcriptome and proteome of axons in vivo very difficult. To study the macromolecules that are present in axons, it is critical to obtain the axoplasm without traces of their cell body and other surrounding cells. There have been advances using in vitro cultures of neuronal cells which allow for the purification of axoplasm in the quantities necessary to perform both transcriptomics, translatomics, and proteomics analysis (for reference see Table 1). Nevertheless, the caveat to this approach is that conditions are still very distant from the physiological state and environment.

Techniques to isolate axoplasm from particular neurons combined with genomic approaches can still be of use, since they may represent a closer picture of the mature axon biology. Axons obtained from invertebrates like squids or vertebrates like bony fishes (Mauthner cells) or mammals (motor neurons) could be useful to generate new insights, since they are sources of pure neuronal axoplasm. Complexity estimation of a giant axon cDNA library indicated hundreds of mRNAs.^[99] This figure has now been extended to around 8000 mRNAs by RNA-seq, showing, in addition, that membrane proteins (a Drosophila K_v channel) can be synthesized and inserted in the axonal membrane,^[52] as observed earlier by van Minnen.^[100] This makes it clear that having methods to obtain mature axoplasm in large quantities is highly useful. Currently there are two other methods to study axoplasm in vivo of mammals: extrusion^[101–105] and micro-dissection^[28,106-113] of axoplasm. Mass spectrometry of extruded sciatic nerve axons yielded a total of 540 proteins.^[104,105] The micro-dissection method was used to perform biochemical analysis,^[106,107,111] immunostaining and in situ hybridization of the axoplasm.^[28,108–113] Our group has been working to perform both transcriptomics and proteomics in this preparation. Preliminary unpublished data suggest that the transcriptome of adult motor axons is less complex than that found in in vitro cultured motor axons, having common elements but also having unique mRNAs localized in the mature myelinate axoplasm. Proteomic analysis using this method in mature axons identified close to a thousand proteins (unpublished), likely leaving plenty of room for improvement to match the current sensitivity of mass spectrometers. The use of these preparations together with pulse-chase of stable isotopic amino acids, amino acid analogs, or puromycin labeling coupled with mass spectrometry protein identification could open new venues to identify the repertoire of proteins and their neosynthesis in at least projection axons from PNS.[66]

Although the micro-dissection technique was used to isolate giant axons from CNS of goldfish, short interneuron axons and many other axons cannot be isolated by this approach, due to their small diameter and their very limited accessibility. Here, the recent development of identification of newly synthesized proteins in situ, by proximity ligation assays (PLA),^[114] will greatly contribute to improve our knowledge regarding which proteins are synthesized at these places, but at limited scales. As mentioned in Section 2, studies conducted in recent years involved TRAP experiments identifying mRNAs bound to ribosomes derived from cell soma, localized in vivo at axons. This is a technique that holds promise to generate pictures of in vivo axonal response and status in different experimental setups (Table 1).To perform TRAP is still cumbersome for regular labs since it requires the use of transgenic animals in which ribosomal proteins are tagged and expressed under the control of a neuronal specific promoter and then sequencing and bioinformatics. Perfecting TRAP to analyze mRNA associated to ribosomes present in axons but from a glial origin appears to be an interesting challenge.

A summary of new methodologies used to study local protein synthesis in axons is provided in Table 3. Metabolic labeling methods use tagged amino acids to label newly synthesized proteins. The proteins synthesized during the treatment can be identified by mass spectrometry, purified or visualized in situ. The use of stable-isotope amino acids to label the newly synthesized proteins can be performed both in cell culture (stable-isotope labeling amino acids in cell culture, SILAC) or in whole animals (stable-isotope labeling amino acids in mammals, SILAM). On the other hand, it is possible use amino acids analogs, such as the Methionine analog aziodohomoalanine (AHA), which contains an azide group. After the treatment, the newly synthesized proteins are covalently linked to an alkalyne containing tag, such as fluorescent dyes (fluorescent noncanonical amino acid tagging, FUNCAT) or biotin (bio-orthogonal noncanonical amino acid tagging, BONCAT) by Click chemistry. The FUNCAT method allows visualizing proteome-wide spatio-temporal patterns while BONCAT allows the purification of newly synthesized proteins. A combination of two metabolic labeling methods (SILAC and BONCAT) was developed (called quantitative noncanonical amino acid tagging, QuaNCAT), which reduces the background of pre-existing proteins. With the Puro-PLA (puromycin-labeling in association with proximity ligation assay) method it is possible to detect newly synthesized proteins in situ by the coincidental localization of a protein-specific antibody with an antibody detecting a puromycin labeled nascent protein chain. Finally, the TRAP approach allows isolating ribosomes of specific cells by the expressing of an epitope-tagged ribosomal protein driven under a tissue-specific promoter and subsequently sequencing the mRNA that co-purifies with the tagged ribosome. For further details on all of these methodologies see refs. [115,116].

6. Final Remarks

In summary, many efforts have been made to decipher the components and mechanisms in axonal proteostasis. To date, a series of axonal genomic studies of the axonal proteome and the locally synthesized proteome have been conducted

www.advancedsciencenews.com

Proteomics-journal.com

Table 3. Available methods used to study local protein synthesis in axons.

Methods		Probe	What is detected	Cond	itions	Type of approach		
				in vitro	in vivo	Candidate- based	Unbiased	Reference
Metabolic labeling	SILAC	Labeled amino acids (stable-isotope)	Newly synthesized proteins during the treatment	Х			х	[50]
								[65]
	SILAM				Х		Х	[16]
	FUNCAT	Labeled amino acids (amino acid analog)	2	Х		х		[91]
								[68]
								[85]
	BONCAT			Х		Х		[96]
								[68]
	QuaNCAT	SILAC + BONCAT		Х			Х	[50]
Local detection of newly syntesized proteins	Puro-PLA	Puromycin	Nascent peptides which incorporate puromycin	Х		Х		[86]
								[50]
Genome wide detection of translated proteins	TRAP	Labeled ribosome	mRNAs bound to labeled ribosomes		Х		х	[57]
								[58]
								[59]

SILAC, stable-isotope labeling amino acids in cell culture; SILAM, stable-isotope labeling amino acids in mammals; FUNCAT, fluorescent noncanonical amino acid tagging; BONCAT, bio-orthogonal noncanonical amino acid tagging; QuaNCAT, quantitative noncanonical amino acid tagging; Puro-PLA, puromycin-labeling in association with proximity ligation assay; TRAP, translating ribosome affinity purification.

mainly in vitro (Table 1). The data indicate that a large number of transcripts are localized in axons, and several of them are associated with ribosomes and locally translated. In addition, many efforts have been directed to understand the role of local translation in axons at different stages of development, and its regulation in response to different cues (Table 2). However, the transcriptome and proteome of in vivo axons, and their alterations during normal or pathological conditions, are not yet known. The use of TRAP techniques allows researchers to obtain a snapshot of the axon protein synthesis in vivo, and the results have indicated that locally synthesized proteins change depending on the developmental stage of the axon.^[57,58] This approximation is highly useful because it makes it possible to study the mRNAs likely translated in axons in vivo. However, it must be considered that, because of the somatic origin of the ribosomal-tag, the contribution of ribosomes from glial cells to the local synthesis is not taken into account by this methodology.

Little is known about the regulation mechanism of local protein synthesis and the post-translational processing of newly synthesized proteins. Moreover, considering the astonishing reports classifying single neurons based on differential gene expression of single-cell RNA-seq profiles,^[117] it is clear that gene expression is specific and different for neurons having different functions, connectivity, and histological location in the CNS or PNS in vivo. Therefore, refinement of methods to get closer to the in vivo conditions to analyze the axonal proteostasis will likely introduce paradigm shifts in the future.

Acknowledgements

This work was supported by Agencia Nacional de Investigacion e Innovacion (ANII) and the Foreing & Commonwealth Office of UK in a UK-ANII joint fund, and Programa de Desarrollo de las Ciencias Bsicas (PEDECIBA) from Uruguay. The authors wish to thank Dr. Laura Quintana and Dr. Martín Ciganda for revising the use of English of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

axon, axonal transport, axonal local protein synthesis, transcriptome, translatome

Received: February 1, 2019 Revised: April 12, 2019 Published online:

^[1] S. Roy, Neuroscientist **2014**, 20, 71.

^[2] M. M. Black, Methods Cell Biol. 2016, 131, 1.

^[3] J. L. Twiss, J. van Minnen, J. Neurotrauma 2006, 23, 295.

www.advancedsciencenews.com

- [4] J. R. Sotelo-Silveira, A. Calliari, A. Kun, E. Koenig, J. R. Sotelo, *Traffic* 2006, 7, 508.
- [5] C. Glock, M. Heumüller, E. M. Schuman, Curr. Opin. Neurobiol. 2017, 45, 169.
- [6] J. R. Sotelo, L. Canclini, A. Kun, J. R. Sotelo-Silveira, A. Calliari, K. Cal, M. Bresque, A. Dipaolo, J. Farias, J. A. Mercer, *Dev. Neurobiol.* 2014, 74, 292.
- [7] R. López-Leal, J. Alvarez, F. A. Court, Cytoskeleton 2016, 73, 629.
- [8] S. Maday, A. E. Twelvetrees, A. J. Moughamian, E. L. F. Holzbaur, *Neuron* 2014, 84, 292.
- [9] L. Wang, C. L. Ho, D. Sun, R. K. H. Liem, A. Brown, Nat. Cell Biol. 2000, 2, 137.
- [10] R. H. Lee, C. S. Mitchell, J. Theor. Biol. 2015, 370, 39.
- [11] R. A. Nixon, Brain Res. 1980, 200, 69.
- [12] J. Alvarez, A. Giuditta, E. Koenig, Prog. Neurobiol. 2000, 62, 1.
- [13] T. Mathieson, H. Franken, J. Kosinski, N. Kurzawa, N. Zinn, G. Sweetman, D. Poeckel, V. S. Ratnu, M. Schramm, I. Becher, M. Steidel, K. M. Noh, G. Bergamini, M. Beck, M. Bantscheff, M. M. Savitski, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1.
- [14] A. R. Dörrbaum, L. Kochen, J. D. Langer, E. M. Schuman, *eLife* 2018, 7, 1.
- [15] H. G. Ko, J. H. Choi, D. I. Park, S. J. J. Kang, C. S. Lim, S. E. Sim, J. Shim, J. Il Kim, S. S. Kim, T. H. Choi, S. Ye, J. Lee, P. Park, S. S. Kim, J. Do, J. Park, M. A. Islam, H. J. Kim, C. W. Turck, G. L. Collingridge, M. Zhuo, B. K. Kaang, *Cell Rep.* **2018**, *22*, 748.
- [16] S. Heo, G. H. Diering, C. H. Na, R. S. Nirujogi, J. L. Bachman, A. Pandey, R. L. Huganir, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018, 115, E3827.
- [17] L. D. Cohen, R. Zuchman, O. Sorokina, A. Müller, D. C. Dieterich, J. D. Armstrong, T. Ziv, N. E. Ziv, *PLoS One* **2013**, *8*, e63191.
- [18] E. F. Boumil, R. Vohnoutka, S. Lee, H. Pant, T. B. Shea, *Biol. Open* 2018, 7, bio028795.
- [19] B. H. Toyama, J. N. Savas, S. K. Park, M. S. Harris, N. T. Ingolia, J. R. Yates, M. W. Hetzer, *Cell* **2013**, *154*, 971.
- [20] S. Millecamps, J.-P. Julien, Nat. Rev. Neurosci. 2013, 14, 161.
- [21] M. Tytell, R. J. Lasek, H. Gainer, F1000Research 2016, 5, 205.
- [22] C. Benech, J. R. Sotelo, J. Menéndez, R. Correa-Luna, Exp. Neurol. 1982, 76, 72.
- [23] J. R. Sotelo, L. Canclini, A. Kun, J. R. Sotelo-Silveira, L. Xu, H. Wallrabe, A. Calliari, G. Rosso, K. Cal, J. A. Mercer, *PLoS One* 2013, 8, e61905.
- [24] M. A. Lopez-Verrilli, F. Picou, F. A. Court, Glia 2013, 61, 1795.
- [25] F. A. Court, W. T. J. Hendriks, H. D. MacGillavry, J. Alvarez, J. van Minnen, J. Neurosci. 2008, 28, 11024.
- [26] F. A. Court, R. Midha, B. a Cisterna, J. Grochmal, A. Shakhbazau, W. T. Hendriks, J. Van Minnen, *Glia* 2011, *59*, 1529.
- [27] K. Müller, A. Schnatz, M. Schillner, S. Woertge, C. Müller, I. von Graevenitz, A. Waisman, J. van Minnen, C. F. Vogelaar, *Glia* 2018, 66, 1591.
- [28] A. Kun, L. Otero, J. R. Sotelo-Silveira, J. R. Sotelo, J. Neurosci. Res. 2007, 85, 2087.
- [29] E. Koenig, Ed., Cell Biology of the Axon, Springer, Berlin 2009.
- [30] D. E. Willis, M. Xu, C. J. Donnelly, C. Tep, M. Kendall, M. Erenstheyn, A. W. English, N. C. Schanen, C. B. Kirn-Safran, S. O. Yoon, G. J. Bassell, J. L. Twiss, *J. Neurosci.* 2011, *31*, 14481.
- [31] C. J. Donnelly, D. E. Willis, M. Xu, C. Tep, C. Jiang, S. Yoo, N. C. Schanen, C. B. Kirn-Safran, J. van Minnen, A. English, S. O. Yoon, G. J. Bassell, J. L. Twiss, *EMBO J.* **2011**, *30*, 4665.
- [32] R. B.-T. Perry, E. Doron-Mandel, E. lavnilovitch, I. Rishal, S. Y. Dagan, M. Tsoory, G. Coppola, M. K. McDonald, C. Gomes, D. H. Geschwind, J. L. Twiss, A. Yaron, M. Fainzilber, *Neuron* **2012**, *75*, 294.
- [33] C. Gomes, T. T. Merianda, S. J. Lee, S. Yoo, J. L. Twiss, *Dev. Neurobiol.* 2014, 74, 218.

- [34] R. B. Campenot, K. Lund, S.-A. Mok, Nat. Protoc. 2009, 4, 1869.
- [35] A. M. Taylor, M. Blurton-Jones, S. W. Rhee, D. H. Cribbs, C. W. Cotman, N. L. Jeon, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 599.
- [36] D. E. Willis, E. a van Niekerk, Y. Sasaki, M. Mesngon, T. T. Merianda, G. G. Williams, M. Kendall, D. S. Smith, G. J. Bassell, J. L. Twiss, J. Cell Biol. 2007, 178, 965.
- [37] A. M. Taylor, N. C. Berchtold, V. M. Perreau, C. H. Tu, N. Li Jeon, C. W. Cotman, J. Neurosci. 2009, 29, 4697.
- [38] C. Andreassi, C. Zimmermann, R. Mitter, S. Fusco, S. De Vita, S. Devita, A. Saiardi, A. Riccio, *Nat. Neurosci.* 2010, 13, 291.
- [39] K. H. Zivraj, Y. C. L. Tung, M. Piper, L. Gumy, J. W. Fawcett, G. S. H. Yeo, C. E. Holt, J. Neurosci. 2010, 30, 15464.
- [40] L. F. Gumy, G. S. H. Yeo, Y.-C. L. Tung, K. H. Zivraj, D. Willis, G. Coppola, B. Y. H. Lam, J. L. Twiss, C. E. Holt, J. W. Fawcett, *RNA* 2011, *17*, 85.
- [41] I. J. Cajigas, G. Tushev, T. J. Will, S. tom Dieck, N. Fuerst, E. M. Schuman, *Neuron* 2012, *74*, 453.
- [42] Y. Sasaki, C. Gross, L. Xing, Y. Goshima, G. J. Bassell, Dev. Neurobiol. 2014, 74, 397.
- [43] A. Minis, D. Dahary, O. Manor, D. Leshkowitz, Y. Pilpel, A. Yaron, Dev. Neurobiol. 2014, 74, 365.
- [44] J. Baleriola, C. A. Walker, Y. Y. Jean, J. F. Crary, C. M. Troy, P. L. Nagy, U. Hengst, *Cell* **2014**, *158*, 1159.
- [45] L. Saal, M. Briese, S. Kneitz, M. Glinka, M. Sendtner, RNA 2014, 20, 1789.
- [46] M. Briese, L. Saal, S. Appenzeller, M. Moradi, A. Baluapuri, M. Sendtner, Nucleic Acids Res. 2015, 44, 1.
- [47] J. M. Taliaferro, M. Vidaki, R. Oliveira, S. Olson, L. Zhan, T. Saxena, E. T. Wang, B. R. Graveley, F. B. Gertler, M. S. Swanson, C. B. Burge, *Mol. Cell* **2016**, *61*, 821.
- [48] N. Rotem, I. Magen, A. Ionescu, N. Gershoni-Emek, T. Altman, C. J. Costa, T. Gradus, M. Pasmanik-Chor, D. E. Willis, I. Z. Ben-Dov, E. Hornstein, E. Perlson, *Sci. Rep.* 2017, *7*, 1.
- [49] R. L. Bigler, J. W. Kamande, R. Dumitru, M. Niedringhaus, A. M. Taylor, *Sci. Rep.* 2017, *7*, 1.
- [50] A. Zappulo, D. Van Den Bruck, C. Ciolli Mattioli, V. Franke, K. Imami, E. McShane, M. Moreno-Estelles, L. Calviello, A. Filipchyk, E. Peguero-Sanchez, T. Müller, A. Woehler, C. Birchmeier, E. Merino, N. Rajewsky, U. Ohler, E. O. Mazzoni, M. Selbach, A. Akalin, M. Chekulaeva, *Nat. Commun.* 2017, *8*, 1.
- [51] E. N. Tóth, A. Lohith, M. Mondal, J. Guo, A. Fukamizu, N. Pourmand, J. Biol. Chem. 2018, 293, 4940.
- [52] C. Mathur, K. R. Johnson, B. A. Tong, P. Miranda, D. Srikumar, D. Basilio, R. Latorre, F. Bezanilla, M. Holmgren, *Sci. Rep.* 2018, *8*, 1.
- [53] A. N. Kar, S. J. Lee, J. L. Twiss, *Neuroscientist* **2018**, 24, 111.
- [54] K. M. Leung, F. P. G. Van Horck, A. C. Lin, R. Allison, N. Standart, C. E. Holt, *Nat. Neurosci.* 2006, *9*, 1247.
- [55] J. Yao, Y. Sasaki, Z. Wen, G. J. Bassell, J. Q. Zheng, Nat. Neurosci. 2006, 9, 1265.
- [56] H. H. W. Wong, J. Q. Lin, F. Ströhl, C. G. Roque, J. M. Cioni, R. Cagnetta, B. Turner-Bridger, R. F. Laine, W. A. Harris, C. F. Kaminski, C. E. Holt, *Neuron* 2017, 95, 852.
- [57] K. X. Zhang, L. Tan, M. Pellegrini, S. L. Zipursky, J. M. McEwen, Cell Rep. 2016, 14, 1258.
- [58] T. Shigeoka, H. Jung, J. Jung, B. Turner-Bridger, J. Ohk, J. Q. Lin, P. S. Amieux, C. E. Holt, *Cell* **2016**, *166*, 181.
- [59] R. Ouwenga, A. M. Lake, D. O'Brien, A. Mogha, A. Dani, J. D. Dougherty, J. Neurosci. 2017, 37, 8688.
- [60] M. Nozumi, T. Togano, K. Takahashi-Niki, J. Lu, A. Honda, M. Taoka, T. Shinkawa, H. Koga, K. Takeuchi, T. Isobe, M. Igarashi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009, 106, 17211.
- [61] A. Estrada-Bernal, S. D. Sanford, L. J. Sosa, G. C. Simon, K. C. Hansen, K. H. Pfenninger, *PLoS One* 2012, 7, e31858.
- [62] N. T. Ingolia, Cell 2016, 165, 22.



www.advancedsciencenews.com

- [63] G. Eastman, P. Smircich, J. R. Sotelo-Silveira, Comput. Struct. Biotechnol. J 2018, 16, 167.
- [64] C.-F. Chuang, C.-E. King, B.-W. Ho, K.-Y. Chien, Y.-C. Chang, J. Proteome Res. 2018, 17, 1953.
- [65] R. Cagnetta, C. K. Frese, T. Shigeoka, J. Krijgsveld, C. E. Holt, *Neuron* 2018, 99, 29.
- [66] M. Terenzio, S. Koley, N. Samra, I. Rishal, Q. Zhao, P. K. Sahoo, A. Urisman, L. Marvaldi, J. A. Oses-prieto, C. Forester, C. Gomes, A. L. Kalinski, A. Di Pizio, E. Doron-mandel, R. B. Perry, I. Koppel, J. L. Twiss, AL Burlingame, M. Fainzilber, *Science* **2018**, *359*, 1416.
- [67] J. P. Lezana, S. Y. Dagan, A. Robinson, R. S. Goldstein, M. Fainzilber, F. C. Bronfman, M. Bronfman, *Dev. Neurobiol.* **2016**, *76*, 688.
- [68] A. N. Kar, M. a MacGibeny, N. M. Gervasi, A. E. Gioio, B. B. Kaplan, J. Neurosci. 2013, 33, 7165.

[69] K. Ben-Yaakov, S. Y. Dagan, Y. Segal-Ruder, O. Shalem, D. Vuppalanchi, D. E. Willis, D. Yudin, I. Rishal, F. Rother, M. Bader, A. Blesch, Y. Pilpel, J. L. Twiss, M. Fainzilber, *EMBO J.* **2012**, *31*, 1350.

- [70] E. L. Spaulding, R. W. Burgess, Frontiers in Neuroscience 2017, 11, 1.
- [71] J. M. Cioni, M. Koppers, C. E. Holt, *Curr. Opin. Neurobiol.* 2018, *51*, 86.
- [72] D. S. Campbell, C. E. Holt, Neuron 2001, 32, 1013.
- [73] H. Eng, K. Lund, R. B. Campenot, J. Neurosci. 1999, 19, 1.
- [74] U. Hengst, A. Deglincerti, H. J. Kim, N. L. Jeon, S. R. Jaffrey, Nat. Cell Biol. 2009, 11, 1024.
- [75] K. Y. Wu, U. Hengst, L. J. Cox, E. Z. Macosko, A. Jeromin, E. R. Urquhart, S. R. Jaffrey, *Nature* 2005, 436, 1020.
- [76] M. Piper, R. Anderson, A. Dwivedy, C. Weinl, F. Van Horck, K. M. Leung, E. Cogill, C. Holt, *Neuron* 2006, 49, 215.
- [77] P. A. Brittis, Q. Lu, J. G. Flanagan, Cell 2002, 110, 223.
- [78] K. Kalil, E. W. Dent, Nat. Rev. Neurosci. 2014, 15, 7.
- [79] M. Spillane, A. Ketschek, C. J. Donnelly, A. Pacheco, J. L. Twiss, G. Gallo, J. Neurosci. 2012, 32, 17671.
- [80] M. Spillane, A. Ketschek, T. T. Merianda, J. L. Twiss, G. Gallo, Cell Rep. 2013, 5, 1564.
- [81] H. Jung, B. C. Yoon, C. E. Holt, Nat. Rev. Neurosci. 2012, 13, 308.
- [82] R. B. Perry, M. Fainzilber, Dev. Neurobiol. 2014, 74, 210.
- [83] G. Liao, L. Mingle, L. Van De Water, G. Liu, Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA 2015, 6, 1.
- [84] A. M. Taylor, J. Wu, H.-C. Tai, E. M. Schuman, J. Neurosci. 2013, 33, 5584.
- [85] T. J. Younts, H. R. Monday, B. Dudok, M. E. Klein, B. A. Jordan, I. Katona, P. E. Castillo, *Neuron* **2016**, *92*, 479.
- [86] A. F. R. Batista, J. C. Martínez, U. Hengst, Cell Rep. 2017, 20, 3085.
- [87] S.-J. Ji, S. R. Jaffrey, Dev. Neurobiol. 2014, 74, 245.
- [88] L. J. Cox, U. Hengst, N. G. Gurskaya, K. A. Lukyanov, S. R. Jaffrey, *Nat. Cell Biol.* 2008, 10, 149.
- [89] J. M. Villarin, E. P. McCurdy, J. C. Martínez, U. Hengst, Nat. Commun. 2016, 7, 13865.
- [90] J. R. Gale, A. Aschrafi, A. E. Gioio, B. B. Kaplan, Neuroscientist 2018, 24, 142.
- [91] B. C. Yoon, H. Jung, A. Dwivedy, C. M. O'Hare, K. H. Zivraj, C. E. Holt, *Cell* **2012**, 148, 752.
- [92] K. E. Cosker, M. F. Pazyra-Murphy, S. J. Fenstermacher, R. A. Segal, Ann. Intern. Med. 2013, 158, 5195.

- [93] S. E. Pease-Raissi, M. F. Pazyra-Murphy, Y. Li, F. Wachter, Y. Fukuda, S. J. Fenstermacher, L. A. Barclay, G. H. Bird, L. D. Walensky, R. A. Segal, *Neuron* **2017**, *96*, 373.
- [94] A. Aschrafi, A. D. Schwechter, M. G. Mameza, O. Natera-Naranjo, A. E. Gioio, B. B. Kaplan, J. Neurosci. 2008, 28, 12581.
- [95] A. Aschrafi, O. Natera-Naranjo, A. E. Gioio, B. B. Kaplan, *Mol. Cell. Neurosci.* 2010, 43, 422.
- [96] O. Natera-Naranjo, A. N. Kar, A. Aschrafi, N. M. Gervasi, M. A. Macgibeny, A. E. Gioio, B. B. Kaplan, *Mol. Cell. Neurosci.* 2012, 49, 263.
- [97] A. Aschrafi, A. N. Kar, J. R. Gale, A. G. Elkahloun, J. N. S. Vargas, N. Sales, G. Wilson, M. Tompkins, A. E. Gioio, B. B. Kaplan, *Mitochon-drion* **2016**, *30*, 18.
- [98] M. Hillefors, A. E. Gioio, M. G. Mameza, B. B. Kaplan, Cell. Mol. Neurobiol. 2007, 27, 701.
- [99] C. P. Capano, A. Giuditta, E. Castigli, B. B. Kaplan, J. Neurochem. 1987, 49, 698.
- [100] G. Spencer, N. Syed, E. van Kesteren, K. Lukowiak, W. Geraerts, J. van Minnen, J. Neurobiol. 2000, 44, 72.
- [101] S. Hanz, E. Perlson, D. Willis, J. Q. Zheng, R. Massarwa, J. J. Huerta, M. Koltzenburg, M. Kohler, J. Van-Minnen, J. L. Twiss, M. Fainzilber, *Neuron* 2003, 40, 1095.
- [102] E. Perlson, S. Hanz, K. Ben-Yaakov, Y. Segal-Ruder, R. Seger, M. Fainzilber, *Neuron* 2005, 45, 715.
- D. Yudin, S. Hanz, S. Yoo, E. lavnilovitch, D. Willis, T. Gradus, D. Vuppalanchi, Y. Segal-Ruder, K. Ben-Yaakov, M. Hieda, Y. Yoneda, J. L. Twiss, M. Fainzilber, *Neuron* 2008, *59*, 241.
- [104] I. Rishal, I. Michaelevski, M. Rozenbaum, V. Shinder, K. F. Medzihradszky, A. L. Burlingame, M. Fainzilber, *Dev. Neurobiol.* 2010, 70, 126.
- [105] I. Rishal, M. Rozenbaum, M. Fainzilber, J. Vis. Exp. 2010, 24, 2087.
- [106] E. Koenig, Brain Res. 1979, 174, 95.
- [107] E. Koenig, Mol. Cell. Neurosci. 1991, 2, 384.
- [108] E. Koenig, R. Martin, J. Neurosci. 1996, 16, 1400.
- [109] E. Koenig, R. Martin, M. Titmus, J. R. Sotelo-Silveira, J. Neurosci. 2000, 20, 8390.
- [110] J. R. Sotelo-Silveira, A. Calliari, M. Cárdenas, E. Koenig, J. R. Sotelo, J. Neurobiol. 2004, 60, 187.
- [111] J. Sotelo-Silveira, M. Crispino, A. Puppo, J. R. Sotelo, E. Koenig, J. Neurochem. 2008, 104, 545.
- [112] J. R. Sotelo-Silveira, in *Methods in Molecular Biology* (Ed: J. E. Gerst), Springer, Berlin **2011**, pp. 125–138.
- [113] A. Calliari, J. Farías, A. Puppo, L. Canclini, J. A. Mercer, D. Munroe, J. R. Sotelo, J. R. Sotelo-Silveira, *Dev. Neurobiol.* 2014, 74, 382.
- [114] S. Tom Dieck, L. Kochen, C. Hanus, M. Heumüller, I. Bartnik, B. Nassim-Assir, K. Merk, T. Mosler, S. Garg, S. Bunse, D. A. Tirrell, E. M. Schuman, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 411.
- [115] S. Iwasaki, N. T. Ingolia, Trends Biochem. Sci. 2017, 42, 612.
- [116] E. Kim, H. Jung, BMB Rep. 2015, 48, 139.
- [117] A. B. Rosenberg, C. M. Roco, R. A. Muscat, A. Kuchina, P. Sample, Z. Yao, L. T. Graybuck, D. J. Peeler, S. Mukherjee, W. Chen, S. H. Pun, D. L. Sellers, B. Tasic, G. Seelig, *Science* **2018**, *360*, 176.



HIPÓTESIS

En los últimos años se han logrado grandes avances en el entendimiento del rol de la síntesis local de proteínas en los axones bajo diferentes condiciones. Un gran número de trabajos utilizaron la estrategia de identificar el repertorio de ARNs localizados en los axones como forma de conocer las posibles proteínas a ser sintetizadas localmente. Estos trabajos fueron realizados en axones en cultivo, por lo tanto, en condiciones regenerantes e inmaduras. En el presente trabajo se buscó caracterizar, por primera vez, el transcriptoma de axones mielínicos maduros de mamíferos, proveniente tanto de neuronas motoras como sensoriales. A su vez, analizamos los cambios en el repertorio de ARNs localizados en axones a lo largo de la maduración y envejecimiento de la fibra nerviosa periférica.

La hipótesis de trabajo de la presente Tesis es que *el axoplasma de neuronas adultas y mielinizadas contiene un repertorio de ARN mensajeros característicos disponibles para ser traducidos localmente. Dicho repertorio tendría variaciones dependiendo del tipo neuronal, el estado de maduración o edad de la célula neuronal.*

ΟΒJΕΤΙVΟS

Objetivo general.

Contribuir al conocimiento de los mecanismos celulares que participan en el mantenimiento de la proteostasis de axones *in vivo*, particularmente la síntesis local en axones.

Objetivos específicos.

1. Optimizar y poner a punto la técnica de microdisección de axones, para obtener citoplasma axonal para su posterior análisis molecular a escalas "ómicas" (*Capítulo I*).

2. Caracterizar el transcriptoma de axones mielínicos maduros, proveniente de neuronas motoras de ratas adultas (*Capítulo I*).

3. Caracterizar el transcriptoma de axones mielínicos maduros, provenientes de neuronas motoras de ratas de distintas edades. Analizar comparativamente los mismos en busca de cambios en el repertorio de ARNs localizados en los axones a causa de la maduración y envejecimiento del nervio (*Capítulo II*).

4. Caracterizar el transcriptoma y proteoma de axones mielínicos maduros, proveniente de neuronas motoras y sensoriales de ratas adultas. Estudiar las similitudes y diferencias del transcriptoma y proteoma de axones mielínicos maduros con diferentes funciones (*Capítulo III*).

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Caracterización de los ARNs localizados en axones motores maduros mediante microdisección de axones y RNA-seq. Con el objetivo de contribuir a la comprensión de la potencialidad que poseen los axones *in vivo* a la hora de sintetizar proteínas localmente nos planteamos caracterizar, por primera vez, el repertorio de ARNs localizados en axones mielínicos adultos. El método elegido para la obtención del citoplasma axonal fue la microdisección de axones, metodología desarrollada originalmente por Koenig (1979), y ampliamente utilizada por nuestro grupo de trabajo para la caracterización de los componentes de las PARPs (Koenig & Martin, 1996; Koenig et al., 2000; Sotelo-Silveira et al., 2004, 2008; Kun et al., 2007; Calliari et al., 2014). Como modelo de estudio elegimos los axones motores provenientes de raíces espinales ventrales de la zona lumbar.

Los métodos de aislamiento de citoplasma axonal disponibles para el análisis de axones de mamíferos (extrusión y microdisección) pueden aplicarse solo en nervios del SNP. Esto se debe a la morfología del tejido, donde los axones son largos, se encuentran separados del soma neuronal y, a pesar de estar envueltos por la vaina de mielina generada por las células de Schwann, es posible separalos de ella. Para el caso de la microdisección, históricamente se ha elegido la utilización de raíces espinales lumbares, ya que son largas, carecen de epineuro y tienen una menor cantidad de tejido conectivo interfascicular, comparado con los nervios periféricos (Koenig et al., 2000). Este hecho mejora la eficiencia del aislamiento de axoplasmas de múltiples fibras simultáneamente. Adicionalmente, las raíces ventrales son homogéneas en cuanto al tipo celular que da origen a los axones que componen (motoneuronas).

El primer paso de este trabajo fue modificar la técnica de microdisección para desarrollar una metodología que permitiera aislar ARN axonal para su estudio por metodologías transcriptómicas. En primer lugar, una modificación importante fue la de minimizar los posibles contaminantes no axonales que pudiesen permanecer en la muestra de axoplasma. Para ello se implementaron controles de calidad de las muestras, tanto a nivel microscópico (microscopia de fluorescencia y electrónica de barrido), como a nivel molecular (RT-qPCR de marcadores neuronales y gliales). Los resultados obtenidos indicaron que se logra una disminución casi total de la mielina en la superficie de los axoplasmas. Asimismo, a nivel molecular se observó que las muestras de axoplasma presentaban un enriquecimiento en ARNs codificantes para proteínas marcadoras neuronales (*Nefl, Nefm y Nefh*), mientras que aquellos codificantes para proteínas de mielina (*Mbp, Pmp22 y Mag*) disminuían en relación al contenido que presentaba la raíz medular entera.

El siguiente paso fue aislar, amplificar y secuenciar el contenido de ARNs de los axones, realizando los mismos procedimientos para la muestra de raíz medular entera, que fue utilizada

Capítulo I: Caracterización de los ARNs localizados en axones motores maduros mediante microdisección de axones y RNA-seq.

como punto de referencia a la hora de los análisis comparativos. En primer lugar, se observó que los axones mielínicos maduros poseen un repertorio de ARNs menor al descrito hasta el momento para axones *in vitro* (revisado en Trabajo I). Los controles de calidad realizados mostraron que los ARNs detectados en la muestra de axoplasma no son la mera dilución de los ARNs presentes en la raíz medular entera. Por otro lado, se comprobó, al estudiar los datos a escala transcriptómica, que la muestra de axoplasma veía reducida la cantidad de contaminantes gliales.

La caracterización del transcriptoma de axones motores mostró que el mismo es complejo, detectándose tanto ARNm codificantes de proteínas, como ARN no codificantes, como había sido reportado previamente para axones *in vitro* (Briese et al., 2015). Por otro lado, se observó que el repertorio de ARNs estaba enriquecido en aquellos codificante para proteínas con funciones mitocondriales, relacionados a la traducción o al citoesqueleto. Interesantemente, ademas de observar la presencia de centenas de mensajeros con funciones esenciales para un axón, observamos que existen ARNm codificantes para proteínas ribosomales, soportando una posible hipótesis de ensamblado, reparación o mantenimiento de ribosomas en el axón.

El análisis comparativo del transcriptoma de axones *in vivo* con el de axones *in vitro* (Minis et al., Briese et al., Zappulo et al., 2017, Nijssen et al., 2018) identificó un grupo de ARNs presente en todos los axones analizados, los cuales principalmente codifican proteínas mitocondriales, relacionadas al citoesqueleto o la traducción. Estos hallazgos dan cuenta de la importancia de la síntesis local de este conjunto de proteínas en axones provenientes de diferentes tipos neuronales, bajo distintas condiciones fisiológicas.

Por último, se realizó la validación de los datos obtenidos por secuenciación masiva a través de RT-qPCR. Para el mismo, se eligieron 13 ARNs que presentaban diferentes niveles de abundancia en la muestra de axoplasmas.

Los resultados obtenidos proporcionan evidencia de que la microdisección de axones es un método valioso para obtener datos "ómicos" de axones maduros y mielinizados del SNP, y podría ser especialmente útil para el estudio de la participación axonal en patologías neurodegenerativas de neuronas motoras, como la esclerosis lateral amiotrófica y las atrofias musculares espinales.

Estos resultados dieron lugar a una publicación, la cual se presenta a continuación, referida como Trabajo II.

TRABAJO II

Axon micro-dissection and transcriptome profiling reveals the in vivo RNA content of fully differentiated myelinated motor axons.

Joaquina Farias, Christine E. Holt, Jose R. Sotelo and Jose R. Sotelo-Silveira.

Axon microdissection and transcriptome profiling reveals the in vivo RNA content of fully differentiated myelinated motor axons

JOAQUINA FARIAS,^{1,2,5} CHRISTINE E. HOLT,³ JOSÉ R. SOTELO,² and JOSÉ R. SOTELO-SILVEIRA^{1,4}

¹Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, 11600, Uruguay
²Departamento de Proteínas y Ácidos Nucléicos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, 11600, Uruguay
³Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge, Cambridge, CB2 3DY, United Kingdom
⁴Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 11400, Uruguay

ABSTRACT

Axonal protein synthesis has been shown to play a role in developmental and regenerative growth, as well as in the maintenance of the axoplasm in a steady state. Recent studies have begun to identify the mRNAs localized in axons, which could be translated locally under different conditions. Despite that by now hundreds or thousands of mRNAs have been shown to be localized into the axonal compartment of cultured neurons in vitro, knowledge of which mRNAs are localized in mature myelinated axons is quite limited. With the purpose of characterizing the transcriptome of mature myelinated motor axons of peripheral nervous systems, we modified the axon microdissection method devised by Koenig, enabling the isolation of the axoplasm RNA to perform RNA-seq analysis. The transcriptome analysis indicates that the number of RNAs detected in mature axons is lower in comparison with in vitro data, depleted of glial markers, and enriched in neuronal markers. The mature myelinated axons are enriched for mRNAs related to cytoskeleton, translation, and oxidative phosphorylation. Moreover, it was possible to define core genes present in axons when comparing our data with transcriptomic data of axons grown in different conditions. This work provides evidence that axon microdissection is a valuable method to obtain genome-wide data from mature and myelinated axons of the peripheral nervous system, and could be especially useful for the study of axonal involvement in neurodegenerative pathologies of motor neurons such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and spinal muscular atrophies (SMA).

Keywords: axonal mRNAs; mRNA localization; motor neuron; local translation; axon

INTRODUCTION

Neurons are highly specialized cells which present an exceptional morphology, composed of somatodendritic and axonal compartments. A key issue in neurobiology has been to understand the cellular mechanisms that maintain the dendritic and axonal structures, which are essential for neuronal function. The axonal transport is the main mechanism that sustains the proteostasis of the axonal compartment. This process consists in the transport of proteins and other materials synthesized in the soma to the axon using molecular motors and the cytoskeleton (for reviews, see Roy 2014; Black 2016). The speed of this transport (ranging from 0.1–20 to 200–400 mm/d) does not

allow a rapid response to external or internal cues. However, complementary mechanisms have been described that can contribute in this regard. These include transference of macromolecules from glia-to-axon (for reviews, see Sotelo et al. 2014; López-Leal et al. 2016) and local protein synthesis in the axon (for reviews, see Glock et al. 2017; Cioni et al. 2018). The relative contribution of each mechanism is not yet known and has been described as variable depending on the developmental stage or under injury conditions (for reviews, see Cornejo et al. 2017; Glock et al. 2017; Cioni et al. 2018).

RNA localization and local protein synthesis are conserved mechanisms that can confer precise spatial and temporal control of protein levels. In the case of mammals,

⁵Present address: PDU "Espacio de Biología Vegetal del Noreste," Centro Universitario de Tacuarembó, Universidad de la República, Tacuarembó, 45000, Uruguay

Corresponding author: jsotelosilveira@iibce.edu.uy

Article is online at http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna. 073700.119.

^{© 2020} Farias et al. This article is distributed exclusively by the RNA Society for the first 12 months after the full-issue publication date (see http://majournal.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at http:// creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.
Farias et al.

the first lines of evidence of mRNA localization in axons were obtained using in situ hybridization for candidate genes (Jirikowski et al. 1990; Mohr and Richter 1992; Mohr et al. 1991; Skutella et al. 1994). The possibility to separate axons from the cell body and other types of cells by using compartmentalization cultures allowed for the study of the axonal transcriptome from a genome-wide perspective. Although the localization of mRNA does not imply that it is locally translated per se, it does provide evidence of the potentiality of the axon to synthesize proteins and rapidly and autonomously respond to its environment. With this aim, almost 20 data sets have been produced, where axonal transcriptome of different species, diverse neuronal types, and physiological conditions, were studied in vitro (for review, see Farias et al. 2019). These data indicate a high diversity of mRNAs localized in immature axons, with variations depending on the developmental stage and conditions.

Many efforts have been directed at understanding the role of RNA localization and local translation in axonal physiology (for reviews, see Glock et al. 2017; Cioni et al. 2018; Farias et al. 2019). However, the importance of these mechanisms for mature myelinated axons in their normal microenvironment is not yet known. This is mainly due to the difficulty of obtaining pure axonal cytoplasm from in vivo samples, and the small amount of RNA obtained from them. The mechanical extrusion of giant axon of invertebrates (Squid, Aplysia) has been used as a method to obtain pure axoplasm in large amounts for diverse posterior analyses, including cDNA libraries (Capano et al. 1987) and RNA-seq (Mathur et al. 2018). In the case of mammals, there are two methodological approaches available to obtain axoplasm from in vivo nerves: extrusion (Rishal et al. 2010) and microdissection (for review, see Koenig 2009) of axoplasm. The extrusion method has been used to characterize the total proteome of sciatic nerve axoplasm, identifying 540 proteins (Rishal et al. 2010). In addition, it was also used to examine the link between axonal injury signaling and the resultant cell body response using phosphoproteomics in rat sciatic nerve (Michaelevski et al. 2010). On the other hand, our group has widely used the microdissection technique to conduct in situ analysis of components of the axoplasm derived from medullary roots of rats and rabbits (Koenig et al. 2000; Sotelo-Silveira et al. 2004, 2008; Kun et al. 2007; Calliari et al. 2014).

In this work, we modified the microdissection protocol to achieve the goal of characterizing the transcriptome of mature and myelinated motor axons of the peripheral nervous system (PNS). With this method we obtained pure axonal cytoplasm from rat ventral roots and performed RNA-seq of transcripts localized in this subcellular domain. Quality controls performed in the axoplasm sample indicate that the preparation is enriched in neuronal markers and depleted from glial markers. This is an approach that reveals that mature axons in vivo have a lower number of RNA species in comparison with those growing in culture (in vitro axons). The gene ontology (GO) categories enriched in the axoplasm transcriptome are mainly related to translation, mitochondria, and cytoskeleton. Moreover, it was possible to define core transcripts present in axons when comparing our data with transcriptomic data of axons grown in different conditions. This work provides evidence that axon microdissection is a valuable method to obtain data from mature and myelinated axons of the PNS at genome-wide levels, and could be especially useful for the study of axonal involvement in neurodegenerative pathologies of motor neurons such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and spinal muscular atrophies (SMA).

RESULTS

Isolation of pure axoplasm from mature myelinated motor axons

In order to characterize the transcriptome of mature myelinated axons, a method of obtaining axonal cytoplasm with a purity level that allows for molecular analysis is necessary. To achieve this objective, we optimized the axon microdissection technique, a method used to isolate axoplasm from both Mauthner cells and mammalian medular roots (Koenig 1979, 1986, 1991; Koenig and Martin 1996; Koenig et al. 2000; Sotelo-Silveira et al. 2004, 2008; Calliari et al. 2014), originally developed by Koenig (1979). In this work, we isolated motor axons from lumbar ventral roots of adult rats (Fig. 1A). After a denaturing step using zinc (Fig. 1B,i), which increases the efficiency of axoplasm isolation, we proceeded to the "pulling out" of multiple axoplasmic whole-mounts in aspartate solution (Fig. 1B,ii). To minimize the potential remnants of myelin on the surface of the axoplasms, these were condensed into a compact bundle and washed several times by gently drawing the axons in and out of the solution except for one end, repeating this procedure several times (Fig. 1B,iii). This dislodged-by the force of surface tension-the scanty debris of myelin still attached to the axons. Then, the condensed bundle was attached at both ends to a coated coverslip (Fig. 1B,iv) to remove the tip of the bundle using a scalpel (Fig. 1B,v). Once the bundle is attached, further washes were made to decrease the likelihood of nonaxonal contamination. (Fig. 1B,vi). Finally, the axoplasms were detached from the coverslip and stored at -80°C in an Eppendorf until the RNA extractions were performed (Fig. 1B,vii).

Two different quality control steps were performed to evaluate, qualitatively and quantitatively, the presence of myelin in the preparation. The first was to detect myelin remnants using fluorescent microscopy or scanning electron microscopy (Fig. 1C–E). The second was to assess the presence of mRNA markers of myelin and axon

Transcriptome of myelinated motor axons



FIGURE 1. Axoplasm whole-mounts, obtained by microdissection method, are depleted of myelin. (A) Schematic diagram of rat spinal cord with dorsal and ventral lumbar spinal roots assembling into the sciatic nerve. In this work, the L5 lumbar ventral roots containing axons from motor neurons were dissected out for isolation of RNA. (B) Experimental procedure of the microdissection technique to obtain axoplasm whole-mounts from spinal roots. C-C'' and D-D'': Single focal plane and orthogonal projection of z-stack of ventral root axons before (C-C'') and after (D-D'') the microdissection procedure. Note that the lipid-rich structures, such as myelin, are stained with the lipophilic fluorescent dye Nile red (red) in C', and the F-actin cortex can be observed in D, stained with fluorescent phalloidin (green). (E) A representative image from scanning electron microscopy of a microdissected axon. Scale bars: (D) 10 µm; (E) 2 µm

compartments by quantitative real time RT-PCR (Fig. 2). In the first case, we visualized axons stained with phalloidin and the fluorescent lipophilic dye Nile Red before (Fig. 1C–C''') and after (Fig. 1D–D''') the isolation steps to reveal possible remnants of myelin. As can be seen when comparing Figure 1C' and D', the isolated axons did not show detectable Nile Red staining of myelin in the axoplasm surface, while the actin rich cortex of the axoplasm is preserved (Fig. 1C,D). The performance of the method was tested at a higher resolution using scanning electron microscopy, where the axoplasm surface free of myelin debris could be observed (Fig. 1E).

To analyze the purity of the axoplasm sample with higher sensitivity than optical methods, we implemented a molecular quality control, performing RT-qPCR of mRNA markers of myelin (*Mbp*, *Pmp22*, and *Mag*) and axon (*Nefl*, *Nefm*, and *Nefh*) compartments (Fig. 2). The glial markers were chosen according to their subcellular localization in glial cells (Fig. 2A). In sciatic nerve, it has been described that *Mag* (Griffiths et al. 1989) and *Pmp22* (Snipes et al. 1992) mRNAs have a perinuclear distribution, while *Mbp* mRNA was detected diffusely in the Schwann cell internode and predominantly in the paranodal cytoplasm (Griffiths et al. 1989). Furthermore, in oligodendrocytes it was described that *Mbp* mRNA could be transported to the axon-glial contact site and locally translated (White et al. 2008). Comparison of relative abundance levels in axons versus whole ventral root tissues for all these markers



FIGURE 2. Axoplasm samples are reduced in glial mRNAs and enriched in neuronal mRNAs. (*A*) Schematic diagram showing longitudinal and transverse sections of a myelinated peripheral axon where the axon, node of Ranvier, the paranodal cytoplasm, and the internode are shown. The localization of glial and neuronal mRNA markers used to perform the quality control of axoplasm samples is shown by color coded solid dots. (*B*) Molecular quality control of purity of axoplasm samples by RT-qPCR. Relative quantification of glial (*Mbp*, *Mag*, and *Pmp22*) and neuronal markers (*Nefl*, *Nefm*, and *Nefh*) in different axoplasmic and ventral root samples isolated from five individual animals. (*C*-*C''*) Single molecule FISH (smFISH) of *Nefl* (green) and *Mbp* (red) mRNAs in ventral root crysections confirming the localization of an axonal marker (*Nefl*) and a glial marker (*Mbp*). Phalloidin F-actin staining (white) delineated the shape boundaries of Schwann cell and axon. Note that *Nefl* is localized into axons (Ax), while the *Mbp* mRNA is preferentially located close to the axon at paranode cytoplasm of Schwann cell (arrow heads). (*D*-*D'*) smFISH of *Mbp* mRNAs in ventral root crysections, showing its location preferentially close to the axon at paranode cytoplasm of Schwann cell (arrowheads) and, in some cases, at the axon-glia contact site (arrow). (Ax) Axon, (NR) node of Ranvier. Scale bar, 10 μm.

yielded the conclusion that glial markers decrease their abundance in axoplasm samples between 15-fold for Mbp mRNA, and more than 35-fold for Pmp22 and Mag mRNAs (Fig. 2B, relative abundance expressed in log₂: Mbp: 20.345 ± 0.402 and 24.246 ± 0.484; Pmp22: 17.601 ± 1.360 and 22.868 ± 0.148 and Mag: not detectable and 13.202 ± 1.091 ; in axoplasm and ventral root samples, respectively). Due to its subcellular distribution in the internal mesaxon, close to the axon-glial contact site, the Mbp mRNA indicated that only locations establishing intimate interactions with the axon remain at reduced levels after the isolation procedure used. In contrast, the neuronal markers increased their abundance in axoplasm samples in comparison with ventral root samples from 22- to more than 172-fold (Fig. 2B, relative abundance expressed in log₂: Nefl: 23.811 ± 0.493 and 16.380 ± 0.699; Nefm: 21.499 ± 0.952 and 17.012 ± 0.670 and Nefh: 12.642 ± 0.583 and not detected; in axoplasm and ventral root samples, respectively). In order to analyze the subcellular distribution of markers in our model, we performed single molecule FISH (smFISH) of Mbp and Nefl mRNAs in ventral roots cryosections (Fig. 2C-C'''). The Nefl mRNA was present exclusively in the axon cytoplasm, showing different fluorescence signal patterns, from discrete and pointed to more diffuse (Fig. 2C; Supplemental Fig. S1). The Mbp mRNA was localized at the internode and paranode cytoplasm of the Schwann cell (Fig. 2C'-C'''

and D-D'), as previously described (Griffiths et al. 1989). Additionally, it was also confirmed that *Mbp* mRNAs are located in axon-glial contact sites in peripheral nerves (Fig. 2*D*–*D'*, arrow), as described in oligodendrocytes (White et al. 2008).

Thus, we can affirm that axoplasm samples have minimal glial components but mainly contain neuron specific mRNAs. It is important to note that five independent biological replicas were used to ascertain the variability of the method (Fig. 2B), yielding a very tight distribution among them (coefficient of variation [%] = 2.62 ± 1.18). For the subsequent RNA-seq study, due to the low yield of total RNA contained within this axonal preparation (typically in the picogram range), five biological replicates were pooled and linear amplified for the generation of a single RNA sample representative of axoplasm, performing the same procedure with the ventral root samples to avoid bias.

Mature myelinated axons have a unique transcriptional profile, with less complexity than in vitro grown axons

To investigate the transcriptome of mature myelinated axons, we sequenced total RNA (linear amplified) from five pooled samples of both ventral roots and axoplasm. The number of detected genes was 11,333 in ventral roots and 1008 in axoplasm (Supplemental Table S1). In

Transcriptome of myelinated motor axons

total, 10,396 genes expressed in ventral roots were undetectable in axons. On the other hand, 71 genes detected in axoplasm were undetectable in ventral roots (Fig. 3A). The number of detected genes in mature myelinated axons is much lower than those previously described for in vitro axons (for review, see Farias et al. 2019). In order to evaluate if the low number of detected genes is due to a library construction or sequencing artifact we performed saturation plots. The number of detected genes as a function of the sequencing depth indicates that saturation is reached for both ventral roots and axon samples, globally and in a protein coding category (Fig. 3B).

To demonstrate that the axonal transcriptome is not merely the product of a contamination of the most abundant transcripts present in the ventral roots, we conducted a series of analyses. Gene abundance as a function of gene position (ranking) in an axoplasm sample clearly shows that not all genes detected in axons are highly expressed in ventral roots (Fig. 3C). Furthermore, the 71 axonal genes not detected in ventral roots (see Fig. 3A) include RNAs from low to high abundance (Fig. 3C), indicating the specificity of the axoplasm isolation method. The correlation analysis for genes detected in both samples (937 genes) also showed that the axoplasm sample has a different pattern of gene abundance (Fig. 3D, $R^2 = 0.28$). In addition, analysis of the top 50 abundant genes in axoplasm and ventral roots indicated that 29 of these were in common, but nearly the same proportion was unique to the axon extract (Fig. 3E). The common genes mainly code mitochondrial proteins (encoded by the mitochondrial genome) as well as ncRNAs and pseudogenes. It is important to note that among the most abundant genes in the ventral root sample we found glial markers (such as *Mbp*, *Mag*, *Pmp22*, *S100b*, *Mpz*), which presented low abundances in the axoplasm sample as shown in the heatmap (Fig. 3E).

In summary, our analysis indicates that axon microdissection is a useful technique to obtain axoplasms from mature myelinated neurons derived from PNS for subsequent analysis at the molecular level. The number of RNAs detected in mature axons is lower in comparison with in vitro data, is depleted of glial markers, and is enriched in neuronal markers.



FIGURE 3. RNA-seq of microdissected motor axons. (*A*) Venn diagram showing number of detected genes on ventral root and axoplasm samples. Note that 937 genes are common to both while 71 are only detected in the axoplasm. (*B*) Saturation plot of ventral root and axoplasm RNA-seq data. Solid lines indicate the global saturation plot and dashed lines indicate the saturation for protein-coding genes. (*C*) Relative abundance (log₂ TPM) of genes detected in axoplasm sample (blue dots) in function of their ranking in the sample. The abundance in ventral root sample is also shown (orange dots). The 71 genes detected in axoplasm sample and not in ventral root sample (shown as a black line) are not necessarily present at low abundance. (*D*) Correlation analysis of the 937 genes detected in both samples. The linear regression r² (goodness-of-fit) is 0.28. (*E*) Of the top 50 highest abundant genes in ventral root and axoplasm samples, 29 overlapped. The heatmap of abundance values of the top highest abundant genes in both samples is also shown. RNAs encoded by the mitochondrial genome are labeled in blue and mRNAs coding myelin proteins are marked in red.



FIGURE 4. Characterization of mature motor axons transcriptome. (A) Quantification of different gene biotypes detectable in ventral root and axoplasm samples. Only detected transcripts were considered. Data are percentages as stacked bars, showing abundant categories such as mitochondrial RNAs and protein coding. (*B*) KEGG pathway analysis of axoplasm transcriptome. Bubble chart shows enrichment of detected genes in KEGG pathways. Y-axis label represents pathways, and x-axis represents fold enrichment factor (ratio between the amount of expressed genes enriched in the pathway and the amount of all genes in background gene set ventral root transcriptome). Size of the bubble represents amount of detected genes enriched in pathway and color represents the enrichment significance. (*C*) Enrichment of GO terms in the axoplasm transcriptome, with ventral root transcriptome as background. Y-axis represents Benjamini corrected *P*-value ($-\log_{10}$), and *x*-axis represents fold enrichment factor (\log_2). Size of the bubble represents amount of detected genes enriched in pathway and color represents amount of detected genes enriched in pathway for transcriptome as background. Y-axis represents Benjamini corrected *P*-value ($-\log_{10}$), and *x*-axis represents fold enrichment factor (\log_2). Size of the bubble represents amount of detected genes enriched in pathway and color represents fold enrichment factor (\log_2). Size of the bubble represents amount of detected genes enriched in pathway and color represents fold enrichment factor (\log_2). Size of the bubble represents amount of detected genes enriched in pathway and color represents fold enrichment factor (\log_2). Size of the bubble represents amount of detected genes enriched in pathway and color represents the GO category. (BP) Biological process, (CC) cellular component, (MF) molecular function.

Mature myelinated axons are particularly enriched in transcripts important for mitochondrial and protein synthesis functions

To assess the transcriptome complexity of axoplasm samples we first evaluated the different biotypes of transcripts present in each sample. We found that the RNA composition of axoplasm was similar to that described for motor axons in culture (Briese et al. 2015), containing transcripts of multiple classes, including protein coding, Mt-rRNA, ncRNA (such miscRNA, snoRNA, and rRNA), IncRNA and pseudogenes (Fig. 4A; Supplemental Table S1). In addition, in the axoplasm sample, it was observed that the percentage of TPM of the mitochondrial rRNAs (Mt-rRNA) was almost twice that in whole tissue (78% compared to 43%), similar to observations made in the comparison of the axon with the somatodendritic compartment in motoneurons in culture (Briese et al. 2015). Moreover, the mature motor axons possess the noncoding 7SL RNA, which form part of the eukaryotic signal recognition particle (SRP), previously described in in vitro motoneurons (Briese et al. 2015) and the SRP particle in axoplasmic whole-mounts (Koenig 2009). In the case of miRNAs, although their presence in the axons has already been described (for review, see Wang and Bao 2017), we only detected some putative miRNAs precursors since the library protocol was not specific for small RNAs.

In order to continue with the characterization of the mature myelinated axon transcriptome, we studied the functional enrichment of the localized RNAs. The functional annotation analysis was performed using the axoplasm transcripts as the target list and the ventral root transcripts as the background (Fig. 4B,C; Supplemental Table S2). The KEGG pathways enriched in the axoplasm sample were "Ribosome," "Oxidative Phosphorylation," and neurodegenerative diseases such as Parkinson, Huntington, and Alzheimer (Fig. 4B). The GO analysis highlighted genes related to biological processes like "translation," cellular components like "ribosome," "extracellular exosome," "mitochondrion," "axon part," and molecular functions like "protein binding" and "structural constituent of cytoskeleton" (Fig. 4C). These GO categories were also previously described as enriched in the transcriptome of cultured axons (for review, see Farias et al. 2019).

To establish the protein-protein interactions (PPI) networks of the mRNA products identified in a mature

axoplasm transcriptome, we used the STRING tool (v11.0, Szklarczyk et al. 2015). Out of the 1008 detected genes in the axoplasm sample, 789 were matched with the database and used to construct the PPI network (Supplemental Fig. S2A). This network, obtained with a high confidence mode (0.7), was enriched in interactions (*P*-value < 1×10^{-16}). The result shows two clusters formed by highly connected protein nodes, which combine proteins related to mitochondria and translation. Additionally, it can be seen that there are several connected nodes associated with the cytoskeleton, as well as proteasome and protein ubiquitination (Supplemental Fig. S2A). Interestingly, only mitochondrial encoded genes are highly abundant in comparison to median values of all genes detected or the three other nodes of interactors (Supplemental Fig. S2B).

We performed a deeper analysis of the mitochondrial, ribosomal and cytoskeleton categories, since these groups of proteins are interesting in the context of the axon neurobiology. First, we analyzed the mRNAs coding for mitochondrial proteins. Of the 1300 proteins categorized as mitochondrial in the MitoMiner database (Smith and Robinson 2019), 15% (140 genes) were detected in the axoplasm transcriptome, while 92% (1199 genes) were detected in the ventral root sample. The RNAs encoded by the mitochondrial DNA were up to eightfold more abundant in axoplasms in comparison with the ventral root, while the mRNAs encoded by the nuclear DNA were, on average, more abundant in the ventral root sample (Fig. 5A). The difference between the abundance of RNAs encoding mitochondrial proteins encoded by mitochondrial or nuclear DNA was in agreement with that reported for cultured dorsal root ganglion (DRG) axons (Minis et al. 2014). Moreover, the abundance of mRNAs encoding for mitochondrial proteins encodes by the mitochondrial genome was several orders of magnitude greater than those codified by the nuclear genome (Supplemental Fig. S2B), in accordance with what was reported for in vitro axons (Minis et al. 2014; Nijssen et al. 2018). Since in our hands the mature axon would have the potential to locally synthesize only 15% (140 genes) of the mitochondrial proteome, we wonder if these RNAs, or the proteins they encode, possess any particular characteristic that leads to their localization in the axon. Recently, Fazal et al. (2019) developed APEX-seg technology to characterize the spatial organization patterns of RNA in the living cell. In the case of the outer membrane of mitochondria (OMM), associated mRNAs include those with mitochondrial and nonmitochondrial functions (Fazal et al. 2019). In our case, 17% of axonal RNAs (170/1008, Supplemental Table S3) are described as associated to mitochondria in the APEX-seq data set (APEX-OMM). Fiftynine of them code for mitochondrial proteins, leaving



FIGURE 5. Mitochondrial and translation related genes detected in mature myelinated axon transcriptome. (A) Distribution of mitochondrial mRNAs in comparison to all the transcripts detected in both samples. Axoplasm (y-axis) versus ventral root (x-axis) mRNA expression levels of all transcripts detected (gray), nuclear encoded mitochondrial genes (blue) and mitochondrial DNA encoded genes (red). (B) Comparison of the half-life of axonally detected (blue dots) mitochondrial proteins (MP) mRNAs at average and 95% CI using data obtained for in vitro cultured neurons (Dörrbaum et al. 2018) and brain cortex in vivo (Fornasiero et al. 2018) (gray dots). (C) Gene ontologies related to mitochondria enriched in axoplasm transcriptome. (D) Scheme depicting the 44 specific ribosomal proteins that were detected in the axoplasmic transcriptome. (E) Gene ontologies related to translation enriched in axoplasm transcriptome.

Farias et al.

111 as candidates to use mitochondria for their transport. Interestingly, we detected 81 mitochondrial mRNAs present in axons and not present in the APEX-OMM data set. For these, a nonmitochondrial-dependent mechanism of transport may be occurring. On the other hand, we hypothesize that this may represent the capacity to assist the turnover of particular functions or processes or be related to different turnover rates. Using the half-life of mitochondrial proteins determined recently in neurons both in vitro (Dörrbaum et al. 2018) and in vivo (Fornasiero et al. 2018), we observed that the distribution of protein half-lives for our axonal mitochondrial mRNA ranged from very short (2-5 d) to longer half-lives (30 d). Globally, the mitochondrial proteins encoded by the mRNAs detected in axoplasm did not show an evident shorter lifetime compared with the total mitochondrial proteins studied (Fig. 5B). Interestingly, the axonal mRNAs coding for mitochondrial proteins are involved in key functions at the mitochondrial matrix and outer and inner membrane, being part of different respiratory chain complexes (Fig. 5C), as well as biological processes such as fission and fusion. These proteins are usually under heavy reactive oxygen species (ROS) modifications, and therefore it may be important to have local mechanisms to renew/repair their function while in transit or at final destinations.

Secondly, we analyzed the mRNAs encoding proteins related with translation processes. In the axoplasm sample, 44 mRNAs (~50%) were detected out of all coding ribosomal proteins (~80 proteins), 27 from the large subunit, and 17 from the small subunit (Fig. 5D). Moreover, the axoplasm sample was enriched in GO terms related to translation initiation, and elongation, as well as to the regulation of these processes (Fig. 5E). The abundance of mRNAs coding for ribosomal proteins is variable, ranging from low to medium-high (Supplemental Fig. S2B). The localization of mRNAs coding for ribosomal proteins in axons has been widely reported previously (Willis et al. 2007; Taylor et al. 2009; Zivraj et al. 2010; Gumy et al. 2011; Saal et al. 2014; Briese et al. 2015; Rotem et al. 2017; Nijssen et al. 2018; Tóth et al. 2018). The presence of these mRNA raises the possibility that axons possess the capacity to use locally synthesized ribosomal proteins for the replacement of their damaged pairs, which would increase the half-life of the ribosomes. It is possible that nonribosomal functions of ribosomal proteins can be at play in the axon too.

Finally, we identified several mRNAs coding for cytoskeletal proteins (Supplemental Fig. S2A), including structural components and regulatory ones. The abundance of mRNAs coding for structural components of the cytoskeleton is variable, the neurofilament light subunit and tubulins subunits (*Tuba1a*, *Tuba1b*) mRNAs being the most abundant (Supplemental Fig. S2B).

In summary, our data show that mature myelinated axons are enriched for mRNAs related to cytoskeleton, translation, and oxidative phosphorylation. Thus, the mature myelinated axons have the capacity to locally maintain, at least in part, the cytoskeleton, the translation machinery, as well as the mitochondria, a key organelle for the correct function of the neuron.

RT-qPCR validation of transcripts present in mature myelinated axons

For the validation of the RNA-seq data we performed RT-qPCR of individual (n = 5) replicates for 13 genes (Fig. 6). The selected genes are expressed at high, moderate, and low levels in the axoplasm sample, and span several different cellular and molecular categories. High consistency between the RNA-seq and RT-qPCR results was found using linear regression analysis of the fold change of gene abundance in axoplasm vs. ventral root samples ($R^2 = 0.8670$, Fig. 6A), indicating that the data produced through RNA-seq is reliable. As shown in Figure 6B, the mRNA coding for the synaptic protein *Snca* (α -synuclein), the member of the Src signaling pathway *Skap2* (Src kinase associated phosphoprotein 2) and the endoplasmic



FIGURE 6. Validation of RNA-seq data by RT-qPCR. (A) Correlation of gene expression fold change (axon vs. ventral root) obtained by RT-qPCR (y-axis) and RNA-seq (x-axis). All RT-qPCR data was collected from five biological replicates (mean and standard deviation values are represented). Statistical goodness of fit value is provided (red). (B) Expression analysis by RT-qPCR of 13 mRNAs with different patterns of localization and expression are shown. Note the minimal dispersion among the biological replicas (coefficient of variation [%]: 6.20 ± 6.58).

Transcriptome of myelinated motor axons

reticulum protein Stt3a (STT3 oligosaccharyltransferase complex catalytic subunit A) were not detected in the axoplasm but were detected in ventral root samples. The mRNAs coding for cytoskeletal proteins Tubb4b (tubulin beta 4B class IVb), Vim (vimentin), and Actb (β-actin), the potassium channel Kcna1 (potassium voltage-gated channel subfamily A member 1), and the translation inhibitor Pdcd4 (programmed cell death 4), were detected in both samples, with high abundance in ventral root samples. Conversely, the metallothionein protein Mt2a (metallothionein 2A), the translation factor Eif3e (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E), and the component of the complex III of mitochondrial electron transport Mtcyb (mitochondrially encoded cytochrome B) were detected with high abundance in axoplasm samples relative to ventral samples. Finally, the mRNA coding for synaptic vesicle protein Sv2b (synaptic vesicle glycoprotein 2B) and the synaptic protein Syn1 (synapsin I) were detected only in axoplasm samples (Fig. 6B).

With these results we can affirm that the pooling of samples and the linear amplification of RNA did not significantly affect the abundance levels of mRNAs, since there is a high correlation with the data obtained in RNA-seq analysis (pooling of five samples, linear amplification of RNA and then sequenced) and RT-qPCR performed in unamplified RNA from individual samples.

In vivo motor axon transcriptome shares a core group of genes with in vitro axonal transcriptomes

To assess which RNAs are found in both mature myelinated axons and culture growing axons, we compared our

data with a published axon data set derived from primary embryonic DRG neurons (Minis et al. 2014), primary embryonic motor neurons (Briese et al. 2015), neurons differentiated from mouse embryonic stem cells (mESC) (Zappulo et al. 2017), and motor neurons derived from mESC (Nijssen et al. 2018). For this, we reanalyzed all the data sets from scratch by performing the same protocol analysis to avoid bias. Of the 758 genes detected in mature myelinated axons (conformed only by the orthologs between rat and mouse), 95.5% have been reported for in vitro axons by previous work (Fig. 7A). In addition, almost 40% (300 genes, Supplemental Table S4) were detected in all compared axon data sets. The latter can be considered as a core set of genes needed in axons of different types (sensory or motor) or in various differentiation conditions (mature or in active growth). The PPI network obtained with a high confidence mode (0.7) is enriched in interactions (*P*-value $< 1 \times 10^{-16}$). The proteins codified by these mRNAs are mainly related to translation, mitochondria, and cytoskeleton (Fig. 7B). On the other hand, a small group of mRNAs were only detected in mature axons (Supplemental Table S4). It is important to note the large difference in the number of detected genes between our set and the in vitro axon data sets, especially in the case of DRG neurons (Minis et al. 2014), primary embryonic motor neurons (Briese et al. 2015), and neurons differentiated from mESC (Zappulo et al. 2017). The biological meaning of such a large number was discussed in the corresponding manuscripts originating from each data set, but it could also arise from cross contamination between somatodendritic and axonal compartments, as suggested by the Hedlund group (Nijssen et al. 2018).



FIGURE 7. Comparison of axonal transcriptome data sets reveals a group of core genes present in both in vitro growing in culture and microdissected mature axons. (A) Venn diagram performed to compare our data with published axon data set derived from primary embryonic DRG neurons (Minis et al. 2014), primary embryonic motor neurons (Briese et al. 2015), neurons differentiated from embryonic stem cells of mouse (mESC) (Zappulo et al. 2017) and motor neurons derived from mESC (Nijssen et al. 2018). (B) Protein–protein interactions network of the core genes (300 genes) identified in different types of axons using the STRING database. These genes are highly connected and are related to mitochondria (red), translation (green), and cytoskeleton (blue). Not connected genes are not shown.

Farias et al.

Additionally, several research groups have delved into the transcriptome characterization of different neuronal subcompartments, such as growth cones (Zivraj et al. 2010), synaptic neuropil in the hippocampus (Cajigas et al. 2012) or, more specifically, the RNA being translated in cortical synaptosomes (Ouwenga et al. 2017) or in retinal ganglion cell (RGC) axons terminals (Shigeoka et al. 2016). In the latter, the axonal translatome of distal axons in vivo at different time points during the assembly of visual circuits, including adulthood, was reported. One of the main findings was that the axonal translatome is composed of two parts, one constitutive and the other specifically requlated according to the needs of each stage (Shigeoka et al. 2016). When comparing the adult axonal translatome with our fully differentiated peripheral motor axon transcriptome, we found 139 genes in common, mostly related to translation, mitochondrion, cytoskeleton and axonal part (Supplemental Table S4). Moreover, a new platform which combines fluorescence sorting with biochemical fractionation was recently developed in order to purify fluorescently labeled synaptosomes (fluorescence-activated synaptosome sorting [FASS]) (Luquet et al. 2017). Using this platform, Schuman and colleagues determined the resident mRNA population at adult mouse presynaptic boutons, identifying 468 transcripts enriched in the sorted synaptosomes (Hafner et al. 2019). Of those, in our axonal preparation, we observe 77, mainly coding for ribosomal proteins (29 transcripts) and translation factors (five transcripts), molecular motors associated with the cytoskeleton (five transcripts), and mitochondrial proteins (four transcripts) (Supplemental Table S4). Surprisingly, we noticed that only one presynaptic protein, Rims2 (regulating synaptic membrane exocytosis 2), was common to both data sets. However, when comparing our axonal transcriptome with the genes associated with the ontological term of presynapse (GO: 0098793), we observed 37 genes in common. Among these, typical synapse proteins such as Pclo (Piccolo), Sept4 (Septin 4), Syn1 (Synapsin I), and Snap25 (Synaptosomal-associated protein 25) were observed (Supplemental Table S4). Additionally, we want to underscore that the abundance levels for these mRNAs were high, ranging from 3.5 to 272 TPM. This highlights the potential for translation of synaptic proteins in the axon, far away from the cell body and the synaptic bouton.

In summary, these results reveal an axonal core molecular signature, found in in vitro and in vivo axons, in different growth conditions and states of differentiation.

DISCUSSION

RNA localization and local protein synthesis are mechanisms that confer spatial and temporal control of the proteome. The role of these mechanisms in the axonal compartment of neurons has been widely studied, with important recent advances (for reviews, see Glock et al. 2017; Cioni et al. 2018; Farias et al. 2019). In the last 10 yr, transcriptomic approaches have been used to characterize the RNA pool localized in axons grown in vitro. This was possible thanks to advances in neuronal cell culture techniques, allowing for the separation of neuronal soma and other cell types from axons (for reviews, see Jadhav et al. 2015; Neto et al. 2016). These results provided valuable evidence regarding the capacity to synthesize proteins locally in the axonal domain. However, the transcriptome of mature myelinated axons is still largely unknown due to difficulties in obtaining axonal content from this type of sample. The axon microdissection method, developed originally by Koenig (1979), allows researchers to obtain axoplasm whole-mounts from different types of axons including the motor axons derived from medullary ventral roots. The method is based on the axon behavior as a viscoelastic gel due to the abundant content of neurofilaments (Gilbert 1975). The tensile strength that is required for isolation depends on axon diameter and the content of neurofilaments (Gilbert 1975; for review, see Koenig 2009). Zinc denaturation transforms the axonal viscoelastic gel into a plastic solid, which enhances tensile strength, and permits the isolation of axoplasmic whole mounts from small diameter fibers (for review, see Koenig 2009). This transformation is based on the zinc-dependent inhibition of the endogenous calcium activated protease which degrades the neurofilament protein in the presence of elevated calcium concentration (Gilbert 1975; Frankel and Koenig 1978). The microdissection method was widely used by Koenig's and our group to characterize translation machinery components of axoplasm, mainly those of the periaxoplasmic ribosome plaques (PARPs) (Koenig and Martin 1996; Koenig et al. 2000; Sotelo-Silveira et al. 2004, 2008; Kun et al. 2007; Calliari et al. 2014). The procedure maintains RNA integrity, as demonstrated either by observing the electrophoretic profiles of total RNA extracts from Mauthner axons (Koenig 1979) or by in situ hybridization in axoplasmic whole-mounts (Sotelo-Silveira et al. 2008; Calliari et al. 2014). Here, we modified the axon microdissection technique to obtain pure axoplasm derived from lumbar ventral roots (Fig. 1A,B) in order to characterize the transcriptome of mature motor axons.

The observation of isolated axoplasms, both by fluorescence microscopy (Fig. 1D) and scanning electron microscopy (Fig. 1E), showed that the method allows for the recovery of axoplasm with minimal myelin contamination at the axon surface. Furthermore, a high-sensitivity molecular quality control was developed, quantifying by RT-qPCR the relative abundance of glial and neuronal markers in axoplasms and ventral roots samples. The glial markers decreased their abundance in axoplasm extracts in comparison with ventral root samples between 15-fold for *Mbp* mRNA and more than 35-fold for *Pmp22* and *Mag* mRNAs (Fig. 2B). The smaller decrease of the *Mbp* mRNA abundance in the axoplasm samples could be

Transcriptome of myelinated motor axons

explained by the specific pattern of localization that this mRNA has in the glia. We observed *Mbp* mRNA localized to the axon-glial contact sites in ventral roots sections (Fig. 2D–D'), as it was described for oligodendrocytes (White et al. 2008), making this mRNA more likely to be carried over when the axoplasm is translated out of its ensheathment. This is in agreement with an RNA-seq study of central nervous system myelin, where *Mbp* mRNA was found enriched ten times more than *Pmp22* and *Mag* mRNA in myelin extracts vs. whole brain cortex (Thakurela et al. 2016). Although these indicate that the axoplasm may have minimal internal mesaxon glial contaminants, the preparation is highly enriched in axonal mRNAs.

As mentioned above, axons in culture have been the main source of transcriptome data in the field. Since the amount of RNA contained within the axons is typically low, it is necessary to collect and pool many samples (Minis et al. 2014; Zappulo et al. 2017) or use an axonal field in culture and apply steps of RNA amplification (Briese et al. 2015) for RNA-seq library construction. The need of linear RNA amplification was also present in the case of microdissected axons, where five biological replicates of axoplasm samples were pooled in order to reach the minimum input requirement. The number of detected genes in the mature myelinated axons was 1008 (Fig. 3A), significantly lower than that described for in vitro axons. It is important to note that in the ventral root samples 11,333 genes were detected (Fig. 3A), having performed the same procedure (its molecular biology and the corresponding bioinformatics) to avoid bias. For both samples, saturation was reached globally and specifically in the protein-coding category (Fig. 3B). Through ranking (Fig. 3C) and correlation analysis (Fig. 3D), it can be seen that the axoplasm sample is not merely the product of a dilution of transcriptome contained in the whole ventral root sample. The latter is clearly reflected by the top 50 RNAs coming from each fraction (Fig. 3E). Although there are genes in common, like mitochondrial genes (likely belonging to axonal mitochondria) and some ncRNAs and pseudogenes, the groups that were not shared determine that axonal and ventral root RNA extracts are different. Within the top 50 most abundant genes in the ventral root there were genes coding for myelin proteins (such as Mbp, Mag, Pmp22, S100b, Mpz). These genes were not only absent in the 50 most abundant genes found in the axoplasm sample, but were also detected at a very low abundance (Fig. 3E). These results, taken together, show, at a genome wide scale, that the axon microdissection procedure permits an efficient purification of axoplasm RNA with very low amounts of glial components, especially myelin. Additionally, the individual study of unamplified RNA from axons by RT-qPCR shows that the method is very reproducible (Figs. 2, 6), exhibiting very low dispersion in five independent biological replicas of unamplified RNA.

The mature myelinated axon transcriptome is composed of RNA of different biotypes, including protein coding, ncRNA, IncRNA and pseudogenes (Fig. 4A). The abundance of mitochondrial rRNAs in the axon is almost twice that of the ventral root, similar to what has been described for axons in culture when compared to the somatodendritic compartment (Briese et al. 2015). Additionally, the axoplasm sample is enriched in genes related to neurodegenerative diseases (Fig. 4B). While this may be mainly due to the presence of genes encoding for oxidative phosphorylation proteins, other key genes of the canonical pathways of Alzheimer's (Gapdh, Calm1, Gsk3b, and Ppp3ca), Parkinson's (Slc25a4 and Uchl1), and Huntington's (Tbp, Polr2a, Ap2m1, Slc25a4, Sod1, and Sod2) were detected. Furthermore, transcripts with functions related to protein synthesis and cytoskeleton were overrepresented in axoplasm compared to the ventral root transcriptome (Fig. 4C).

The PPI network of the axoplasm transcriptome showed a high prevalence of proteins related to mitochondria, translation and cytoskeleton, forming highly connected clusters (Supplemental Fig. S2A). If the mitochondrial mRNAs were to be locally translated in the axon, they would account for ~15% of the mitochondrial proteome. Globally, the mRNAs encoded by the mitochondrial genome were more abundant in axoplasms in comparison with the ventral root sample, while those encoded by nuclear DNA were, on average, more abundant in the ventral root sample (Fig. 5A). Additionally, in the axoplasm sample, the mRNAs encoded by the mitochondrial genome were more abundant by several orders of magnitude in comparison to those encoded by the nuclear genome (Supplemental Fig. S2B), as reported by others for in vitro axons (Minis et al. 2014; Nijssen et al. 2018). The proteins codified by those mRNAs are related to different processes which take place in mitochondria, like oxidative phosphorylation (Fig. 5C), fusion and fission (Opa1 and Ddhd1), and ribosomal proteins of mitochondria (Mrpl18, Mrps26, and Mrpl35). Although we did not find that proteins encoded by the mRNAs present in axoplasm have a shorter half-life (Fig. 5B), the genes found are usually the main targets of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) resulting in mitochondrial dysfunction. This is the case of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), Aconitase (Aco2), and members of the oxidative phosphorylation complex I, II, III, IV, and V (for reviews, see Brown 2001; Quijano et al. 2016). Therefore, we think that local renewal of these key components after damage can be paramount to maintaining mitochondrial functionality while in transit or at final destinations.

The mRNAs encoding ribosomal proteins have been reported in several of the studies of axonal transcriptome (Willis et al. 2007; Taylor et al. 2009; Zivraj et al. 2010; Gumy et al. 2011; Saal et al. 2014; Briese et al. 2015; Rotem et al. 2017; Nijssen et al. 2018; Tóth et al. 2018),

Farias et al.

and recent work provides evidence of its local synthesis in in vitro (Shigeoka et al. 2016) and in vivo (Cagnetta et al. 2018) axons. The function of those proteins locally synthesized in axons opens an interesting debate, since this implies ribosome assembly far away from the classical assembly factory, the nucleolus (for reviews, see Fromont-Racine et al. 2003; Peña et al. 2017). Recent work provides evidence of incorporation of locally synthesized ribosomal proteins in cytosolic ribosomes present in axons (Shigeoka et al. 2019). Through this mechanism, axons would be able to repair or modificate ribosomes on-site, extend their halflife or change the targets to be translated (Shi et al. 2017). A possible alternative is that extraribosomal functions of ribosomal proteins (for review, see Warner and McIntosh 2009) can be functional in the axon space. Regardless of what the final word on the matter is, we detected more than half of the mRNAs coding ribosomal proteins of both subunits in axonal extracts (Fig. 5D). Some of those proteins (rpS3A, rpS4, rpS12, rpS27A, rpLP0, rpL13A, rpL18A, rpL21, rpL27, rpL31) were described to be locally synthesized and incorporated on cytosolic ribosomes of RGCs axons (Shigeoka et al. 2019). Interestingly, we detected other mRNAs coding proteins associated with ribosome biogenesis and assembly, and regulation of the process of translation (Fig. 5E).

The mature myelinated axons also possess mRNAs coding for cytoskeletal and proteasome proteins (Supplemental Fig. S2A). Local translation of cytoskeleton proteins could confer to the axon the ability to remodel or maintain its structural components (Sotelo-Silveira et al. 2000). In the case of β -actin, it was described that its local synthesis in growing axons contributes to the stabilization of new branches, and most likely helps in branch emergence (Wong et al. 2017). Additionally, the role of protein degradation was reported in injured axons both in vitro and in vivo (for review, see Gumy et al. 2010). The presence of mRNAs encoding proteasomal proteins could provide a rapid mechanism to rapidly respond to an injury.

With the purpose of identifying a group of core genes present in axons of different types of neurons and differentiation conditions, we compared our data with published data obtained for in vitro isolated axons (Minis et al. 2014; Briese et al. 2015; Zappulo et al. 2017; Nijssen et al. 2018). Generally, one focus on these studies was the enriched axonal mRNAs as derived from the comparison of axons versus the somatodendritic compartment, instead of the total RNAs detected in axons. This strategy excludes from the analysis RNAs that are known to be present in axons and whose local synthesis and functions have been demonstrated, such as β -actin (Leung et al. 2006; Yao et al. 2006; Donnelly et al. 2011; Willis et al. 2011; Wong et al. 2017). Therefore, to perform the comparison between our transcriptome and the published data, we reanalyzed the data sets from raw sequences. Ninety five percent of RNAs detected in the mature myelinated motor axons was previously detected at in vitro growing axons (Fig. 7A). Furthermore, 40% were detected in all the axons analyzed (Supplemental Table S4). These RNAs codified for proteins with functions related to mitochondria, ribosomes and the cytoskeleton (Fig. 7B). Although mRNA complexity appeared to be lower than that observed in several in vitro studies (Minis et al. 2014; Briese et al. 2015; Zappulo et al. 2017), it is worth noting that the total number of RNA detected in our preparation is comparable to what Hedlund and colleagues reported recently (Nijssen et al. 2018). This agreement in the number of detected RNA species in vitro and in vivo, appears to be supported in our case since we are utilizing zinc solution as a fixative, which preserves protein complexes and RNA in axons (Koenig 1979; Sotelo-Silveira et al. 2008; Calliari et al. 2014) and in many other preparations (Lykidis et al. 2007; Hadler-Olsen et al. 2010; Jensen et al. 2010), but we cannot rule out the loss of more soluble RNAs.

On the other hand, we perform comparisons with data sets derived from more specific neuron subdomains: the translatome of axon terminals derived from adult mouse RGCs (Shigeoka et al. 2016) and the transcriptome of adult mouse presynaptic boutons (Hafner et al. 2019). The former is a pioneering work in the area, showing which mRNAs are being translated in axonal terminals at different development stages, even in adults (Shigeoka et al. 2016). The latter describes the transcriptome of adult presynaptic boutons and demonstrates that local protein synthesis is a regular feature of pre- and post-synapse under basal conditions, and that in the face of different excitatory or inhibitory stimuli, a differential local response occurs in these compartments to modify the local proteome. Interestingly, the two data sets mentioned above as well as our mature motor axon transcriptome are enriched in mRNAs encoding translation, cytoskeleton and mitochondria related proteins. Although in our data set we found mRNAs encoding for synapse-related proteins in good abundance, the number did not reach a threshold to be considered as enriched as it was reported for terms such as synaptic transmission by Shigeoka et al. (2016) and presynaptic active zone by Hafner et al. (2019). The latter could indicate a differential localization between the axon and the axon terminals, with RNAs in transit to the synaptic boutons showing in low amounts in the axon.

Knowing the mechanisms of RNA transport that localize RNAs in the axonal domain is of key importance, since transport failure is associated with several neurodegenerative diseases (for reviews, see Ikenaka et al. 2012; Costa and Willis 2018). In the case of mitochondria, APEX-seq data (Fazal et al. 2019) provided a reference of mRNA associated with its outer membrane (APEX-OMM), there, some had mitochondrial function but others have diverse tasks. Only 17% of the axonal transcriptome was present in the APEX-OMM data set. This means that the transport mechanism that may use mitochondria as carriers only

Transcriptome of myelinated motor axons

applies to almost one fifth of the mRNA localized in our preparation. Interestingly, not all the mitochondrial mRNA observed in the axon is in the APEX-OMM list. Additionally, about a hundred mRNAs not related to mitochondrial function may be localized through association to mitochondria. In addition to the classical mechanisms of RNA transport through RBP associated with the cytoskeleton, it has recently been described that RBPs can be associated with lysosomes (Liao et al. 2019) or mobile endosomes, in turn providing sites for local axonal translation (Cioni et al. 2019). Further studies will be required to understand the mechanisms involved in the transport and localization of RNA in mature axons.

In summary, we developed a modification of an axon microdissection technique that makes it possible to obtain pure axoplasm in quantities enough to isolate RNA and analyze it by sequencing. This was used to characterize the RNA species of a fully differentiated and myelinated motor axon. In resting conditions, these motor axons appear to have a core group of RNAs involved in protein synthesis, cytoskeleton, and mitochondria. However, it is clear that this is a picture of a basal state for RNAs that may have local functions in the area studied or also be in transit to final destinations. Regarding the latter, this approach would be useful to capture RNA in transit in different physiological conditions, or to study the axonal processes that occur in models of neurodegenerative diseases such as ALS and spinal muscular atrophies (SMA) in vivo.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sprague–Dawley male adult rats (10 mo) were obtained from the animal facility at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay), maintained on a 12-h light–dark cycle, with food and water provided ad libitum. All experimental procedures were conducted in strict accordance with the Institution's Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA-IIBCE) under law 18.611 of the República Oriental del Uruguay. The specific protocol was approved by the CEUA-IIBCE (experimental protocol N°005/05/2012). The animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of 100 mg/Kg ketamine and 20 mg/Kg xylazine, and then euthanized by decapitation.

Isolation of axoplasmic whole-mounts from myelinated ventral root fibers

Isolation of axoplasmic whole-mounts was performed according to Koenig (1979), Koenig and Martin (1996), Koenig et al. (2000), Sotelo-Silveira et al. (2004, 2008), and Calliari et al. (2014) with the following modifications. Lumbar spinal ventral roots were dissected from euthanized rats. The tissue (see Fig. 1A,B) was suspended in a modified gluconate-substituted calcium-free Cortland salt solution (Koenig and Martin 1996) containing 132 mM Na-gluconate, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM glucose, 3.5 mM MgSO₄, and 2 mM EGTA, pH 7.2, stored at 4°C. A ventral root, 3-5 mm, was immersed in a solution of 30 mM zinc acetate, 0.1 M Tricine, pH 4.8, for 10 min for denaturation. Then, it was transferred to a 35 mm plastic culture dish containing an axon "pulling" solution in which axoplasm was translated out of its myelin sheath with a pair of micro-tweezers #5 (Fig. 1B,ii). The "pulling" solution contained 40 mM aspartic acid, 38 mM Tris, 1 mM NaN₃, and 0.02% Tween 20 to reduce surface tension, pH 5.5 (Koenig et al. 2000; Sotelo-Silveira et al. 2004, 2008; Calliari et al. 2014). The pulling generates a spray of axons (about 30 axon segments) that can be condensed into a bundle, being easier to process in further steps. Each spray was condensed into a compact bundle by briefly drawing the spray out of solution except for one end. By drawing the bundle in and out of solution several times (Fig. 1B,iii) we eliminate the remaining pieces of myelin on the surface of the axon. Isolated axoplasmic whole-mount bundles were attached with the aid of eyebrow hair tools to coverslips coated with 1% (3-aminopropyl) triethoxysilane (Sigma-Aldrich) in ethanol (Fig. 1B,iv). The tissue that remains still in the end of the spray was removed by a scalpel (Fig. 1B,v). Additionally, three washes with fresh "pulling" solution were performed to further decrease any possible contamination (Fig. 1B,vi). The isolated axoplasmic whole-mounts were removed from the coverslip with the aid of eyebrow hair tool, placed in the cap of an Eppendorf 1.5 mL tube in 20 ul of "pulling" solution and stored at -80°C until RNA extractions were performed (Fig. 1B,vii).

Imaging of F-actin cortical layer and lipid content of microdissected axons

The axoplasm whole-mount was obtained as described above until the step of attachment to the coverslip. Before attachment, axoplasmic whole-mounts were unraveled for better visualization. Then, they were immediately incubated with Alexa Fluor 488 phalloidin (working dilution 1/400, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) and Nile Red (working dilution 1/1000 from a solution of 100 μ g/mL in acetone, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) 20 min at room temperature in PBS buffer. The material was mounted with ProLong Gold Antifade (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) and stored at 4°C light protected until visualization. A laser confocal microscope LSE ZEISS 800 was used with 40× (air, NA 0.95) and 63× (oil, NA 1.4) objectives. The stacks were always taken at ideal um number between each z plane. The software to control the microscope and take the images was the ZEN Blue version 2.3.

smFISH procedure

Tissue sections

Fresh ventral roots were collected, gently straightened, and immersed in fixative solution (4% paraformaldehyde in PHEM-DEPC buffer, 25 mM HEPES, 60mM PIPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, pH 7.2) for 1 h with stirring at room temperature. After three washes of 10 min each in PHEM-DEPC solution, the tissue was cryoprotected in 15% sucrose solution (in PHEM-DEPC) for 24 h at 4°C and then 30% for another 24 h. The pieces were placed in silicone rubber mods and embedded in the tissue freezing medium CryoGlue (SLEE Medical) and stored at -80°C. Frozen blocks were sectioned parallel to the longitudinal axis at 10 μ m thickness using a SLEE cryostat. Sections were collected onto Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) coated slides and stored at -20°C.

In situ hybridization

Custom Stellaris FISH Probes were designed against Nefl and Mbp by utilizing the Stellaris FISH Probe Designer (Biosearch Technologies) available online at www.biosearchtech .com/support/tools/design-software/stellaris-probe-designer. The ventral roots slices were hybridized with the Stellaris FISH Probe set labeled with Quasar570 and Quasar670 (Biosearch Technologies) (for Nefl and Mbp probes, respectively), following the manufacturer's instructions with some modifications. Briefly, tissue permeabilization was achieved by incubating the tissue with 0.5% Triton X-100 in PBS-DEPC, 20 min at room temperature. Excess detergent was removed by successive washes with PBS-DEPC (3 × 10 min). The tissue was immediately incubated in Wash Buffer A (10% formamide [Sigma-Aldrich] in Stellaris RNA FISH Wash Buffer A [Biosearch Technologies]) for 5 min. Then, 200 µl of Hybridization Solution (10% formamide in Stellaris RNA FISH Hybridization Buffer [Biosearch Technologies]) was added to each slide, with each probe set at a final concentration of 250 nM. The slides were place in a humidified chamber in the dark at 37°C for 4 h. Each sample was washed with Wash Buffer A for 30 min in a humidified chamber at 37°C. A second wash was performed, in this case with Wash Buffer A with DAPI (100 ng/mL) and AlexaFluor 488 phalloidin (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) and left to incubate at 37°C for 30 min. A final wash with Wash Buffer B (Biosearch Technologies) was performed. The samples were then mounted with Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories), covered by 22 mm × 22 mm No.1 coverslips, sealed with nail varnish and immediately imaged.

Image acquisition

Imaging was performed on a custom-made inverted single-molecule fluorescence microscope built around a commercial microscope frame (Olympus IX73). The microscope was equipped with an EM-CCD camera (Andor iXon Ultra 897) with an effective pixel size on the sample of 118 nm. A 1.30 NA oil immersion objective (Olympus UPLSAPO 60×) was used.

Axoplasmic whole-mounts processing for scanning electron microscopy

For scanning electron microscopy (SEM) analysis, the axoplasm attached on glass coverslips were fixed overnight in 2,5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer saline pH 7.2 (PBS) at 4°C. After that, axoplasms were washed in PBS (5 × 5 min), dehydrated through a graded (25, 50, 75, 95, 100%) ethanol-water series, transferred to acetone 2×10 min. Then, the samples were submitted to critical point drying with CO₂ in a DPC-1 Denton Vacuum Critical Point Drying apparatus. Dried samples were affixed to aluminum stubs with carbon tape and sputter-coated with gold in DeskII Denton Vacuum. Samples were analyzed in high vacuum in a Jeol-5900 LV SEM operated at an accelerating voltage of 20 kV.

RT-qPCR for quality control and validation of RNA-seq

RNA extraction from axoplasm whole-mounts

For axoplasmic samples, RNA extraction was performed with RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit (Ambion, Invitrogen, ThermoFisher Scientific), a kit designed to obtain RNA from as little as 10 laser capture microdissected sections. First, axoplasm samples were centrifuged at maximum speed, and the buffer removed very carefully. The procedure for laser capture microdissection (LCM) was used for all the samples, with some modifications. Briefly, 100 µL of lysis buffer was added to the pellet of axoplasms and incubated at 42°C for 5 min. Then, 3 µL of LCM additive and 129 µL (1.25 volumes) of 100% ethanol was added to the mixture to recover large and small RNAs. The lysate/ethanol mixture was loaded onto a Micro Filter Cartridge Assembly and centrifuged for 1 min at 10,000g. Afterward, 180 µL of wash solution 1 were added, and the mixture was centrifuged again for 1 min at 10,000g. Wash Solution 2/3 (180 µL) was added, and the mixture was centrifuged for 30 sec at 13,000g and we repeated the wash one more time. The flowthrough was discarded and the Micro Filter Cartridge was centrifuged for another minute at 13,000g to dry the filter. The Micro Filter Cartridge was transferred into a Micro Elution Tube, and 8 µL of preheated Elution Solution were added. The mixture was left at room temperature for 5 min and then centrifuged for 1 min at 13,000g. Subsequently, treatment with DNase was performed, adding 1/10 volume of 10× DNase I Buffer and 1 µL of DNase I, and incubating the DNase reaction for 5 min at 37°C. To inactivete the DNase, 1/10 volume of DNase Inactivation Reagent was used. After centrifugation of the reaction for 1.5 min at maximum speed to pellet the DNase Inactivation Reagent, the RNA was transferred to a fresh RNase-free tube and stored at -80°C until further processing.

RNA extraction from ventral root samples

The RNA from ventral roots were obtained using TRI Reagent (Sigma-Aldrich), following the recommendations of the manufacturer. Quality and quantity of RNA was evaluated using spectrophotometry (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) and fluorimetry (Qubit 2.0 and RNA HS Assay kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific). To be in comparable concentration as the RNA extracted from axons, each ventral root RNA was diluted down to 500 pg and then reisolated with the RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit, following the procedure detailed above.

RT-qPCR

For quality analysis of axoplasm samples and confirmative RT-qPCR assays, EXPRESS qPCR SuperMix (Life Technologies, ThermoFisher Scientific) was used according to the manufacturer's instructions. All the reactions were performed in five biological replicas in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad). The cycle program used for all cases was 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. The genes selected for confirmation by RT-qPCR are shown in Figure 7, and all specially designed primers are listed in Supplemental Table S5.

RNA-seq of microdissected axons and ventral roots

RNA extraction

Five axoplasm samples from different animals were pooled before RNA extraction to reach the minimal input amount of linear amplification kit (500 pg). For the ventral root sample, five ventral root samples were pooled and diluted to 500 pg after the first step of RNA extraction (with TRI Reagent, see above). Following that, a second step of RNA extraction (with RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit) was performed as described above.

RNA linear amplification

Both microdissected axons and ventral roots pools were subjected to RNA linear amplification using Ovation RNA-Seq System v2 (NuGEN, Tecan), following the manufacturer's recommendations. Quality and quantity of the resulting double-stranded cDNA were evaluated by means of a 2100 Bioanalyzer (Agilent) and Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Sequencing

Libraries were constructed and sequenced at BGI Genomics (Hong Kong), on Illumina HiSeq4000 platform.

RNA-seq data processing and analysis

The raw reads were aligned to the rat reference genome (Rnor_6.0, GCA_000001895.4) using HISAT v2.0.5 (Kim et al. 2015). The mapped reads were assembled by StringTie v1.3.3b (Pertea et al. 2015, 2016) in a reference-based approach ("-e" option). The TPM (transcripts per million reads) method was used to normalize the gene expression in each sample, and lowly expressed (<1 TPM) genes were filtered. The python script "prepDE.py" was used to obtain the count values.

Functional annotation analysis was performed using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DA-VID) website (v6.8, http://david.abcc.ncifcrf.gov/). The transcripts detected in axoplasm were used as the gene list, and those detected in the ventral root sample were used as background.

For saturation plot and biotypes analysis the NOISeq R package was used (Tarazona et al. 2015). The graphics were performed using the following R packages: gplots for heatmap and venneuler (Wilkinson 2012) for proportional Venn diagrams. For Venn diagram of several data sets, a web tool (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/) was used.

The list of mitochondrial proteins was obtained from MitoMiner database v4.0 (http://mitominer.mrc-mbu.cam.ac.uk/release-4.0/ begin.do (Smith and Robinson 2019), using the Integrated Mitochondrial Protein Index (IMPI).

The PPI networks were performed with the stringApp (Doncheva et al. 2019) of Cytoscape (Shannon et al. 2003).

For comparison of rat with mouse RNA-seq data, the Ensembl BioMart database (Kinsella et al. 2011) was used to scan for orthologs between species. Only genes with known orthologs were used in the comparison to avoid inflating the proportion of non-overlapping genes.

Use of published data sets

The data used in cross-comparisons of data sets were obtained from the NCBI Gene Expression Omnibus and ArrayExpress Archive. The accession numbers and their respective study references for the axonal transcriptomics studies are as follows: GEO: GSE51572 (Minis et al. 2014), GEO: GSE66230 (Briese et al. 2015), E-MTAB-4978 (Zappulo et al. 2017), and GEO: GSE121069 (Nijssen et al. 2018). The data of RNA-seq was remapped (to the mm10 [mouse] reference genome) and TPM values calculated using the pipeline described above, to avoid differential mapping bias.

Quantification and statistical analysis

For RT-qPCR and coefficient of variation values, mean and standard deviation is reported. In correlation analysis (Figs. 2C, 6A) the linear regression r^2 (goodness-of-fit) is reported. In the scatter plot graphics (Fig. 5C; Supplemental Fig. S2B) the mean and 95% Cl is presented.

DATA DEPOSITION

The data sets supporting the results of this article are available at the Sequence Read Archive repository, Project ID: PRJNA598237.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available for this article.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Science and Innovation Fund from the Foreign and Commonwealth Office-ANII (UK_ID_2015_1_3 to J.R.S.S. and C.E.H.), and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, UdelaR, funding project CSIC Iniciación 2013 #176 to J.F.). PhD fellowships were awarded to Joaquina Farias (ANII: POS_NAC_2014_1_102151 and Comisión Académica de Posgrados [CAP, UdelaR]). The authors wish to thank Dr. Martin Ciganda for revising the use of English of the manuscript. Special thanks to Professor Edward Koenig, for being a true source of inspiration and support in science and life.

Author contributions: J.R.S. and J.R.S.S. conceived the project; J.R.S.S. developed the methodology and supervised the work; J. F. and J.R.S.S. performed research; J.F. and C.E.H. performed validation using smFISH; J.F. performed data curation; J.F. and J.R. S.S. performed data analysis and interpretation; J.F. and J.R.S.S. drafted the article; J.F., C.E.H., J.R.S., and J.R.S.S. performed critical revisions of the article; J.F., C.E.H., J.R.S., and J.R.S.S. approved the final version to be published. Received October 18, 2019; accepted January 31, 2020.

REFERENCES

- Black MM. 2016. Axonal transport: the orderly motion of axonal structures. *Methods Cell Biol* **131:** 1–19. doi:10.1016/bs.mcb.2015.06 .001
- Briese M, Saal L, Appenzeller S, Moradi M, Baluapuri A, Sendtner M. 2015. Whole transcriptome profiling reveals the RNA content of motor axons. *Nucleic Acids Res* **44**: 1–19. doi:10.1093/nar/ gkv1027
- Brown GC. 2001. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. Biochim Biophys Acta 1504: 46–57. doi:10.1016/S0005-2728(00)00238-3
- Cagnetta R, Frese CK, Shigeoka T, Krijgsveld J, Holt CE. 2018. Rapid cue-specific remodeling of the nascent axonal proteome. *Neuron* **99:** 29–46.e4. doi:10.1016/j.neuron.2018.06.004
- Cajigas IJ, Tushev G, Will TJ, tom Dieck S, Fuerst N, Schuman EM. 2012. The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron* 74: 453–466. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.036
- Calliari A, Farías J, Puppo A, Canclini L, Mercer JA, Munroe D, Sotelo JR, Sotelo-Silveira JR. 2014. Myosin Va associates with mRNA in ribonucleoprotein particles present in myelinated peripheral axons and in the central nervous system. *Dev Neurobiol* 74: 382–396. doi:10.1002/dneu.22155
- Capano CP, Giuditta A, Castigli E, Kaplan BB. 1987. Occurrence and sequence complexity of polyadenylated RNA in squid axoplasm. *J Neurochem* **49:** 698–704. doi:10.1111/j.1471-4159.1987 .tb00950.x
- Cioni JM, Koppers M, Holt CE. 2018. Molecular control of local translation in axon development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* **51:** 86–94. doi:10.1016/j.conb.2018.02.025
- Cioni JM, Lin JQ, Holtermann AV, Koppers M, Jakobs MAH, Azizi A, Turner-Bridger B, Shigeoka T, Franze K, Harris WA, et al. 2019. Late endosomes act as mRNA translation platforms and sustain mitochondria in axons. *Cell* **176:** 56–72.e15. doi:10.1016/j.cell.2018 .11.030
- Cornejo V, Luarte A, Couve A. 2017. Global and local mechanisms sustain axonal proteostasis of transmembrane proteins. *Traffic* **18:** 255–266. doi:10.1111/tra.12472
- Costa CJ, Willis DE. 2018. To the end of the line: axonal mRNA transport and local translation in health and neurodegenerative disease. *Dev Neurobiol* **78**: 209–220. doi:10.1002/dneu.22555
- Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, Jensen LJ. 2019. Cytoscape StringApp: network analysis and visualization of proteomics data. *J Proteome Res* 18: 623–632. doi:10.1021/acs.jproteome .8b00702
- Donnelly CJ, Willis DE, Xu M, Tep C, Jiang C, Yoo S, Schanen NC, Kirn-Safran CB, Van Minnen J, English A, et al. 2011. Limited availability of ZBP1 restricts axonal mRNA localization and nerve regeneration capacity. *EMBO J* **30**: 4665–4677. doi:10.1038/emboj .2011.347
- Dörrbaum AR, Kochen L, Langer JD, Schuman EM. 2018. Local and global influences on protein turnover in neurons and glia. *Elife* **7:** 1–24. doi:10.7554/eLife.34202
- Farias J, Sotelo JR, Sotelo-Silveira J. 2019. Towards axonal system biology: genome wide views of local mRNA translation. *Proteomics* 19: 1900054. doi:10.1002/pmic.201900054
- Fazal FM, Han S, Parker KR, Kaewsapsak P, Xu J, Boettiger AN, Chang HY, Ting AY. 2019. Atlas of subcellular RNA localization revealed by APEX-Seq. *Cell* **178**: 473–490. doi:10.1016/j.cell.2019 .05.027
- Fornasiero EF, Mandad S, Wildhagen H, Alevra M, Rammner B, Keihani S, Opazo F, Urban I, Ischebeck T, Sakib MS, et al. 2018.

Precisely measured protein lifetimes in the mouse brain reveal differences across tissues and subcellular fractions. *Nat Commun* **9**: 4230. doi:10.1038/s41467-018-06519-0

- Frankel RD, Koenig E. 1978. Identification of locally synthesized proteins in proximal stump axons of the neurotomized hypoglossal nerve. Brain Res 141: 67–76. doi:10.1016/0006-8993(78)90617-0
- Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**: 17–42. doi:10.1016/S0378-1119(03)00629-2
- Gilbert DS. 1975. Axoplasm architecture and physical properties as seen in the Myxicola giant axon. *J Physiol* **253:** 257–301. doi:10 .1113/jphysiol.1975.sp011190
- Glock C, Heumüller M, Schuman EM. 2017. mRNA transport & local translation in neurons. *Curr Opin Neurobiol* **45:** 169–177. doi:10 .1016/j.conb.2017.05.005
- Griffiths I, Mitchell L, McPhilemy K, Morrison S, Kyriakides E, Barrie J. 1989. Expression of myelin protein genes in Schwann cells. *J Neurocytol* **18:** 345–352. doi:10.1007/BF01190837
- Gumy LF, Tan CL, Fawcett JW. 2010. The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Exp Neurol* **223:** 28–37. doi:10.1016/j.expneurol.2009.06.004
- Gumy LF, Yeo GSHH, Tung Y-CCL, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, Lam BYHH, Twiss JL, Holt CE, Fawcett JW, et al. 2011. Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA* **17:** 85–98. doi:10.1261/rna.2386111
- Hadler-Olsen E, Kanapathippillai P, Berg E, Svineng G, Winberg JO, Uhlin-Hansen L. 2010. Gelatin in situ zymography on fixed, paraffin-embedded tissue: zinc and ethanol fixation preserve enzyme activity. J Histochem Cytochem 58: 29–39. doi:10.1369/jhc.2009 .954354
- Hafner AS, Donlin-Asp PG, Leitch B, Herzog E, Schuman EM. 2019. Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal preand postsynaptic compartments. *Science* **364:** 650. doi:10.1126/ science.aau3644
- Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishigaki S, Tanaka F, Sobue G. 2012. Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. Int J Mol Sci 13: 1225–1238. doi:10.3390/ijms13011225
- Jadhav A, Wei L, Shi P. 2015. Compartmentalized platforms for neuropharmacological research. Curr Neuropharmacol 14: 72–86. doi:10.2174/1570159X13666150516000957
- Jensen UB, Owens DM, Pedersen S, Christensen R. 2010. Zinc fixation preserves flow cytometry scatter and fluorescence parameters and allows simultaneous analysis of DNA content and synthesis, and intracellular and surface epitopes. *Cytometry* A **77**: 798–804. doi:10 .1002/cyto.a.20914
- Jirikowski GF, Sanna PP, Bloom FE. 1990. mRNA coding for oxytocin is present in axons of the hypothalamo-neurohypophysial tract. *Proc Natl Acad Sci* **87:** 7400–7404. doi:10.1073/pnas.87.19.7400
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* **12**: 357–360. doi:10 .1038/nmeth.3317
- Kinsella RJ, Kahari A, Haider S, Zamora J, Proctor G, Spudich G, Almeida-King J, Staines D, Derwent P, Kerhornou A, et al. 2011. Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space. Database 2011: bar030. doi:10.1093/database/bar030
- Koenig E. 1979. Ribosomal RNA in Mauthner axon: implications for a protein synthesizing machinery in the myelinated axon. *Brain Res* 174: 95–107. doi:10.1016/0006-8993(79)90806-0
- Koenig E. 1986. Isolation of native Mauthner cell axoplasm and an analysis of organelle movement in non-aqueous and aqueous media. *Brain Res* **398**: 288–297. doi:10.1016/0006-8993(86) 91488-5
- Koenig E. 1991. Evaluation of local synthesis of axonal proteins in the goldfish Mauthner cell axon and axons of dorsal and ventral roots

Transcriptome of myelinated motor axons

of the rat in vitro. *Mol Cell Neurosci* 2: 384–394. doi:10.1016/ 1044-7431(91)90025-J

- Koenig E. 2009. Organized ribosome-containing structural domains in axons. Results Probl Cell Differ 48: 173–191. doi:10.1007/ 400_2008_29
- Koenig E, Martin R. 1996. Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. J Neurosci 16: 1400–1411. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-04-01400.1996
- Koenig E, Martin R, Titmus M, Sotelo-Silveira JR. 2000. Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. J Neurosci 20: 8390–8400. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-22-08390.2000
- Kun A, Otero L, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR. 2007. Ribosomal distributions in axons of mammalian myelinated fibers. J Neurosci Res 85: 2087–2098. doi:10.1002/jnr.21340
- Leung KM, Van Horck FPG, Lin AC, Allison R, Standart N, Holt CE. 2006. Asymmetrical β-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nat Neurosci* **9**: 1247–1256. doi:10.1038/nn1775
- Liao YC, Fernandopulle MS, Wang G, Choi H, Hao L, Drerup CM, Patel R, Qamar S, Nixon-Abell J, Shen Y, et al. 2019. RNA granules hitchhike on lysosomes for long-distance transport, using annexin A11 as a molecular tether. *Cell* **179:** 147–164. doi:10.1016/j.cell .2019.08.050
- López-Leal R, Alvarez J, Court FA. 2016. Origin of axonal proteins: is the axon-Schwann cell unit a functional syncytium? *Cytoskeleton* **73:** 629–639. doi:10.1002/cm.21319
- Luquet E, Biesemann C, Munier A, Herzog E. 2017. Purification of synaptosome populations using fluorescence-activated synaptosome sorting. *Methods Mol Biol* **1538**: 121–134. doi:10.1007/978-1-4939-6688-2_10
- Lykidis D, Van Noorden S, Armstrong A, Spencer-Dene B, Li J, Zhuang Z, Stamp GWH. 2007. Novel zinc-based fixative for high quality DNA, RNA and protein analysis. *Nucleic Acids Res* **35**: e85. doi:10.1093/nar/gkm433
- Mathur C, Johnson KR, Tong BA, Miranda P, Srikumar D, Basilio D, Latorre R, Bezanilla F, Holmgren M. 2018. Demonstration of ion channel synthesis by isolated squid giant axon provides functional evidence for localized axonal membrane protein translation. *Sci Rep* **8**: 2207. doi:10.1038/s41598-018-20684-8
- Michaelevski I, Medzihradszky KF, Lynn A, Burlingame AL, Fainzilber M. 2010. Axonal transport proteomics reveals mobilization of translation machinery to the lesion site in injured sciatic nerve. *Mol Cell Proteomics* **9**: 976–987. doi:10.1074/mcp .M900369-MCP200
- Minis A, Dahary D, Manor O, Leshkowitz D, Pilpel Y, Yaron A. 2014. Subcellular transcriptomics-dissection of the mRNA composition in the axonal compartment of sensory neurons. *Dev Neurobiol* 74: 365–381. doi:10.1002/dneu.22140
- Mohr E, Richter D. 1992. Diversity of mRNAs in the axonal compartment of peptidergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* **4**: 870– 876. doi:10.1111/j.1460-9568.1992.tb00197.x
- Mohr E, Fehr S, Richter D. 1991. Axonal transport of neuropeptide encoding mRNAs within the hypothalamo-hypophyseal tract of rats. *EMBO J* **10**: 2419–2424. doi:10.1002/j.1460-2075.1991 .tb07781.x
- Neto E, Leitão L, Sousa DM, Alves CJ, Alencastre IS, Aguiar P, Lamghari M. 2016. Compartmentalized microfluidic platforms: the unrivaled breakthrough of *in vitro* tools for neurobiological research. *J Neurosci* **36**: 11573–11584. doi:10.1523/JNEUROSCI .1748-16.2016
- Nijssen J, Benitez JA, Hoogstraaten R, Kee N, Hedlund E. 2018. Axonseq decodes the motor axon transcriptome and its modulation in response to ALS. *Stem Cell Rep* **11:** 321596. doi:10.1016/j.stemcr .2018.11.005

- Ouwenga R, Lake AM, O'Brien D, Mogha A, Dani A, Dougherty JD. 2017. Transcriptomic analysis of ribosome-bound mRNA in cortical neurites *in vivo. J Neurosci* **37:** 3044–3016. doi:10.1523/JNEUROSCI.3044-16.2017
- Peña C, Hurt E, Panse VG. 2017. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat Struct Mol Biol* **24:** 689–699. doi:10 .1038/nsmb.3454
- Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol* **33**: 290– 295. doi:10.1038/nbt.3122
- Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. 2016. Transcriptlevel expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. Nat Protoc **11**: 1650–1667. doi:10 .1038/nprot.2016.095
- Quijano C, Trujillo M, Castro L, Trostchansky A. 2016. Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biol* 8: 28–42. doi:10.1016/j.redox.2015.11.010
- Rishal I, Michaelevski I, Rozenbaum M, Shinder V, Medzihradszky KF, Burlingame AL, Fainzilber M. 2010. Axoplasm isolation from peripheral nerve. *Dev Neurobiol* **70:** 126–133. doi:10.1002/dneu .20755
- Rotem N, Magen I, Ionescu A, Gershoni-Emek N, Altman T, Costa CJ, Gradus T, Pasmanik-Chor M, Willis DE, Ben-Dov IZ, et al. 2017. ALS along the axons—expression of coding and noncoding RNA differs in axons of ALS models. *Sci Rep* **7:** 44500. doi:10.1038/ srep44500
- Roy S. 2014. Seeing the unseen: the hidden world of slow axonal transport. *Neuroscientist* **20:** 71–81. doi:10.1177/ 1073858413498306
- Saal L, Briese M, Kneitz S, Glinka M, Sendtner M. 2014. Subcellular transcriptome alterations in a cell culture model of spinal muscular atrophy point to widespread defects in axonal growth and presynaptic differentiation. *RNA* 20: 1789–1802. doi:10.1261/rna .047373.114
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga N, Wang J, Ramage D, Ami N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* **13:** 6. doi:10.1101/gr.1239303
- Shi Z, Fujii K, Kovary KM, Genuth NR, Röst HL, Teruel MN, Barna M. 2017. Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs genome-wide. *Mol Cell* 67: 71–83. doi:10 .1016/j.molcel.2017.05.021
- Shigeoka T, Jung H, Jung J, Turner-Bridger B, Ohk J, Lin JQ, Amieux PS, Holt CE. 2016. Dynamic axonal translation in developing and mature visual circuits. *Cell* **166**: 181–192. doi:10.1016/j .cell.2016.05.029
- Shigeoka T, Koppers M, Wong HHW, Lin JQ, Cagnetta R, Dwivedy A, de Freitas Nascimento J, van Tartwijk FW, Ströhl F, Cioni JM, et al. 2019. On-site ribosome remodeling by locally synthesized ribosomal proteins in axons. *Cell Rep* **29:** 3605–3619. doi:10.1016/j .celrep.2019.11.025
- Skutella T, Probst JC, Blanco E, Jirikowski GF. 1994. Localization of tyrosine hydroxylase mRNA in the axons of the hypothalamo-neurohypophysial system. *Mol Brain Res* 23: 179–184. doi:10.1016/ 0169-328X(94)90224-0
- Smith AC, Robinson AJ. 2019. Mitominer v4.0: an updated database of mitochondrial localization evidence, phenotypes and diseases. *Nucleic Acids Res* **47:** D1225–D1228. doi:10.1093/nar/gky1072
- Snipes G, Suter U, Welcher A, Shooter E. 1992. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP- 22/SR13). *J Cell Biol* **117**: 225–238. doi:10.1083/jcb.117.1.225
- Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cal K, Bresque M, Dipaolo A, Farias J, Mercer JA. 2014. Glia to axon RNA transfer. *Dev Neurobiol* **74:** 292–302. doi:10.1002/dneu.22125

Farias et al.

- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Benech JC, Sanguinetti C, Chalar C, Sotelo JR. 2000. Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve. *J Neurosci Res* **62**: 65–74. doi:10.1002/1097-4547(20001001)62:1<65::AID-JNR7>3 .0.CO;2-Z
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cárdenas M, Koenig E, Sotelo JR. 2004. Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (periaxoplasmic ribosomal plaques) of myelinated axons. J Neurobiol 60: 187–196. doi:10.1002/neu .20015
- Sotelo-Silveira J, Crispino M, Puppo A, Sotelo JR, Koenig E. 2008. Myelinated axons contain β-actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation. *J Neurochem* **104**: 545–557.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, et al. 2015. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* **43:** D447–D452. doi:10 .1093/nar/gku1003
- Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrà D, Di Pietro A, Nueda MJ, Ferrer A, Conesa A. 2015. Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res* 43: e140. doi:10.1093/nar/gkv711
- Taylor AM, Berchtold NC, Perreau VM, Tu CH, Li Jeon N, Cotman CW. 2009. Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. J Neurosci 29: 4697–4707. doi:10.1523/ JNEUROSCI.6130-08.2009
- Thakurela S, Garding A, Jung RB, Müller C, Goebbels S, White R, Werner HB, Tiwari VK. 2016. The transcriptome of mouse central nervous system myelin. *Sci Rep* 6: 25828. doi:10.1038/ srep25828
- Tóth EN, Lohith A, Mondal M, Guo J, Fukamizu A, Pourmand N. 2018. Single-cell nanobiopsy reveals compartmentalization of mRNAs within neuronal cells. *J Biol Chem* **293:** 4940–4951. doi:10 .1074/jbc.M117.800763
- Wang B, Bao L. 2017. Axonal microRNAs: localization, function and regulatory mechanism during axon development. J Mol Cell Biol 9: 82–90. doi:10.1093/jmcb/mjw050

- Warner JR, McIntosh KB. 2009. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* 34: 3–11. doi:10.1016/ j.molcel.2009.03.006
- White R, Gonsior C, Krämer-Albers E-M, Stöhr N, Hüttelmaier S, Trotter J. 2008. Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. J Cell Biol **181**: 579–586. doi:10.1083/jcb.200706164
- Wilkinson L. 2012. Exact and approximate area-proportional circular Venn and Euler diagrams. *IEEE Trans Vis Comput Graph* **18**: 321–331. doi:10.1109/TVCG.2011.56
- Willis DE, Van Niekerk EA, Sasaki Y, Mesngon M, Merianda TT, Williams GG, Kendall M, Smith DS, Bassell GJ, Twiss JL. 2007. Extracellular stimuli specifically regulate localized levels of individual neuronal mRNAs. J Cell Biol **178**: 965–980. doi:10.1083/jcb .200703209
- Willis DE, Xu M, Donnelly CJ, Tep C, Kendall M, Erenstheyn M, English AW, Schanen NC, Kirn-Safran CB, Yoon SOO, et al. 2011. Axonal localization of transgene mRNA in mature PNS and CNS neurons. J Neurosci **31**: 14481–14487. doi:10.1523/ JNEUROSCI.2950-11.2011
- Wong HHW, Lin JQ, Ströhl F, Roque CG, Cioni JM, Cagnetta R, Turner-Bridger B, Laine RF, Harris WA, Kaminski CF, et al. 2017. RNA docking and local translation regulate site-specific axon remodeling in vivo. *Neuron* **95:** 852–868. doi:10.1016/j.neuron .2017.07.016
- Yao J, Sasaki Y, Wen Z, Bassell GJ, Zheng JQ. 2006. An essential role for β-actin mRNA localization and translation in Ca²⁺-dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci* **9:** 1265–1273. doi:10 .1038/nn1773
- Zappulo A, Van Den Bruck D, Ciolli Mattioli C, Franke V, Imami K, McShane E, Moreno-Estelles M, Calviello L, Filipchyk A, Peguero-Sanchez E, et al. 2017. RNA localization is a key determinant of neurite-enriched proteome. *Nat Commun* **8:** 583. doi:10 .1038/s41467-017-00690-6
- Zivraj KH, Tung YCL, Piper M, Gumy L, Fawcett JW, Yeo GSHH, Holt CE. 2010. Subcellular profiling reveals distinct and developmentally regulated repertoire of growth cone mRNAs. J *Neurosci* **30**: 15464–15478. doi:10.1523/JNEUROSCI.1800-10 .2010

CAPÍTULO II

Cambios en el repertorio de ARNs axonales asociados a la maduración y envejecimiento.

Introducción.

El envejecimiento es un proceso biológico que forma parte del desarrollo, el cual implica cambios funcionales que van desde el nivel celular al sistémico. En particular, los cambios en el sistema nervioso relacionados con la edad son múltiples e importantes, y afectan tanto al Sistema Central como al Periférico. En los humanos, después de la sexta década de la vida se observa un gran aumento en la probabilidad de desarrollar trastornos neurodegenerativos, como son la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, siendo el envejecimiento el factor de riesgo más importante para su desarrollo (revisado en Mattson & Magnus, 2006; Reitz et al., 2011; Reeve et al., 2014). Curiosamente, algunos cambios observados en el Sistema Nervioso envejecido son comunes a los observados en enfermedades neurológicas (revisado en Salvadores et al., 2017, Hou et al., 2019), lo que sugiere que algunos mecanismos podrían estar involucrados en ambos procesos. Además, el envejecimiento afecta la integridad del sistema neuromuscular, que conecta el cerebro y los músculos esqueléticos a través de las neuronas motoras y la unión neuromuscular (Rygiel et al., 2016). Este proceso conduce a la pérdida de masa y función muscular, causando sarcopenia, que en algunos casos conduce a la inmovilidad y la pérdida de autonomía (Visser & Schaap, 2011; Landi et al., 2012). Si bien las causas de la sarcopenia aún no se conocen en profundidad, ha quedado claro que tanto el músculo como el nervio que lo inerva juegan un papel importante.

En nervios periféricos han sido reportados cambios funcionales, estructurales y bioquímicos relacionados con el envejecimiento. Los estudios realizados en nervios periféricos de ratón demostraron que la mayoría de esos cambios no son lineales a lo largo de la vida (Verdú et al., 2000). Hasta los 6 meses de edad hay un aumento en el potencial de acción del nervio y la velocidad de conducción nerviosa, lo que indica la existencia de un largo período de maduración postnatal de las fibras nerviosas periféricas, que afecta el diámetro de la fibra y la velocidad de conducción. Desde los 6 a los 12 meses de edad, existe una aparente estabilidad morfológica del nervio, seguida de un período (desde los 12 a los 20 meses de edad) donde se observan ligeros cambios asociados con el envejecimiento: el número y la densidad de las fibras nerviosas comienzan a disminuir, la presencia de bucles de mielina aumenta y aparecen varias características de degeneración progresiva (Verdú et al., 2000). Después de los 20 meses de edad, los nervios muestran una desorganización general y una marcada pérdida de fibra. Además, también se observa una alteración de algunos parámetros morfológicos de las fibras nerviosas mielinizadas, observándose una disminución del tamaño, circularidad y grosor de la mielina en animales de edad avanzada (Verdú et al., 1996; Ceballos et al., 1999; Sakita et al., 2016), y la

Capítulo II: Cambios en el repertorio de ARNs axonales asociados a la maduración y envejecimiento.

aparición de bolsas de colágeno y bulbo de cebolla derivadas de cambios en las células de Schwann (Ceballos et al., 1999). Estas alteraciones probablemente se deban a la regulación negativa de los genes estructurales de mielina (como Mbp, Mpz, Pmp22 y Gjb1), la regulación negativa de los genes involucrados en el metabolismo de los esfingolípidos y el transporte de lípidos (Melcangi et al., 1998, Melcangi et al., 2000; Verdier et al., 2012), así como el estado parcial de des-diferenciación entre el estado estacionario y el estado de reparación en respuesta a la lesión que presentan las células de Schwann envejecidas (revisado en Painter, 2017). Por otra parte, otros cambios relacionados con el envejecimiento fueron descritos en células no neuronales, por ejemplo, un aumento significativo en el número de macrófagos y mastocitos en el endoneuro (Ceballos et al., 1999; Büttner et al., 2018). Además, ha sido reportado que el potencial de acción tanto nervioso como muscular, así como la velocidad de conducción nerviosa disminuyen con la edad (Verdú et al., 1996, Walsh et al., 2015).

A nivel neuronal, se describió que los axones se degeneran como resultado del envejecimiento normal y esta característica es uno de los primeros eventos que ocurren en las enfermedades neurodegenerativas (Raff et al., 2002; Fischer & Glass, 2007; Burke & O'Malley, 2013; Kanaan et al., 2013; Salvadores et al., 2017). Los axoplasmas de fibras nerviosas periféricas de ratas ancianas presentan un aumento en el número de vacuolas, mitocondrias degeneradas y lisosomas, lo que probablemente conduce a la degeneración del axón (revisado en Verdú et al., 2000; Pannese, 2011). Además, el transporte axonal rápido y lento caen dramáticamente con el envejecimiento, afectando el transporte de muchas cargas en ambas direcciones (retrógrado y anterógrado) (Milde et al., 2015; revisado en Adalbert & Coleman, 2013). Esta disminución del transporte axonal relacionada con la edad podría predisponer a una variedad de trastornos relacionados con la edad o incluso causar algunos de ellos, ya que este deterioro está claramente establecido como causa de algunas afecciones neurodegenerativas (revisado en Coleman, 2011).

Dado que hay una pérdida extensa de axones durante el envejecimiento normal que precede a la pérdida de cuerpos celulares neuronales (Spencer & Ochoa, 1981; Chung et al., 2017), resulta interesante comprender las bases moleculares involucradas en el desarrollo, mantenimiento y envejecimiento de axones. En la última década, se han realizado avances significativos con respecto a la contribución de la localización de ARNs y la síntesis local de proteínas en la fisiología axonal (revisado en Glock et al., 2017; Cioni et al., 2018; Farias et al., 2019). En particular, dos de estos estudios se centraron en caracterizar la composición del transcriptoma de conos de crecimiento (Zivraj et al., 2010) o axones (Gumy et al., 2011) durante el desarrollo. El estudio de ARNm ubicados en conos de crecimiento de células ganglionares de la retina (RGC) de *Xenopus* en etapas de "búsqueda de caminos" (joven, estadio 32, axon pathfinding) o "llegada al

Capítulo II: Cambios en el repertorio de ARNs axonales asociados a la maduración y envejecimiento.

objetivo" (adulto, estadio 40, "target-arriving") reveló que el número y la complejidad del transcriptoma aumenta dramáticamente con la edad. Los autores afirman que la localización de los ARNm en conos de crecimiento está regulada dinámicamente con la edad, adaptada a las demandas funcionales de la punta del axón en crecimiento a medida que se transforma en la terminal presináptica (Zivraj et al., 2010). El análisis del transcriptoma axonal de etapas embrionarias y adultas provenientes del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de ratón permitió determinar que hay un número similar de transcriptos localizados en ambas etapas. Sin embargo, se observó un cambio significativo en la identidad de los ARNm localizados. Esto sugiere que, aunque el repertorio de ARNm localizados cambia, la capacidad general para transportar ARNm axonales no cambia al llegar a la edad adulta (Gumy et al., 2011). Además, un trabajo reciente describió el translatoma de terminales axonales de RGC *in vivo* a diferentes tiempos durante el ensamblaje de circuitos visuales, incluida la edad adulta. Uno de los principales hallazgos fue que el translatoma axonal está compuesto por dos componentes, uno constitutivo y otro más específico, regulado de acuerdo con las necesidades de cada etapa (Shigeoka et al., 2016).

Cabe señalar que la gran mayoría de los estudios transcriptómicos o translatomáticos axonales se realizaron en axones cultivados *in vitro* (revisado en Farias et al., 2019), siendo escasa la información sobre lo que sucede en los axones *in vivo*. Con el objetivo de caracterizar el transcriptoma de axones motores completamente diferenciados, nuestro grupo modificó la técnica de microdisección de axones, desarrollada originalmente por Koenig (1979), para obtener axoplasma puro derivado de raíces ventrales lumbares. De esta manera, identificamos que el número de ARNs localizados en axones maduros es menor en comparación con los datos *in vitro* descritos. Además, así como en axones *in vitro*, los ARNs localizados en axones maduros se enriquecen principalmente en ARNm relacionados con el citoesqueleto, la traducción y la fosforilación oxidativa (Farias et al., 2020).

En base a los resultados descritos anteriormente, en este trabajo, nuestro objetivo fue investigar los cambios asociados al envejecimiento en el repertorio de ARNs localizados en el dominio axonal de nervios motores periféricos. Para esto, utilizamos la técnica de microdisección axonal modificada (Farias et al., 2020) para aislar ARNs axonales de raíces ventrales lumbares inmaduras y envejecidas. Además, también se obtuvo el transcriptoma de la raíz ventral completa en cada etapa. Los resultados indican que tanto el número como el repertorio de ARNs localizados en los axones motores presentan cambios relacionados con la edad. Una parte del repertorio de ARNs axonales fueron detectados en todas las edades analizadas, que incluye principalmente ARNs codificantes para proteínas relacionadas con traducción, citoesqueleto y mitocondrias. Por otro lado, se identificaron ARNs específicos de cada etapa. Los axones envejecidos presentaron

un número relativo menor de ARNs codificantes de proteínas mitocondriales, viéndose reducido principalmente aquellos que codifican proteínas con funciones en la matriz mitocondrial y la membrana mitocondrial interna. Por último, estudiamos los cambios relacionados con la edad que ocurren en el micro-ambiente de los axones motores (raíces ventrales lumbares). En los ancianos, se identificó una respuesta inflamatoria activada, así como cambios en el nivel de expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos. En resumen, este estudio mostró por primera vez los cambios relacionados con la edad en el repertorio de ARNs localizados en los axones motores periféricos. Estos resultados proporcionan bases importantes para comprender los procesos axonales que ocurren en el envejecimiento normal de los nervios periféricos, los cuales también podrían ocurrir en enfermedades neurodegenerativas.

Materiales y métodos.

Animales.

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley adultas de 2 y 24 meses de edad del bioterio de roedores del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay). Las mismas fueron mantenidas en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con alimentos y agua provistos *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en estricta conformidad con el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA-IIBCE) de la Institución, bajo la ley 18.611 de la República Oriental del Uruguay. El protocolo específico fue aprobado por la CEUA-IIBCE (protocolo experimental N° 005/05/2012). Los animales fueron anestesiados mediante la aplicación intraperitoneal de 100/20 mg/kg de ketamina/xilazina, y posteriormente sacrificadas mediante decapitación.

Aislamiento de axoplasmas de raíces espinales ventrales.

El aislamiento de axoplasmas se realizó según (Farias et al., 2020). Brevemente, las raíces ventrales espinales lumbares se disecaron a partir de ratas sacrificadas. El tejidos fue suspendido en una solución salina modificada de gluconato libre de calcio (Koenig & Martin, 1996), conteniendo 132 mM gluconato de Sodio, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM glucosa, 3.5 mM MgSO4, y 2 mM EGTA, a un pH de 7.2, almacenada a 4°C. Cada raíz ventral, de 3 a 5 mm, se sumergió en una solución de acetato de zinc 30 mM, tricina 0,1 M, pH 4,8, durante 10 minutos para su desnaturalización. Luego, se la transfirió a una placa de cultivo de plástico de 35 mm conteniendo la solución de "pulling" (ácido aspártico 40 mM, Tris 38 mM, NaN3 1 mM y Tween 20 al 0,02%, pH 5,5), en la cual se llevó a cabo la extracción de los axones de su vaina de mielina, mediante la utilización de pinzas de microdisección. La extracción genera un "ramillete" de axones (aproximadamente 30 segmentos de axones), el cual se puede condensar en un paquete, lo que lo hace más fácil de procesar en los siguientes pasos. Cada "ramillete" de axones se condensó en un paquete compacto extrayéndolos brevemente fuera de la solución, excepto por un extremo. Este procedimiento elimina los posibles restos de mielina que queden remanentes en la superficie del axón. Posteriormente, los paquetes de axones se adhirieron a un cubreobjetos tratado con 1% (3- aminopropil) trietoxisilano (Sigma-Aldrich) en etanol, con la ayuda de una herramienta casera ("pestaña"), la cual consiste en una pestaña montada en la punta de una pipeta Pasteur de vidrio. Una vez obtenidos los axoplasmas, se procedió a eliminar, utilizando un bisturí, los extremos de estos cordones, ya que contienen tejido derivado de la raíz completa. Posteriormente, se efectuaron lavados con solución de "pulling", para disminuir aún más las posibles

contaminaciones. Mediante la utilización de la "pestaña" se procedió a despegar los axoplasmas del cubreobjetos. Se unieron todos los paquetes de axoplasmas extraídos, y se los guardó en 20 ul de solución de pulling (en tapa de un tubo eppendorf) a -80°C hasta el momento de la extracción de ARN.

Extracción de ARN de muestras de axoplasmas.

Para las muestras axoplásmicas, la extracción de ARN se realizó con RNAqueous[™]-Micro kit (Ambion, Invitrogen, ThermoFisher Scientific), un kit diseñado para obtener ARN de tan solo 10 secciones de microdisección de captura láser. Primero, las muestras de axoplasma se centrifugaron a velocidad máxima, y la solución tampón se retiró con mucho cuidado. Se reunieron cinco muestras de axoplasma de diferentes animales antes de la extracción de ARN para alcanzar la cantidad mínima de entrada del kit de amplificación lineal (500 pg). Brevemente, se añadieron 100 ul de solución de lisis a los axoplasmas y se incubaron a 42° C durante 5 minutos. Luego, se añadieron a la mezcla 3 ul de aditivo LCM y 129 ul (1.25 volúmenes) de etanol 100% para recuperar ARN grandes y pequeños. La mezcla lisado/etanol se colocó en un tubo con microfiltro y se centrifugó durante 1 minuto a 10000xg. Después, se añadieron 180 ul de solución de lavado 1, y la mezcla se centrifugó nuevamente durante 1 minuto a 10000xg. Se añadió la solución de lavado 2/3 (180 ul), y la mezcla se centrifugó durante 30 segundos a 13000xg y se repitió el lavado una vez más. Se descartó la solución y se centrifugó el filtro durante otro minuto a 13000xg para secarlo. El filtro fue transferido a un tubo de elución y se añadieron 8 ul de solución de elución precalentada. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se centrifugó durante 1 minuto a 13000xg. Posteriormente, se realizó el tratamiento con DNasa, añadiendo 1/10 volumen de 10X DNase I Buffer y 1 uL de DNase I, e incubando la reacción durante 5 minutos a 37 ° C. Para la inactivación de la DNasa, se usó 1/10 volumen de Reactivo de Inactivación de DNasa. Después de centrifugar la reacción durante 1.5 minutos a velocidad máxima, para sedimentar el Reactivo de Inactivación de DNasa, el ARN se transfirió a un tubo libre de RNasa y se almacenó a -80 ° C hasta su posterior procesamiento.

Extracción de ARN de muestras de raíz ventral.

El aislamiento del ARN de las raíces ventrales se realizó con TRI (Sigma-Aldrich), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad y cantidad de ARN se evaluó mediante espectrofotometría (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) y fluorimetría (Qubit 2.0 y kit RNA HS Assay kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Se mezclaron 5 muestras de raíz ventral y se diluyeron a 500 pg. Después de eso, se realizó un segundo paso de extracción de ARN (con RNAqueous[™]-Micro kit) como se describió anteriormente.

RNA-seq de axones micro-disecados y raíces ventrales.

Amplificación lineal de ARN. Tanto los axones micro-disecados como las raíces ventrales se sometieron a una amplificación lineal del ARN usando el Sistema Ovation RNA-Seq v2 (NuGEN, Tecan), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad y la cantidad del ADNc bicatenario resultante se evaluaron por medio del Bioanalyzer 2100 (Agilent) y Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Secuenciación. Las bibliotecas de secuenciación se construyeron y secuenciaron en BGI Genomics (Hong Kong), en la plataforma Illumina HiSeq4000.

Procesamiento y análisis de datos de RNA-Seq.

Las lecturas sin procesar se alinearon con el genoma de referencia de rata (Rnor_6.0, GCA_000001895.4) usando HISAT v2.0.5 (Kim et al., 2015). Las lecturas alineadas fueron ensambladas mediante StringTie v1.3.3b (Pertea et al., 2015, 2016) en un enfoque basado en referencias (opción "-e"). Se utilizó el método TPM (del ingles, *Transcripts per million reads*) para normalizar la expresión génica en cada muestra, y se filtraron los genes de baja expresión (<1 TPM). Para obtener los valores de conteo se utilizó el script de python "prepDE.py".

Para realizar el análisis de saturación se utilizó el paquete de R NOISeq (Tarazona et al., 2015). Los gráficos se realizaron utilizando los siguientes paquetes de R: gplots para el heatmap y venneuler (Wilkinson, 2012) para los diagramas de Venn proporcionales. Para el diagrama de Venn de varios conjuntos de datos, se utilizó una herramienta web (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/).

El análisis de anotación funcional se realizó utilizando el paquete de R topGO v2.38.1 (Alexa & Rahnenfuhrer, 2019), utilizando los términos GO de Proceso Biológico (BP) y Componente Celular (CC) de la base de datos de anotación del genoma de rata, org.Rn. eg.db v3.8.2 (Carlson, 2019a). Los transcriptos detectados en las muestras de axoplasmas se usaron como listas de genes, y las detectadas en todas las muestras analizadas (incluidas las raíces ventrales y las muestras de axoplasma) se usaron como referencia. Se utilizó el algoritmo padre-hijo asociado con la prueba estadística de Fisher. El algoritmo padre-hijo mide la sobre-representación condicional a las anotaciones padre de cualquier término (teniendo en cuenta la estructura gráfica del GO), mientras que los otros enfoques (enfoque de término-a-término) miden la sobre-representación de cada término de forma aislada. En el algoritmo padre-hijo, la sobre-representación de un término se mide con respecto a la presencia de sus términos parentales en el conjunto, resolviendo el problema de que el enfoque término-a-término tiende a detectar falsamente una sobre-

Capítulo II: Cambios en el repertorio de ARNs axonales asociados a la maduración y envejecimiento.

representación de más términos específicos debajo de los términos que se sabe que están sobrerepresentados (Grossman et al., 2007). Se consideró estadísticamente significativo un *p-valor* < 0.05. El enriquecimiento estadísticamente significativo fue representado de la siguiente manera: *: 5.0E-2 - 1.0E-05; **: 1.0E-05 - 1.0E-10; ***: 1.0E-10 - 1.0E-15; ****: <1.0E-15 (**Fig. 2C**).

Para realizar un análisis de GO específico de funciones neuronales (**Fig. 2C**), seleccionamos 575 términos GO relacionados con neuronas (**Tabla S2**) usando los siguientes criterios: todos los términos GO descendientes (512 términos) de "Neuron differentiation (GO: 0030182)", todos los términos GO descendientes (40 términos) de "Neuron death (GO: 0070997)", todos los términos GO descendientes (9 términos) de "Transmission of nerve impulse (GO: 0019226)", y todos los términos GO descendientes (19 términos) de "PNS development (GO: 0007422)". Los términos GO descendientes se identificaron utilizando la función GOBPOFFSPRING de GO.db v3.8.2 (Carlson, 2019b), un paquete de R.

Las redes de interacciones proteína-proteína (PPI, del inglés *Protein-Protein Interaction*) se realizaron con la aplicación stringApp (Doncheva et al., 2019) de Cytoscape (Shannon et al., 2003).

La lista de proteínas mitocondriales se obtuvo de la base de datos MitoMiner v4.0 (http://mitominer.mrc-mbu.cam.ac.uk/release-4.0/begin.do, Smith & Robinson, 2019), utilizando el índice IMPI (del inglés, *Integrated Mitochondrial Protein Index*).

La expresión génica diferencial entre las tres muestras de raíces ventrales se obtuvo mediante comparaciones por pares en orden cronológico (10MO vs. 2MO; 24MO vs 10MO). El análisis de expresión génica diferencial se realizó en R usando el paquete edgeR v3.24.3 (Robinson et al., 2010; McCarthy et al., 2012). El archivo de entrada fue la lista de conteos, y se utilizó como criterio de filtrado un cpm > 1 (del inglés, counts per million). Posteriormente, se realizó la normalización, utilizando el comando "calcnormfactor". El coeficiente biológico de variación (BCV) se estableció manualmente en 0.4 como se recomienda para el caso de no tener réplicas. Los genes con un TPM > 1, |Factor de cambio| > 2 y p-valor < 0,05 se consideraron expresados diferencialmente. El análisis de anotación funcional de los DEG se realizó con topGO. Para una fácil visualización y comprensión de los resultados, utilizamos la función plotGODESeq (https://github.com/gambardella/plotGODESeg) en R. Las entradas para la función plotGODESeg () son un archivo que contiene datos de enriquecimiento GO y un archivo que contiene datos de expresión génica diferencial. El eje Y de la gráfica es el logaritmo negativo del p-valor padre-hijo (obtenido con el topGO). El eje X de la gráfica es el z-score, definida para un término GO dado de

la siguiente manera: (n ° genes sobre-expresados - n ° genes sub-expresados) / sqrt (n ° genes sobre-expresados + n ° genes sub-expresados). El área de cada burbuja es proporcional al enriquecimiento (n ° genes observados / n ° genes esperados). El color de la burbuja refiere al factor de cambio promedio de todos los genes anotados con un término GO determinado. Para el heatmap se utilizó el paquete pheatmap de R (scale = row, clustering_method = average, distance_row = correlation Pearson, cutree_row=6). Para el análisis de clusters se utilizó el paquete de R TCSeq (algorithm = cmeans, k = 6, standarized = T, distance = euclidean).

RT-qPCR para control de calidad y validación de RNA-seq.

El control de calidad de las muestras de axoplasma se realizó en muestras de axoplasmas y raíces ventrales, mediante RT-gPCR para tres marcadores gliales y tres marcadores neuronales (Farias et al., 2020). Para esto se utilizó el kit RT-qPCR EXPRESS qPCR SuperMix (Life Technologies, ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones se realizaron en triplicados biológicos en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (BioRad). El programa de ciclado utilizado para todos los casos fue de 95° C durante 10 min, y 40 ciclos de 95° C durante 15 seg y 60° C durante 1 min. Se utilizaron los siguientes cebadores: Nef-L, 5'-CCGGTTCTTCTCTCTAGGTCCC-3' y 5'-GTAGGAGGTCGAAAAGTACGGC-3'; Nef-M, 5'-AGTCGAGGCCCCCAAGCTCA-3' y 5'-CAGAGGCTGCCAATTCCTCTGC-3'; Nef-H, 5'-CCTAAGCAATGGCCCAGAG-3' 5'-CCTCAAGCTGCCTCACCTTA-3'; MBP, У 5'-ACGGACACCCTTTCAAGTTCAC-3' 5'-GTGCCTGTCTATCCGCAGTG-3'; 5'y Mag, GTGGAGCTGAGCGTCATGTAT-3' y 5'-GTGGAACACAGGATGGAGACTG-3'; 5'-Pmp22, GAATTCCTGTTCCTGTTCTTCTGCCAGCTC-3' y 5'-AAGCTTGTAGATGGCCGCTGCACTCATC-3'<mark>.</mark>

Disponibilidad de datos y materiales.

Las tablas suplementarias están disponibles en el siguiente enlace: <u>https://drive.google.com/drive/folders/1NEqMTea6u1kKnvesvJxkrTpX03UVJgLl?usp=sharing</u>

Resultados.

La técnica de microdisección permite el aislamiento del axoplasma puro de axones motores mielinizados provenientes de diferentes etapas de desarrollo del nervio periférico.

Previamente, caracterizamos el repertorio de ARNs que residen en el axoplasma de axones motores periféricos completamente diferenciados derivados de ratas adultas (10 meses de edad, axones 10MO) (Farias et al., 2020). Para lograrlo, modificamos la técnica de microdisección de axones, desarrollada originalmente por Koenig (1979) y utilizada ampliamente por nuestro grupo para la caracterización *in situ* de componentes de axones *in vivo* (Koenig et al., 2000; Sotelo-Silveira et al., 2004; Kun et al., 2007; Sotelo-Silveira et al., 2008; Calliari et al., 2014). La técnica modificada nos permitió obtener muestras de axoplasma altamente puras para realizar el análisis de los ARNs localizados en dicho dominio neuronal (Farias et al., 2020). Utilizando el mismo método de microdisección axonal, en el presente trabajo, estudiamos si los ARNs localizados en los axones varían durante la maduración y el envejecimiento del nervio. Para ello obtuvimos transcriptomas de dos puntos temporales definidos de nervios motores: inmaduros (2 meses, axones 2MO) y ancianos/envejecidos (24 meses, axones 24MO), para estudiarlos comparativamente. También obtuvimos el transcriptoma de la raíz ventral medular completa de cada etapa (raíces ventrales 2MO y raíces ventrales 24MO), las cuales sirvieron como punto de comparación para los análisis de calidad.

El análisis de secuenciación masiva de las muestras de axoplasma detectó 2470 ARNs en axones 2MO y 2353 ARNs en axones 24MO. Además, se detectaron 12059 y 12380 ARNs en raíces ventrales 2MO y 24MO, respectivamente. Para conocer el rendimiento de la técnica de microdisección de axones en estas muestras, realizamos parte del control de calidad desarrollado previamente (Farias et al., 2020). El número de ARNs detectados en las muestras de axoplasma fue significativamente menor que el número de ARNs detectados en las muestras de axoplasma fue significativamente menor que el número de ARNs detectados en las raíces ventrales. La gran mayoría de los ARNs detectados en las muestras de axones también se detectaron en las muestras de raíces ventrales de la misma etapa (**Fig. 1A-B**). Los gráficos de saturación mostraron que la saturación se logró globalmente y en la categoría de ARNs codificantes de proteínas en ambos tipos de muestras (**Fig. 1C-D**), lo que sugiere que no hubo sesgos en la preparación de las librerías de secuenciación. Para demostrar que los ARNs detectados en las muestras de axoplasma no eran los ARNs más abundantes de las raíces ventrales, analizamos la abundancia de los ARNs detectados en cada etapa en función de la posición del ARN (ranking) en la muestra

de axoplasma. El patrón obtenido indica que no todos los ARNs detectados en los axones tienen una alta expresión en las raíces ventrales. Además, los ARNs axonales no detectados en las raíces ventrales no mostraron necesariamente una baja abundancia en los axones (Fig. 1E-F). Esto sugiere que los ARNs detectados en las muestras de axoplasma no se deben a una mera dilución de los ARNs más abundantes de las raíces ventrales. Al centrarnos en los ARNm que codifican proteínas constitutivas de la mielina (como Mbp, Pmp2, Pmp22, Mpz, S100b), se puede observar que la abundancia de los mismos se encuentra reducida en las muestras de axoplasma. Por otro lado, se observó que los marcadores neuronales (Nefl, Nefm, Nefh) aumentan su abundancia en muestras de axoplasma (Fig. 1E-F). Además, confirmamos el grado de pureza de las muestras de axoplasma al realizar un control de calidad a nivel molecular implementado previamente. El mismo consiste en una cuantificación relativa de los ARNm que codifican marcadores gliales (Mbp, Pmp22, Mag) y neuronales (Nefl, Nefm, Nefh) en réplicas biológicas de ARN no amplificado de axoplasma y raíces ventrales por RT-qPCR (Farias et al., 2020). Las muestras de axones 2MO mostraron una gran disminución en la abundancia de marcadores gliales en comparación con las muestras de raíz ventral 2MO, presentando las últimas una abundancia 8 veces mayor para el caso de Mbp y más de 24 veces mayor para Pmp22 y Mag (Fig. 1G, abundancia relativa expresada en log2: *Mbp*: $22.333 \pm 0.681 \text{ y} 25.467 \pm 0.451$; *Pmp22*: 19.500 ± 0.458 y 24.133 ± 0.702 y Mag: no detectable y 14.233 ± 0.702; en axoplasma y muestra de raíz ventral, respectivamente). Mientras tanto, los marcadores neuronales aumentan su abundancia en la muestra de axones 2MO en comparación con la muestra de raíz ventral 2MO más de 18 veces (Fig. 1G, abundancia relativa expresada en log2: Nefl: 25.133 ± 0.569 y 14.867 ± 0.551; Nefm: 19.767 ± 0.833 y 15.533 ± 0.569 y Nefh: 14.667 ± 0.451 y no detectado; en axoplasma y muestras de raíz ventral, respectivamente). Por otro lado, la muestra de axones 24MO también mostró una disminución en la abundancia de marcadores gliales de más de 4 veces (Fig. 1H, abundancia relativa expresada en log2: *Mbp*: $21.667 \pm 0.513 \text{ y} 23.467 \pm 0.351$; *Pmp22*: $18.833 \pm 0.603 \text{ y} 20.700 \pm 0.529 \text{ y} Mag$: no detectable y 13.033 ± 0.902 ; en axoplasma y muestra de raíz ventral, respectivamente). El aumento en la abundancia de marcadores neuronales también se observó en las muestras de axones 24MO, que van desde 7 veces para Nefm y más de 22 veces para Nefl y Nefh (Fig. 1H, abundancia relativa expresada en log2: Nefl: 22.100 ± 0.59 y 17.533 ± 0.551; Nefm: 20.467 ± 0.569 y 17.600 ± 0.458 y Nefh: 10.167 ± 0.0751 y no detectado; en axoplasma y muestras de raíz ventral, respectivamente).

Estos resultados mostraron que las muestras de axoplasma poseen bajas cantidades de ARNm gliales, mientras que poseen gran abundancia de ARNm específicos neuronales. Por lo tanto, podemos afirmar que el método de microdisección de axones modificado es una técnica útil para obtener axoplasmas derivados de nervios periféricos de diferentes etapas.



Figura 1. Análisis de RNA-Seq de axones motores inmaduros y envejecidos. A-B. Diagramas de Venn donde se observa el número de genes detectados en las muestras de raíz ventral y axoplasma derivadas de ratas inmaduras (A) y envejecidas (B). C-D. Gráficos de saturación de muestras de raíz ventral y axoplasma derivados de muestras inmaduras (C) y envejecidas (D). Las líneas continuas muestras el comportamiento a nivel global y las líneas discontinuas indican el comportamiento para los genes que codifican proteínas. E-F. Abundancia relativa (log 2 TPM) de ARNs detectados en muestras de axoplasma (puntos azules) en función de su ranking en muestras inmaduras (E) y envejecidas (F). También se muestra la abundancia en muestras de raíz ventral (puntos naranjas). Los ARNs que fueron detectados en muestras de axoplasma y no en raíz ventral se representan como líneas negras. Se indica la posición de algunos marcadores gliales (*Mpz, Mbp, Pmp2, Pmp22 y S100b*) y marcadores neuronales (*Nefl, Nefm y Nefh*). G-H. Control de calidad a nivel molecular de la pureza de las muestras de axoplasma inmaduro (G) y envejecido (H) por RT-qPCR. Cuantificación relativa de marcadores gliales (*Mbp, Mag y Pmp22*) y neuronales (*Nefl, Nefm y Nefh*) en diferentes muestras de raíces axoplásmicas y ventrales aisladas de tres animales distintos.

El envejecimiento modifica el repertorio de ARNs localizados en axones in vivo.

Para evaluar los cambios en el repertorio de ARNs localizados en los axones relacionados con la maduración y el envejecimiento, comparamos los ARNs detectados en las muestras de axoplasma de axones 2MO y axones 24MO con los descritos previamente en axones 10MO (Farias et al., 2020). El número de ARNs detectados en las muestras de axoplasmas varía significativamente, disminuyendo en el axón completamente diferenciado (10MO), mientras que las muestras de axones inmaduros (2MO) y envejecidos (24MO) mostraron un mayor número de ARNs localizados, y similar entre ambas muestras. Sin embargo, los ARNs detectados en las muestras de raíces ventrales mostraron pocos cambios durante los períodos examinados (**Fig. 2A, Tabla S1**). Además, los axones también mostraron una gran variación en el repertorio de ARNs localizados en cada etapa analizada. La comparación mostró que los axones inmaduros, maduros y envejecidos compartían solo 401 ARNs. Por otro lado, 1286 ARNs fueron detectados exclusivamente en la muestra de axones 2MO, 340 ARNs en la muestra de axones 10MO y 1223 ARNs en la muestra de axones 24MO (**Fig. 2B**). Tanto la variación en el número de ARNs localizados como la variación en su identidad están de acuerdo con los datos reportados en dos estudios previos (Gumy et al., 2011; Shigeoka et al., 2016).

Dadas las grandes diferencias encontradas en el repertorio de ARNs ubicados en axones de diferentes edades, nos centramos en el análisis de los procesos biológicos subyacentes en estos axones. Para lograr esto, realizamos un análisis de Ontología Génica (GO) para identificar los términos de procesos biológicos enriquecidos significativamente para cada conjunto de datos de axones, utilizando el número total de ARNs detectados en las muestras de axones y raíces ventrales de todas las etapas estudiadas como referencia (14301 ARNs, Tabla S1). La mayoría de los términos GO enriquecidos son compartidos por las tres etapas estudiadas, aunque se pudieron observar algunas diferencias. El transcriptoma de axones inmaduros y maduros se encuentra altamente enriguecido en términos GO de procesos celulares metabólicos como son la síntesis de proteínas, incluyendo "translation", "peptide metabolic process" y "amide biosynthetic process". Si bien estas categorías también se enriquecieron en el transcriptoma de axones envejecidos, las más enriquecidas corresponden a términos relacionados con la organización de componentes celulares (Fig. 2C, Tabla S2). Al realizar el análisis utilizando 575 términos GO relacionados con neuronas (Tabla S2), observamos que los axones inmaduros se enriquecen en términos GO de desarrollo del sistema nervioso periférico, incluyendo "Schwann cell development" y "Schwann cell differentiation". Por otro lado, los axones maduros se enriquecen en términos relacionados con el desarrollo y la diferenciación neuronal del sistema nervioso periférico, y la propagación del potencial de acción neuronal, mientras que los axones envejecidos se enriguecen en términos

relacionados con el desarrollo del axón, incluido "axon development" y "axonogenesis" (**Fig. 2C**, **Tabla S2**). Una categoría interesante que está enriquecida (y es marginalmente significativa) en los axones envejecidos es la respuesta neuroinflamatoria, donde encontramos a los ARNs de *Lrrk2*, *Igf1*, *Psen1*, *Nr1d1*, *Nampt*, *Ifngr1*, *Jun* y *Atm* (**Tabla S2**). La presencia de estos ARNs podría estar relacionada con una respuesta neuronal a la degeneración que ocurre durante el envejecimiento normal, tanto en la propia neurona como en las células de Schwann circundantes. Además, nos pareció interesante analizar la ontología de los ARNs únicos de cada etapa. Sorprendentemente, encontramos que los términos GO enriquecidos en estos conjuntos de datos eran muy similares entre sí (**Tabla S2**). Esto sugiere que la síntesis local de proteínas en el axón estaría apoyando/complementando las mismas funciones con nuevas proteínas a lo largo del desarrollo, pero cambiando la identidad de las proteínas sintetizadas localmente.



Figura 2. Caracterización del transcriptoma de axones motores *in vivo* **a lo largo de la maduración y el envejecimiento del nervio. A.** Cambio en el número de genes detectados en raíces ventrales y muestras de axoplasma a lo largo de la maduración y envejecimiento del nervio. **B.** Comparación de los repertorios de ARNs detectados en axones inmaduros (2MO), maduros (10MO) y envejecidos (24MO), donde se observa el número de genes comunes y únicos de cada etapa. **C.** Términos GO enriquecidos (proceso biológico) para transcriptomas axonales, ordenados por significancia para cada etapa (*p-valor* = algoritmo padre-hijo y prueba exacta de Fisher). El enriquecimiento fue analizado por topGO (Tabla S2). El color indica el log2 del enriquecimiento. Las celdas estadísticamente significativas se marcan de la siguiente manera: *: 5.0E-02-1.0E-05; **: 1.0E-05-1.0E-10; ***: 1.0E-10-1.0E-15; **** <1.0E-15.

Por lo tanto, estos resultados muestran que el repertorio de ARNs localizados en el axoplasma cambia durante la maduración y el envejecimiento del nervio, aunque muchos procesos biológicos se encuentran enriquecidos en todas las etapas.

Los ARNs presentes en axones de diferentes edades codifican proteínas con funciones centrales, relacionadas principalmente a la traducción, el citoesqueleto y las mitocondrias.

Como se señaló anteriormente, al comparar la identidad de los ARNs localizados en axones provenientes de diferentes etapas, se observó que solo 401 ARNs estaban presentes en axones de las tres edades estudiadas (Fig. 2B). La red de interacción proteína-proteína (PPI, del inglés Protein-Protein Interaction) de estos ARNs presentó un enriquecimiento en interacciones (nodos = 276, aristas = 2525, grado medio de nodo = 18.3, p-valor de enriquecimiento PPI < 1.0E-16), lo que indica que la interacción de los nodos no es al azar y que el número observado de aristas es significativo (Fig. 3A). El resultado mostró tres clusters formados por nodos altamente conectados, que combinan proteínas relacionadas con la traducción (GO: 0006412, 4.30E-29), mitocondrias (GO: 0005739, 1.62E-10) y citoesqueleto (GO: 0005856, 4.15E- 08), siendo estos algunos de los términos enriquecidos en el análisis GO. El análisis de la posición ocupada por los 401 ARNs comunes en axones de diferentes edades en el ranking de expresión de cada una de las muestras mostró que tienen abundancias altas, medias y bajas, aunque una gran proporción (73% para axones 2MO, 59% para axones 10MO y 76% para los axones 24MO) está por encima del rango medio de cada muestra (Fig. 3B). Aunque estos ARNs están presentes en todas las muestras, identificamos algunos casos en los que hay un gran cambio en su posición. Los ARNs codificados por el ADN mitocondrial se ubicaron en las primeras 60 posiciones en todas las muestras (Fig. 3C, líneas rojas), excepto para Mt-nd3, que cambia su ranking de 36 en 2MO, a 61 en 10MO y a 138 en 24MO (Fig. 3C, flecha 1). A su vez, hubo cambios en el ranking de algunos ARNs que codifican proteínas mitocondriales, codificados por el ADN nuclear (Fig. 3C, líneas naranjas), como Ndufb (ranking 46 en 2MO, 75 en 10MO y 1040 en 24MO, Fig. 3C flecha 2) y Cox8a (ranking 1432 en 2MO, 361 en 10MO y 375 en 24MO, Fig. 3C flecha 3). En el caso de los ARNs que codifican proteínas ribosomales, identificamos al ARNm de Rpl21, cuyo ranking disminuye a medida que aumenta la edad (ranking 92 en 2MO, 247 en 10MO y 794 en 24MO, Fig. 3D flecha 1) y el ARN de Rpl26, que aumenta su ranking a medida que el axón envejece (ranking 2068 en 2MO, 613 en 10MO y 145 en 24MO, Fig. 3D flecha 2). Finalmente, destacamos dos ejemplos de ARNs que codifican proteínas relacionadas con el citoesqueleto. El ranking del ARNm de Nefh disminuye a medida que aumenta la edad (ranking 182 en 2MO, 735 en 10MO y 1596 en 24MO, Fig. 3E flecha 1), mientras que el ranking del ARNm de *Map4* aumenta (ranking 1864 en 2MO, 188 en 10MO y 147 en 24MO, **Fig. 3E** flecha 2).



Figura 3. Caracterización de genes centrales detectados en muestras de axoplasma de diferentes edades. A. Red de interacciones proteína-proteína de los ARNs centrales (401 ARNs) identificados en axones motores inmaduros (2MO), maduros (10MO) y envejecidos (24MO) utilizando la base de datos STRING. Estos ARNs se encuentran altamente conectados, y están relacionados con las mitocondrias (rojo), la traducción (verde) y el citoesqueleto (azul). B. Representación del ranking de los 401 ARNs presentes en axones de diferentes edades. Cada uno de los 401 genes se representa como una línea negra. Se indica el porcentaje de ARNs con un ranking superior a la mediana. **C-E.** Representación de rankings de los ARNs que codifican proteínas mitocondriales (**C**), proteínas ribosomales (**D**) o proteínas relacionadas con el citoesqueleto (**E**) presentes en los axones de las tres etapas analizadas. Se indican ejemplos de ARNs para los cuales hay cambios importantes en el ranking. **C.** Los ARNs codificados por el ADN mitocondrial se representan como líneas rojas, mientras que los ARN codificados por el ADN nuclear se representan como líneas naranjas. 1: *Mt-nd3*, 2: *Ndufb*, 3: *Cox8a*. **D.** 1: *Rpl21*, 2: *Rpl26*. **E.** 1: *Nefh*, 2: *Map4*.

Previamente, Holt y colaboradores describieron la presencia de diferentes cantidades de ARNs codificantes de proteínas relacionadas al citoesqueleto, la traducción y mitocondrias en axones de diferentes etapas de desarrollo (Gumy et al., 2011). Por otro lado, el mismo grupo también reportó cambios similares en el translatoma de terminales axonales de RGC derivados de etapas embrionarias, postnatales y adultas (Shigeoka et al., 2016). Estos resultados podrían estar

indicando la importancia de la localización y traducción de este grupo de genes centrales en axones de diferentes etapas de desarrollo, incluso en axones adultos.

Cambios en la localización axonal de ARNs que codifican proteínas mitocondriales relacionados con la edad.

Las mitocondrias son organelos esenciales en todas las células, pero específicamente importantes para muchas funciones neuronales, como mantener el potencial de reposo y los potenciales de acción de disparo y la neurotransmisión en los lados pre- y post-sináptico, que son procesos energéticamente costosos (Howarth et al., 2012). Es ampliamente aceptado que la disfunción mitocondrial es un mecanismo general del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad (revisado en Lane et al., 2015), y sus funciones en el envejecimiento se agrupan en la teoría mitocondrial del envejecimiento, una variante de la teoría de envejecimiento por radicales libres (Loeb et al., 2005). Dada la gran cantidad de mitocondrias en los axones y el hecho de que están involucrados en una gran cantidad de procesos axonales, nos preguntamos si durante la maduración y el envejecimiento del nervio periférico hay cambios en los ARNm localizados en los axones que codifican las proteínas mitocondriales. El porcentaje de ARNm que codifica proteínas mitocondriales en relación con el número total de genes detectados en los axones cambia durante la maduración y el envejecimiento de la neurona. En axones inmaduros, el 12.3% de los ARNs detectados en los axones codifica proteínas mitocondriales, mientras que este número es el 14.2% en axones maduros y menos del 10% en axones envejecidos (Fig. 4A, Tabla S3). Además, a medida que los axones envejecen, observamos una disminución considerable tanto en el número relativo como absoluto de ARNm que codifican proteínas mitocondriales ubicadas en la membrana mitocondrial interna (IMM) como en la matriz mitocondrial (Fig. 4A). El análisis global de GO de los ARNs que codifican proteínas mitocondriales no mostró grandes diferencias en términos enriquecidos en las diferentes edades (Tabla S3). Al analizar la identidad de los ARNs que codifican proteínas mitocondriales, se observó que 71 de esos ARNs estaban presentes en las tres edades, mientras que había una gran proporción de ARNs presentes solo en una de las etapas estudiadas (Fig. 4B). Los ARNs presentes únicamente en axones inmaduros se enriguecieron en términos GO relacionados con la dinámica mitocondrial, identificando ARNs que codifican proteínas clave en los procesos de fisión y fusión, como Fis1, Dnm1l, Bnip3, Mief1 y Oma1 (revisado en van der Bliek et al., 2013; Ni et al., 2015; Fu et al., 2019). Por otro lado, los axones maduros se enriquecieron en el término GO "regulation of cellular response to oxidative stress", identificando los ARNm de proteínas clave como Sod2 (Kokoszka et al., 2001; revisado en Flynn y Melov, 2013) y Hspb1 (Arrigo, 2001) solo en esta etapa. Finalmente, entre los ARNs que

codifican proteínas con funciones relacionadas con las mitocondrias ubicadas solo en axones envejecidos, algunos se asociaron con el proceso de envejecimiento, como *Lrrk2* (Singh, et al., 2019), *Psen1* (Dixit et al., 2017; Sarasija & Norman, 2018).



Figura 4. Cambios en la localización de ARNm que codifican proteínas mitocondriales en axones motores debidos a la maduración y el envejecimiento. A. Porcentaje de ARNm que codifican proteínas mitocondriales en relación con el número total de ARNs detectados en axones motores inmaduros (2MO), maduros (10MO) y envejecidos (24MO). También se muestra el porcentaje de ARNm que codifica proteínas mitocondriales que cumplen funciones en diferentes dominios mitocondriales en relación con el número de ARNm que codifican proteínas mitocondriales. OMM: membrana mitocondrial externa; Inter. space: espacio intermembrana; IMM: membrana mitocondriales. B. Comparación de los repertorios de ARNs que codifican proteínas mitocondriales. B. Comparación de los repertorios de ARNs que codifican proteínas mitocondriales detectadas en axones inmaduros (2MO), maduros (10MO) y envejecidos (24MO). Se muestran los términos GO enriquecidos y los genes relacionados con ellos en los ARNs únicos detectados en cada etapa.

Estos resultados mostraron que hay un cambio en el número y el repertorio de ARNm que codifican proteínas con función mitocondrial a lo largo de la maduración y el envejecimiento del axón, cambiando así la capacidad de sintetizarlos localmente y posiblemente afectando la función mitocondrial.

El micro-ambiente que rodea los axones motores también presenta cambios en su transcriptoma relacionados con la edad.

Para identificar los cambios relacionados con la edad que ocurren en el micro-ambiente de los axones motores periféricos durante la maduración y el envejecimiento del nervio, analizamos los genes expresados diferencialmente (DEG, del inglés *Differential Expressed Genes*) en raíces espinales ventrales inmaduras (2MO), completamente maduras (10MO) y envejecidas (24MO).
Identificamos 12059, 11334 y 12380 genes expresados en raíces ventrales de 2, 10 y 24 meses, respectivamente. La identificación de los DEG se realizó a través de dos comparaciones. Por un lado, se compararon las muestras de 10MO versus 2MO, buscando genes que cambien su expresión cuando el nervio se encuentra completamente maduro. Por otro lado, comparamos las muestras de 24MO versus 10MO, buscando genes que cambien su expresión cuando el nervio envejece. Para comprender los procesos biológicos subyacentes en esta diferenciación, llevamos a cabo el análisis GO de los DEG (utilizando todos los genes detectados en las muestras como referencia, Fig. 5A-B). Casi el quince por ciento de los genes se expresaron diferencialmente en nervios completamente maduros en comparación con los inmaduros, 743 de estos sobreexpresados y 970 sub-expresados (Tabla S4). Los términos GO más significativamente enriquecidos en los DEG se encuentran relacionados con el transporte de iones (incluidos los iones de calcio y potasio) y el proceso del ciclo celular (incluidos los términos relacionados con la regulación del proceso mitótico) (Fig. 5A, Tabla S4). Como se puede observar en la Figura 5A, los z-scores para los términos relacionados con el transporte de iones indican un mayor número de genes sobre-expresados que genes sub-expresados asociados con estas categorías. En contraste, los z-scores para los términos relacionados con el proceso del ciclo celular indican un mayor número de genes sub-expresados que genes sobre-expresados asociados con estas categorías (Fig. 5A). Por otro lado, 2171 genes se expresaron de manera diferencial cuando se compararon las raíces ventrales envejecidas con las maduras (1341 sobre-expresados y 830 subexpresados) (Tabla S4). Los términos GO relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria (incluyendo "proceso del sistema inmune" y su regulación, "respuesta inflamatoria" y su regulación, entre otros), la localización de lisosomas, la homeostasis de los lípidos, la nucleación de actina y el proceso metabólico de proteoglicanos fueron algunos de los más significativos (pvalor < 0,01) (Fig. 5B, Tabla S4). Los términos GO relacionados con la respuesta inflamatoria e inmune mostraron z-scores altos (Fig. 5B), lo que indica que estaban enriquecidos en los genes sobre-expresados. Esto sugeriría que estas vías se activan en los nervios envejecidos. Uno de los términos enriquecidos en genes sub-expresados fue "proceso metabólico de proteoglicanos", que podría estar relacionado con los cambios observados en la matriz extracelular de los nervios envejecidos (Esquisatto et al., 2014).

El análisis de agrupamiento jerárquico de todos los DEG nos permitió observar los patrones de expresión de los genes a lo largo del período estudiado (desde el nervio inmaduro hasta el envejecido), identificando grupos de genes que tienen expresión etapa-específica y otros que se expresaron en dos de los tres puntos temporales estudiado (**Fig. 5C**). El análisis de co-expresión se utilizó para agrupar los DEG en seis clusters (**Fig. 5D**). Los clusters 1 a 3 agruparon genes con expresión etapa-específica, mientras que los clusters 4 a 6 agruparon genes presentes en dos de

las tres etapas estudiadas. Posteriormente, realizamos el análisis ontológico de los genes agrupados en cada cluster (**Tabla S4**), destacando algunos de los resultados. El cluster 3 (ARNs altamente expresados en la muestra envejecida) se enriqueció en términos GO relacionados con la respuesta inmune, la producción de citocinas y la proliferación celular. El cluster 4, que agrupa los ARNs altamente expresados en nervios inmaduros y maduros, se enriquece en términos GO relacionados con la producción de ATP, la organización del citoesqueleto y la sinapsis. Mientras tanto, el cluster 5, que agrupa genes altamente expresados en nervios maduros y envejecidos, se enriquece en el término GO envejecimiento.

Estos resultados nos permitieron conocer los cambios que ocurren en los nervios periféricos a lo largo del desarrollo a nivel molecular, que están de acuerdo con lo reportado a nivel morfológico y funcional. Los nervios inmaduros (2 meses) expresan genes relacionados con el desarrollo, mientras que los envejecidos (24 meses) expresan genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria.



Figura 5. Análisis de agrupamiento de los genes expresados diferencialmente (DEG) en las raíces ventrales a lo largo de la maduración del nervio periférico (10MO vs 2MO) y el envejecimiento (24MO vs 10MO). A-B. Términos de ontología génica (GO, proceso biológico) enriquecidos en los DEG durante la maduración (A) y el envejecimiento (B) de raíces ventrales. El enriquecimiento fue analizado por topGO (Tabla S4). El eje Y representa el *p-valor* (-log10), y el eje X representa el z-score, definido para un término GO dado de la siguiente manera: (n° genes sobre-expresados - n° genes sub-expresados) / sqrt (n° genes sobre-expresados + n° genes sub-expresados). El área de cada burbuja es proporcional al enriquecimiento del término GO y el color refiere al factor de cambio promedio de todos los genes anotados con un término GO dado. **C.** Agrupación jerárquica de todos los DEG. El TPM (transcriptos por millón) se utilizó para estimar el nivel de expresión génica. El cambio de color de amarillo (altamente expresado) a azul (baja expresión) representa el valor relativo del nivel de expresión log2. La pertenencia del gen a cada uno de los grupos presentados en D se indica con colores. **D.** Análisis de co-expresión de todos los DEG. Rojo, alta correlación entre genes; amarillo, baja correlación entre genes. Se muestran los números de DEG en cada grupo. La identidad de los DEG en cada grupo se enumeran en la Tabla S4.

Discusión.

Los efectos del proceso de envejecimiento se pueden observar en todas las células y tejidos, pero quizás los producidos en el sistema nervioso se vuelven más importantes debido a la gravedad de los trastornos y enfermedades relacionados con la edad que desarrolla este sistema. Si bien se sabe que las enfermedades que afectan el sistema nervioso central, como el Alzheimer, el Parkinson y Huntington, tienen un enorme costo personal y financiero para los afectados y sus familias, así como para los servicios de salud, los cambios relacionados con la edad en el sistema nervioso periférico también afecta con frecuencia a los ancianos y contribuye significativamente a una disminución en la calidad de vida. Dado que los cambios que ocurren en los nervios debido al envejecimiento son similares a los observados en las enfermedades neurodegenerativas (revisado en Salvadores et al., 2017; Hou et al., 2019), es interesante entender los mecanismos que subyacen a ambos procesos. Para identificar los posibles cambios transcriptómicos que ocurren en los axones en diferentes etapas de maduración y envejecimiento de los nervios periféricos, analizamos los ARNs localizados en los axones motores derivados de raíces ventrales medulares inmaduras y envejecidas, y los comparamos con los datos de axones derivados de raíces ventrales medulares ventrales maduras, obtenidas previamente (Farias et al., 2020).

Tanto los resultados del análisis de pureza de las muestras de axoplasma a través del análisis de datos de RNA-seq (Fig. 1E-F) como por RT-qPCR de marcadores gliales y neuronales (Fig. 1G-H) mostraron que la técnica de micro-disección, modificada previamente por nuestro grupo (Farias et al., 2020), trabaja de manera similar en axones de diferentes edades, manteniendo la pureza del axoplasma aislado. Si bien en los axones inmaduros (2MO) y envejecidos (24MO) se detectaron menos ARNs que en los axones cultivados in vitro (revisado en Farias et al., 2019), este número representa más del doble de ARNs que los detectados en los axones maduros (10MO) (Fig.2A). Análisis posteriores son necesarios para comprender la diferencia en el número de ARNs localizados en axones in vivo de diferentes estadios. Además de la diferencia en el número de ARNs localizado en axones de diferentes edades, hubo un amplio cambio en el repertorio. Solo se detectaron 401 ARNs en común entre los axones de las tres edades analizadas, y al comparar los axones de 2MO y 24MO (que poseen un número similar de ARNs detectados) se observa que menos de la mitad de los ARNs se detectan en ambas muestras (Fig. 2B). Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados de Gumy y colaboradores, quienes encontraron que los axones derivados de DRG embrionarios y adultos contienen un número significativo de transcriptos que son exclusivos de cada etapa de desarrollo (Gumy et al., 2011). Shigeoka y colaboradores fueron un paso más allá, analizando los ARNm que se estaban traduciendo en las terminales axonales de

Capítulo II: Cambios en el repertorio de ARNs axonales asociados a la maduración y envejecimiento.

RGC en diferentes momentos durante el ensamblaje de los circuitos visuales, incluida la edad adulta. En dicho trabajo reportaron que el translatoma axonal tiene una regulación extensa durante todo el desarrollo, con solo el 27% de los ARNm traducidos en todas las etapas (Shigeoka et al., 2016). En nuestro caso, los cambios en el repertorio de ARNs localizados en los axones a lo largo del tiempo se reflejaron en algunos términos GO enriquecidos diferencialmente (Fig. 2C, Tabla S2). Analizando los términos GO "neuronales" (ver materiales y métodos) se observó que la muestra de 2MO está enriquecida en ARNs asociados con términos relacionados con el desarrollo de la célula de Schwann. Esto podría estar de acuerdo con el proceso de maduración que está ocurriendo en el nervio periférico a esta edad, que afecta tanto el diámetro de la fibra como la velocidad de conducción (Verdú et al., 2000; Sakita et al., 2016). Por otro lado, los axones 24MO poseen un enriquecimiento en términos como "desarrollo de axones" y "axonogénesis". Esto podría indicar una activación de las vías de crecimiento axonal en axones envejecidos, apoyando localmente el brote axonal compensatorio documentado en la unión neuromuscular de individuos adultos (Siu & Gordon, 2003; Jang & Van Remmen, 2011; Kwon & Yoon, 2017; Taetzsch & Valdez, 2018). Sin embargo, al analizar la ontología de los ARNs únicos de cada etapa estudiada, observamos que estaban prácticamente enriquecidos en los mismos términos GO que se observaron para todos los ARNs de cada edad. Esto podría indicar que el transporte de ARNs, en combinación con la síntesis local de proteínas, estaría apoyando/complementando las mismas funciones, pero con un repertorio diferente de ARNm dependiendo de la etapa. Centrándonos en los ARNs comunes presentes en axones de diferentes edades, observamos que la gran mayoría de ellos codifica proteínas relacionadas con la traducción, el citoesqueleto y las mitocondrias (Fig. 3A). Este grupo de genes centrales presentes en axones de diferentes edades también fue observado previamente por nuestro grupo al comparar axones de diferentes tipos de neuronas y bajo diferentes condiciones de crecimiento (in vitro vs. in vivo) (Farias et al., 2020). Aunque este grupo de genes se encuentra presente en todas las etapas estudiadas, observamos que el ranking ocupado por algunos de estos ARNs cambia notablemente a medida que el axón envejece (Fig. 3C-E). Esto podría indicar una regulación de la expresión de estos genes, al menos a nivel de transporte y localización axonal. Juntos, estos hallazgos están en línea con el trabajo de Shigeoka y colaboradores (2016), donde se propone que el translatoma axonal se compone de dos componentes: un translatoma constitutivo, que codifica proteínas relacionadas con la traducción, el citoesqueleto y las mitocondrias; y otro etapa-específico, que codifica las proteínas necesarias para que las funciones de esa etapa particular sean cumplidas.

Por otro lado, analizamos si hubo cambios en el repertorio de ARNs axonales que codifican proteínas mitocondriales, ya que este es un organelo clave para una amplia variedad de funciones neuronales (Howarth et al., 2012), así como su disfunción está relacionada con varios

Capítulo II: Cambios en el repertorio de ARNs axonales asociados a la maduración y envejecimiento.

enfermedades neurodegenerativas (revisado en Lane et al., 2015). El porcentaje de ARNs que codifica proteínas mitocondriales disminuye en los axones envejecidos, siendo los ARNs que codifican proteínas que cumplen funciones en la matriz mitocondrial y la membrana mitocondrial interna los más afectados (Fig. 4A). Cabe señalar que en los tres estadios estudiados se detectaron los 13 ARNs producto de genes mitocondriales (ADN mitocondrial) que codifican proteínas, ubicándose en todos los casos en las primeras posiciones, aunque con alguna pequeña variación. Por lo tanto, las diferencias en cuanto a la presencia de ARNs codificantes de proteínas mitocondriales en axones de diferentes edades está dada por la localización diferencial de aquellos ARNm codificados por el ADN nuclear. Los axones inmaduros poseen un conjunto de ARNs que codifica proteínas relacionadas con la fisión y fusión mitocondriales, y estos términos GO no se enriguecieron en las otras dos edades. Esto último podría indicar un desajuste en la dinámica mitocondrial, lo que conduce a una disfunción mitocondrial. Por otro lado, entre los ARNs que codifican proteínas mitocondriales presentes solo en axones envejecidos, algunos de ellos están relacionados con el proceso de envejecimiento, como Lrrk2 y Psen1 (Dixit et al., 2017; Sarasija & Norman, 2018; Singh, et al., 2019). Cuando estas proteínas muestran alteraciones, la disfunción mitocondrial se produce a varios niveles (mayor estrés oxidativo, potencial de membrana mitocondrial reducido y disminución de la producción de ATP, daño del ADN mitocondrial, mitocondrias alargadas, fragmentación mitocondrial, mitofagia) (Sarasija et al., 2018; Singh et al., 2019). La ubicación axonal de estos ARNm en axones envejecidos, y su síntesis local, podría servir como un mecanismo de reemplazo para sus pares dañados, impactando contra la disfunción mitocondrial. Por otro lado, el cambio en su abundancia también podría estar impactando en la generación de la disfunción mitocondrial.

Los cambios morfológicos y funcionales de los nervios periféricos relacionados con la edad incluyen: disminución en el número de fibras mielinizadas, disminución en el calibre de la fibra, disminución en la velocidad de conducción, así como la degeneración axonal (Ceballos et al., 1999; Verdú et al., 2000; Walsh et al., 2015). Además, se ha descrito que la regeneración nerviosa falla en los nervios periféricos envejecidos (Kerezoudi & Thomas, 1999; Verdú et al., 2000; Painter et al., 2014; Scheib & Höke, 2016; Büttner et al., 2018). Datos recientes indican que esta falla se debe principalmente al estado de desdiferenciación de la célula de Schwann y no a una disminución de las respuestas de crecimiento neuronal (Painter et al., 2014; Scheib & Höke, 2016). Para identificar los cambios transcriptómicos que ocurren en el micro-ambiente de los axones motores a lo largo de la maduración y el envejecimiento del nervio, analizamos el transcriptoma de las muestras de raíces ventrales 2MO, 10MO y 24MO. En el proceso de maduración nerviosa (10MO vs. 2MO), se observa sobre-expresión de genes relacionados con el transporte de iones, tanto de potasio como de calcio (**Fig. 5A**). La maduración de los nervios

Capítulo II: Cambios en el repertorio de ARNs axonales asociados a la maduración y envejecimiento.

periféricos ocurre hasta los 6 meses de edad en roedores, donde se observa un aumento en la velocidad de conducción nerviosa (Ceballos et al., 1999; Verdú et al., 2000; Walsh et al., 2014). Aunque se sugiere que esto se debe principalmente al aumento del grosor de las vainas de mielina de las fibras mielinizadas (Waxman, 1980; Ikeda & Oka, 2012), es posible que la expresión diferencial de algunos canales iónicos pueda desempeñar un papel en el aumento de la velocidad de conducción de fibras no mielinizadas, como se observó para el circuito de escape de fibra gigante de Drosophila (Kadas et al., 2019). En los nervios envejecidos, se observó un aumento en la expresión de genes asociados con respuestas inmunes e inflamatorias (Fig. 5B). Varios estudios han reportado un aumento en la infiltración de las células del sistema inmune en los nervios envejecidos (Ceballos et al., 1999; Verdier et al., 2012; Büttner et al., 2018), así como un aumento en la expresión de citoquinas (Büttner et al., 2018). A su vez, los términos GO relacionados con la homeostasis de los lípidos se vieron enriquecidos en los DEG, lo que va en línea con la disminución de la expresión génica relacionada con el metabolismo de los lípidos en los nervios periféricos de ratones (Verdier et al., 2012). Al analizar las variaciones en los niveles de expresión de los genes expresados diferencialmente durante el período estudiado, se observan seis patrones de expresión, que presentan algunos grupos de expresión específica de cada etapa (Fig. 5C-D).

En conjunto, este estudio mostró por primera vez los cambios relacionados con la edad en el repertorio de ARNs localizados en los axones motores periféricos. Además, también se demostró que la expresión génica en las raíces ventrales medulares cambia a lo largo de la maduración y el envejecimiento, y estas diferencias se producen principalmente en genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria, la proliferación celular y los canales iónicos. Por lo tanto, estos resultados proporcionan nuevos conocimientos que sientan las bases para futuros estudios que busquen corregir las deficiencias que ocurren en el envejecimiento normal de los nervios periféricos, así como en las enfermedades neurodegenerativas.

CAPÍTULO III

Estudios transcriptómicos y proteómicos en axones de neuronas sensoriales y motoras *in vivo*.

Introducción.

Como se mencionó anteriormente, existen múltiples evidencias sobre las funciones neuronales que pueden estar reguladas por la síntesis proteica local en los axones, incluido el crecimiento y quía del axón, la sinaptogénesis, el mantenimiento y supervivencia del mismo, así como también su respuesta frente a lesiones (revisado en Glock et al., 2017; Cioni et al., 2018; Farias et al., 2019). En la última década han sido publicados una veintena de trabajos en los que se buscaba caracterizar los ARNs localizados en los axones, de manera de identificar las posibles proteínas a ser traducidas localmente bajo diferentes circunstancias (revisado en Farias et al., 2019, Trabajo I). Los axones caracterizados en estos trabajos derivan de diferentes tipos neuronales en cultivo, e incluso diferentes organismos. Dada la gran cantidad de datos disponibles, resulta interesante comparar si existen diferencias en el repertorio de ARNs localizados en axones provenientes de diferentes tipos de neuronas. Kar y colaboradores analizaron comparativamente los set de datos de axones sensoriales (Minis et al., 2014) y motores (Briese et al., 2015). Al comparar los ARNs enriquecidos en cada axón respecto a su soma se observó una baja coincidencia (27%) mientras que, al comparar los ARNs más abundantes, la coincidencia aumenta al 60% (Kar et al., 2018). Cabe destacar que estos trabajos fueron realizados en neuronas en crecimiento regenerativo in vitro, con diferentes métodos de cultivo (explantos de médula espinal (Minis et al., 2014) o cámaras compartimentalizadas (Briese et al., 2015)), y utilizando diferentes abordajes de preparación de librerías para la secuenciación masiva de los ARNs. Estas diferencias en los protocolos pueden aportar cierto nivel de ruido en los datos analizados asociado a la metodología, los cuales difícilmente puedan ser separados de la variabilidad biológica de interés.

El método de microdisección de axones ha permitido la obtención de material axoplásmico a partir de neuronas maduras y mielinizadas *in vivo* (Koenig et al., 2000; Sotelo-Silveira et al., 2004; Kun et al., 2007; Sotelo-Silveira et al., 2008; Calliari et al., 2014; Farias et al., 2020). Para el caso de mamíferos, los mismos se obtienen a partir de raíces espinales, las cuales emergen de la médula espinal y se unen posteriormente, dando lugar a los nervios espinales (**Fig. 1**). Las raíces espinales pueden ser de dos tipos: raíces dorsales o raíces ventrales. Las raíces dorsales, también conocidas como raíces sensoriales aferentes, llevan la información sensorial desde la periferia del organismo hacia el cerebro. Las mismas contienen axones de neuronas pseudo-unipolares sensoriales, cuyo soma se encuentra localizado en el ganglio de la raíz dorsal. Por otro lado, las raíces ventrales o raíces motoras eferentes, transportan la información motora desde el

cerebro hacia los órganos o células efectoras. Las raíces ventrales contienen axones de neuronas motoras, cuyo soma se localiza en el asta ventral (o anterior) de la médula espinal.



Figura 1. Representación esquemática de la anatomía de la médula espinal. Las raíces espinales emergen de la médula, y posteriormente sus fibras nerviosas se combinan para formar los nervios periféricos. Las raíces ventrales contienen axones de neuronas motoras, cuyo soma se localiza en el asta ventral de la médula. Las raíces dorsales contienen axones de neuronas sensoriales, cuyo soma se localiza en los ganglios de la raíz dorsal. Imagen tomada y modificada de https://antranik.org/peripheral-nervous-system-spinal-nerves-and-plexuses/

En los trabajos presentados previamente (Trabajo II y Trabajo III) realizamos microdisección de axones provenientes de motoneuronas, localizadas en las raíces espinales ventrales, y caracterizamos el transcriptoma de axones motores in vivo, y sus cambios asociados a la maduración y envejecimiento. El método de microdisección permite también obtener axones de las raíces espinales dorsales, las cuales contienen a axones de neuronas sensoriales. Debido a que cada raíz espinal contiene axones provenientes de diferentes tipos neuronales, es un excelente modelo para el análisis comparativo de los componentes axoplásmicos de neuronas con diferentes funciones. Por lo tanto, con el fin de identificar las similitudes y diferencias del transcriptoma de axones in vivo derivados de diferentes neuronas, nos propusimos caracterizar el transcriptoma de axones sensoriales derivados de raíces espinales dorsales, y realizar un análisis comparativo con el transcriptoma de axones motores derivados de raíces espinales ventrales (datos analizados en el Trabajo II). Por otro lado, resulta sumamente interesante conocer qué tan diferentes son los proteomas de los axones provenientes de neuronas con funciones diferentes. Gracias a la colaboración con el Dr. Thomas Kislinger de la Universidad de Toronto, Canadá, logramos caracterizar el proteoma de axones motores y sensoriales, y analizarlos comparativamente.

Materiales y métodos

Animales.

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley adultas de 10 meses de edad del bioterio de roedores del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay). Las mismas fueron mantenidas en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con alimentos y agua provistos *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en estricta conformidad con el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA-IIBCE) de la Institución, bajo la ley 18.611 de la República Oriental del Uruguay. El protocolo específico fue aprobado por la CEUA-IIBCE (protocolo experimental N ° 005/05/2012). Los animales fueron anestesiados mediante la aplicación intraperitoneal de 100/20 mg/kg de ketamina/xilazina, y posteriormente sacrificadas mediante decapitación.

Aislamiento de axoplasmas de raíces espinales dorsales y ventrales mediante microdisección de axones *"in toto"*.

El aislamiento de axoplasmas se realizó según (Farias et al., 2020). Brevemente, se disecó la médula espinal con sus respectivas raíces (tanto dorsales como ventrales) y el tejidos fue suspendido en una solución salina modificada de gluconato libre de calcio (Koenig & Martin, 1996), conteniendo 132 mM gluconato de Sodio, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM glucosa, 3.5 mM MgSO4, y 2 mM EGTA, a un pH de 7.2, almacenada a 4°C. Se identificaron, bajo lupa, las raíces espinales dorsales (asociadas al ganglio de la raíz dorsal) y las ventrales, colocándolas en dos recipientes por separado. Cada raíz espinal, de 3 a 5 mm, se sumergió en una solución de acetato de zinc 30 mM, tricina 0,1 M, pH 4,8, durante 10 minutos para su desnaturalización. Luego, se la transfirió a una placa de cultivo de plástico de 35 mm conteniendo la solución de "pulling" (ácido aspártico 40 mM, Tris 38 mM, NaN3 1 mM y Tween 20 al 0,02%, pH 5,5), en la cual se llevó a cabo la extracción de los axones de su vaina de mielina, mediante la utilización de pinzas de microdisección. La extracción genera un "ramillete" de axones (aproximadamente 30 segmentos de axones), el cual se puede condensar en un paquete, lo que lo hace más fácil de procesar en los siguientes pasos. Cada "ramillete" de axones se condensó en un paquete compacto extrayéndolos brevemente fuera de la solución, excepto por un extremo. Este procedimiento elimina los posibles restos de mielina que queden remanentes en la superficie del axón. Posteriormente, los paquetes de axones se adhirieron a un cubreobjetos tratado con 1% (3aminopropil) trietoxisilano (Sigma-Aldrich) en etanol, con la ayuda de una herramienta casera ("pestaña"), la cual consiste en una pestaña montada en la punta de una pipeta Pasteur de vidrio. Una vez obtenidos los axoplasmas, se procedió a eliminar, utilizando un bisturí, los extremos de estos cordones, ya que contienen tejido derivado de la raíz completa. Posteriormente, se efectuaron lavados con solución de "pulling", para disminuir aún más las posibles contaminaciones. Mediante la utilización de la "pestaña" se procedió a despegar los axoplasmas del cubreobjetos. Se unieron todos los paquetes de axoplasmas extraídos, y se los guardó en 20 ul de solución de pulling (en tapa de un tubo eppendorf) a -80°C hasta el momento de la extracción de ARN.

RNA-seq de muestras axonales y de raíces espinales.

Extracción de ARN de muestras de axoplasmas. Previo a la extracción de ARN, se combinaron diferentes extractos axonales provenientes de cinco animales. El ARN del pool de axoplasmas se extrajo mediante la utilización de kit RNAqueous®-Micro Kit (Ambion). Este kit es especialmente diseñado para la extracción de ARN a partir de micro-muestras, incluyendo muestras de tejido menores a 10 mg o micro-disección de tejido mediante captura láser. Nuestras muestras se encontraban en el rango de una fracción del milímetro cúbico. En este caso se realizaron algunas modificaciones al protocolo sugerido: i) se utilizó el componente para muestras de microdisección de captura láser (LMC), lo cual mejora la extracción para muestras con poco ARN, ii) en el tratamiento con DNAsas, se modificó el tiempo de incubación con la misma de 20 a 10 minutos.

Extracción de ARN de muestras de raíces espinales. Las extracciones de ARN de las raíces espinales ventrales y dorsales se llevaron a cabo mediante la utilización de Trizol (Life Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el homogeneizado de las muestras se utilizaron homogenizadores de teflón, debidamente tratados para la extracción de ARN (pretratamiento con Diethyl pyrocarbonate (Sigma) para eliminar RNAsas). La calidad y cantidad de ARN se evaluó mediante espectrofotometría (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) y fluorimetría (kit de ensayo Qubit 2.0 y RNA HS, Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Cantidades equimolares de ARN de las muestras de raíces espinales fueron combinadas y llevada a una concentración de 500 pg. Posteriormente, se realizó una segunda ronda de extracción utilizando el kit RNAqueous®-Micro Kit, siguiendo el procedimiento detallado anteriormente. Durante esta segunda extracción se realizó el tratamiento con DNAsa (incluida en este kit).

Amplificación lineal del ARN. Todas las muestras de ARN obtenidas, ya sea de axoplasmas o raíces espinales, fueron amplificadas utilizando el kit Ovation RNA-Seq System V2 (NuGEN). Este sistema cuenta con la tecnología Ribo-SPIA®, la cual es capaz de amplificar ADNc a partir de 500 pg de ARN total. Brevemente, la amplificación es iniciada en el extremo 3' así como también al azar a lo largo de todo el transcripto, generándose moléculas híbridas de ADNc/ARNm, las cuales contienen una secuencia única (adicionada artificialmente en el procedimiento) en el extremo 5' de la cadena de ADNc. Seguidamente, se fragmenta el ARNm dentro del complejo ADNc/ARNm, creando sitios para que la ADN polimerasa sintetice la segunda cadena del ADNc. El resultado es

una doble cadena de ADNc con un único heteroduplex ADN/ARN en uno de los extremos. Por último se realiza la amplificación mediante la tecnología SPIA. Ésta utiliza cebadores quiméricos de ADN/ARN, una ADN polimerasa y una ARNasa H, la cual degrada el ARN del heteroduplex en el extremo 5'. Esto expone la secuencia de ADN para que se hibriden los cebadores SPIA. La ADN polimerasa inicia la replicación desde el extremo 3' del cebador. Los tamaños de los productos de ADN obtenidos se encuentran entre 200 pb y 1500 pb. La calidad y la cantidad del ADNc bicatenario resultante se evaluó mediante espectrofotometría (Nanodrop 1000 y electroforesis capilar (2100 Bioanalyzer 2100 (Agilent)).

Secuenciación. Las bibliotecas se construyeron y secuenciaron en BGI Genomics (Hong Kong), en la plataforma Illumina HiSeq4000.

Análisis de datos de RNA-Seq.

Las lecturas crudas (sin procesar) se alinearon al genoma de referencia de rata (Rnor_6.0, GCA_000001895.4) usando HISAT v2.0.5 (Kim et al., 2015). Las lecturas alineadas fueron ensambladas por StringTie v1.3.3b (Pertea et al., 2015, 2016), utilizando una aproximación basado en referencias ("-e"). Los valores de abundancia fueron expresados mediante TPM (transcriptos por millón), y se filtraron los genes de baja expresión (<1 TPM). Se utilizó el script de python "prepDE.py" para obtener los valores de conteo.

Para el análisis de saturación de los muestras se utilizó el paquete de R *NOISeq* (Tarazona et al., 2015).

Los análisis de anotación funcional se realizaron utilizando el paquete de R *topGO* v2.38.1 (Alexa & Rahnenfuhrer, 2019), utilizando los términos de Procesos Biológicos (BP, "Biological Process") de la base de datos de anotación genómica para rata, *org.Rn.eg.db* v3.8.2 (Carlson, 2019a). Se consideró significativos los *p-valores* < 0.05 (algoritmo "Parent-Child" asociado con test de Fisher).

Para los análisis de expresión diferencial se utilizó el paquete de R *edgeR* v3.24.3 (Robinson et al., 2010; McCarthy et al., 2012). Se estableció manualmente el coeficiente de variación biológica (BCV) en 0.4. Los genes con un TPM> 1, |Cambio de expresión| > 2 y un *p-valor* < 0.05 fueron considerados expresados diferencialmente. Se utilizó la función *plotGODESeq* (https://github.com/ gambardella/plotGODESeq) de R para mostrar gráficamente los resultados de anotación funcional de los genes expresados diferencialmente.

Aislamiento de proteínas de muestras axonales y de raíces espinales.

Procesamiento de muestras axonales. Las muestras de axoplasma fueron centrifugadas a máxima velocidad y se descartó la solución en la que se encontraban (solución de "pulling"). Cada muestra fue resuspendida en 200 ul de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) 50% (v/v) en PBS 1X (pH 7,4, con inhibidor de proteasas) e incubada 2 horas a 60°C. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su liofilización.

Procesamiento de muestras de raíces espinales. Cada muestra de raíz espinal (trozo de tejido de 3-5 mm) fue colocado en 100 ul de PBS 1X y sonicado en 3 ciclos de 8 segundos (4 seg. sonicado y 4 seg. descanso). Se agregaron 100 ul de TFE y se incubaron durante 2 horas a 60°C. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su liofilización.

Extracción de péptidos. Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en 100 ul de TFE 50% (v/v) en PBS y se incubaron durante una hora a 60°C. Posteriormente, se redujeron los enlaces disulfuro mediante la incubación en 5 mM DTT durante 30 min a 60°C. Luego, se realizó la alquilación de los puentes disulfuro reducidos utilizando 25 mM iodoacetamida, incubando las muestras en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron utilizando 100 mM bicarbonato de amonio pH 8.0, 2 mM CaCl 2. Las proteínas fueron digeridas con 5 mg de tripsina a 37°C durante la noche. Posteriormente, se agregó 1% de ácido fórmico, se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se llevó a 25 ul. Las sales y buffers fueron eliminados mediante la utilizados en agua de grado de espectrometría de masas con ácido fórmico al 0,1%.

Espectrometría de masas.

La concentración de péptidos fue cuantificada usando NanoDrop Lite (a 280 nm) y una alícuota constante de 2 mg de péptidos fue inyectada en la columna para cromatografía y análisis proteómico. Los datos de LC-MS/MS se obtuvieron utilizando un sistema de cromatografía líquida Easy nLC 1000 (Thermo) de nano-flujo, con una columna EasySpray (Thermo) de 50 cm acoplada a un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo). Los datos se adquirieron usando un gradiente cromatográfico de cuatro horas con el espectrómetro de masas funcionando en modo dependiente de datos. Los datos de MS1 se adquirieron a una resolución de 120.000, mientras que los datos de MS2 se adquirieron con el método de los 20 principales (Michalski et al., 2011; Sinha et al., 2014). Los datos adquiridos fueron analizados utilizando el software MaxQuant (v1.6.1.0) (Cox & Mann, 2008) y la base de datos de proteínas UniProt (proteoma completo de *Rattus norvegicus*; v2016-12-09, número de secuencias 9.560). Las búsquedas se realizaron con un máximo de dos divisiones tripticas perdidas, cabamidometilación de cisteína como modificación fija y oxidación de metionina como modificación variable. Las proteínas se identificaron con un

mínimo de dos péptidos únicos, la tasa máxima de falsos positivos (FDR) se seteó en 1% para coincidencias espectrales de péptidos y se utilizó la estrategia de señuelo objetivo (Kislinger et al., 2006) para la identificación de proteínas. El archivo ProteinGroup.txt se utilizó para todos los análisis posteriores. La cuantificación relativa se realizó utilizando la intensidad de señal MS1 para la cuantificación sin etiqueta, siguiendo una estrategia de análisis MaxQuant MaxLFQ estándar (Cox et al., 2014).

Análisis de datos de proteómica.

El archivo del grupo de proteínas resultante se procesó con una herramienta desarrollada internamente (descrita en Wojtowicz et al., 2016). Brevemente, la distribución de los valores iBAQ se ajustó a la distribución de los valores de LFQ en función de la mediana de cada muestra, lo que permitió obtener valores iBAQ ajustados por imputación para aquellas proteínas que no tenían valores de LFQ en las muestras. Todos los demás valores faltantes fueron reemplazados por números aleatorios extraídos de una distribución normal simulada (método descrito en Tyanova et al. 2016).

Los análisis de expresión diferencial de los datos de proteómica fueron realizados con el paquete de R *DEP* (Zhang et al., 2018). Los análisis de correlación fueron realizados utilizando la función *cor* del paquete de R *stats* v3.6.2.

Datos suplementarois.

Las tablas suplementarias se encuentran disponibles en el siguiente link: <u>https://drive.google.com/</u> <u>drive/folders/1dOA2VmExOaVxGflebp2D7LdQwRUjRccV?usp=sharing</u>

Resultados y discusión.

Los axones motores y sensoriales poseen diferencias en el repertorio de ARNs localizados.

Con el objetivo de conocer las similitudes y diferencias que presenta el repertorio de ARNs localizados en axones proveniente de neuronas con diferentes funciones, realizamos un análisis comparativo de los transcriptomas de axones motores (ARV) y sensoriales (ARD) obtenidos a partir de raíces espinales ventrales (RV) y dorsales (RD), respectivamente. Cabe aclarar que las muestras provenientes de raíces ventrales son las previamente analizadas en el Trabajo II, y que todas las muestras analizadas en esta sección fueron obtenidas a partir de los mismos animales.

En primer lugar, se realizaron los controles de calidad de la muestra ARD, mediante la comparación con la muestra RD (**Fig. 2**). En la muestra ARD fueron detectados 1127 ARNs, mientras que en RD fueron 10333. La gran mayoría de los ARNs detectados en ARD también fueron detectados en RD (**Fig. 2A, Tabla S1**), hecho esperado ya que las muestras de axones provienen de las raíces espinales. Por otro lado, se observó que ambas muestras llegan a la saturación (**Fig. 2B**), por lo tanto, la diferencia entre el número de ARNs detectados en las muestras no se debe a una diferencia en profundidad de secuenciación. El análisis de la abundancia que presentan los ARNs detectados en ambas muestras en función del ranking en la muestra de axones sensoriales (**Fig. 2C**) muestra que los ARNs detectados en ARD no presentan la misma relación relativa entre ellos que en RD. Esto indica que la muestra axonal no es una mera dilución de los ARNs más abundantes presentes en raíces dorsales. Estos resultados



Figura 2. Análisis transcriptómico de axones sensoriales in vivo. A. Se observa el número de ARNs detectados en las muestras de axones sensoriales (ARD) y raíces espinales dorsales (RD). La gran mavoría de los ARNs detectados en los axones también lo son en las dorsales. B. En ambas raíces muestras se llega a la saturación, tanto a nivel global como en ARNs codificantes de proteínas. C. Abundancia relativa (log2 TPM) de los ARNs detectados en ARD (círculos azules) y RD (círculos anaranjados), en función del ranking que presentan en ARD. También se muestran los ARNs detectados en ARD pero no en RD (líneas negras). indican que la muestra se comporta de manera similar a las analizadas previamente (Trabajo II y Trabajo III).

Una vez analizada la calidad de las muestras, realizamos un análisis comparativo de las muestras axonales (Fig. 3). El análisis de la identidad de los ARNs detectados en los axones, mediante diagrama de Venn, mostró que más del 50% (606/1127) de los ARNs detectados en ARD también lo fueron en ARV (Fig. 3A). El coeficiente de Pearson obtenido al correlacionar los niveles de abundancia de los ARNs detectados fue de 0.66 (Fig. 3B). Al analizar los términos ontológicos enriquecidos en las listas completas de ARNs detectados en cada uno de los axones se observó que las categorías más significativamente enriquecidas son similares. Entre ellas se encuentran términos ontológicos relacionados a la traducción, cadena de transporte de electrones y síntesis de ATP, entre otros (Fig. 3C, Tabla S2). Por otro lado, realizamos el análisis del enriquecimiento ontológico en las listas de ARNs detectados en ambas muestras axonales o únicamente en una de ellas. Al analizar los términos ontológicos más significativamente enriguecidos en la lista de ARNs presentes en ambos axones, observamos que son muy similares a los encontrados en las listas completas (Fig. 3D, Tabla S2). Esto indica que los ARNs presentes en ambos axones (606 ARNs) codifican proteínas con funciones mitocondriales, citoesqueléticas o relacionadas a la traducción. Estas funciones se encuentran enriquecidas en los transcriptomas de todos los axones analizados hasta el momento, tanto in vitro (revisado en el Trabajo I, Farias et al., 2019) como in vivo (ver Trabajo II y Trabajo III). Si bien es conocida la importancia que poseen estas tres funciones en los axones (Kevenaar & Hoogenraad, 2015; Smith & Gallo, 2018; Sahoo et al., 2018), estos hallazgos indican que la síntesis local de proteínas relacionadas con las mismas es esencial en axones de diferentes estadios, tipos neuronales y condiciones. Por otro lado, en la lista de ARNs detectados únicamente en ARD los términos más significativamente enriquecidos son únicos de esta lista, y se relacionan a la localización de proteínas en vacuolas y el reciclaje de vesículas sinápticas (Fig. **3D**). Mientras tanto, los términos enriguecidos en los ARNs presentes únicamente en ARV se relacionan al metabolismo de aminoácidos sulfurados y la migración celular (Fig. 3D). Estas diferencias implican que existe una localización de ARNs diferencial en axones de neuronas con diferentes funciones, las cuales codifican proteínas asociadas a distintos procesos. Comprender la fisiología de estas diferencias requiere un análisis exhaustivo, no realizado hasta el momento.

Capítulo III: Estudios transcriptómicos y proteómicos en axones de neuronas sensoriales y motoras in vivo.



Figura 3. Análisis comparativo de los transcriptomas de axones motores y sensoriales *in vivo*. A. El diagrama de Venn muestra que más del 50% de los ARNs detectados en axones sensoriales (ARD) también lo fueron en axones motores (ARV). B. Correlación de la abundancia (log2 TPM) de los ARNs detectados en ARD y ARV. C-D. Análisis ontológico de términos enriquecidos en los transcriptomas de ARD y ARV. En color se representa el log2 del enriquecimiento. Términos enriquecidos en las listas completas de ARNs detectados en ARD y ARV (C). Términos enriquecidos en los ARNs presentes tanto en ARD como en ARV (Common), en los presentes únicamente en ARD (Unique ARD) o en ARV (Unique ARV) (D).

El proteoma de axones motores y sensoriales son muy similares entre sí.

Durante el transcurso de esta tesis, nuestro grupo de trabajo consolidó una colaboración con el Dr. Thomas Kislinger, científico Senior en el Centro de Cáncer Princess Margaret y Profesor de la Universidad de Toronto, cuyo trabajo se centra en la aplicación de la proteómica y herramientas computacionales para la comprensión de la biología del cáncer y el descubrimiento de biomarcadores. En primer lugar, nos preguntamos si la cantidad de material axonal obtenido a partir de la microdisección de axones de un individuo era suficiente para el análisis proteómico, con el fin de poder realizar experimentos con réplicas biológicas. Si bien se pudo realizar la identificación y cuantificación de abundancia de muchas proteínas, los resultados obtenidos están por debajo de la sensibilidad del método utilizado (se identificaron alrededor de 1000 proteínas en las muestras de raíces espinales y alrededor de 500 en las muestras axonales, siendo el promedio para lisados celulares de 6000 proteínas). Si bien no conseguimos caracterizar completamente el proteoma, creemos que la identificación de las proteínas más abundantes presentes en axones motores y sensoriales *in vivo*, y su análisis comparativo resulta sumamente interesante. Para tal fin, estudiamos el proteoma de axones motores y sensoriales, así como las raíces espinales de origen, en triplicados biológicos. Como se puede observar en la **Fig. 4A (Tabla S3)**, las réplicas

biológicas de cada muestra tienen una correlación muy cercana a la unidad. A su vez, al realizar un análisis de componentes principales (**Fig. 4B**) se observa que las réplicas de cada muestra axonal se agrupa preferentemente entre sí y separadas de las réplicas del otro axón, mientras que las de las raíces espinales (tanto RD como RV) se agrupan todas juntas. El componente 1, el cual explica casi el 80% de la variabilidad de los datos, separa a las muestras de raíces espinales de las de axones, mientras que el componente 2, el cual explica el 16% de la variabilidad, separa a las muestras de ARD de las de ARV.



Figura 4. Controles de calidad de las muestras de proteómica. A. Matriz de correlación entre las réplicas biológicas de axones sensoriales (ARD), axones motores (ARV), raíces espinales dorsales (RD) y ventrales (RV). B. Análisis componentes principales. Se de muestra el agrupamiento de las muestras según los componentes 1 (PC1) y componente 2 (PC2). Se muestra la variabilidad explicada por cada componentes.

Posteriormente, nos centramos en el análisis comparativo entre las muestras de ARD y ARV (**Fig. 5**). A diferencia de lo que ocurre a nivel de ARNs, un gran número de proteínas (72%, 453/630) fueron detectados en ambos tipos de axones (**Fig. 5A, Tabla S3**). Al correlacionar los niveles de abundancia de las proteínas detectadas se obtuvo un coeficiente de Pearson de 0.86 (**Fig. 5B**), siendo significativamente superior al 0.66 obtenido para los ARNs (**Fig. 3B**). El análisis de expresión diferencial de proteínas mostró que muy pocas, 11 proteínas, presentan abundancias significativamente diferentes entre ambas muestras (**Fig. 5C**). Cabe destacar que, como se mencionó anteriormente, en los análisis de proteómica no logramos identificar todas las proteínas de la muestra sino que, probablemente, solo las más abundantes. Teniendo esto en cuenta, podríamos decir que las proteínas más abundantes localizadas en axones motores y sensoriales poseen una abundancia similar.

Capítulo III: Estudios transcriptómicos y proteómicos en axones de neuronas sensoriales y motoras in vivo.



Figura 5. Análisis comparativo de los proteomas de axones motores y sensoriales *in vivo*. **A.** El diagrama de Venn muestra que la mayoría de las proteínas identificadas fueron detectadas tanto en axones sensoriales (ARD) como axones motores (ARV). **B.** Correlación de la abundancia (log2 intensidad) de las proteínas detectados en ARD y ARV. **C.** En el volcano-plot se muestran las proteínas que presentan una diferencia significativa de abundancia en ARD y ARV.

La localización de ARNs, y su síntesis local, determina la localización de proteínas axonales.

Tres son los mecanismos celulares que contribuyen a la localización de proteínas en los axones: el transporte hacia el dominio axonal de proteínas sintetizadas en el soma neuronal, la transferencia desde las glías a los axones y la combinación de la localización de ARNm y la traducción local. Con el objetivo de identificar proteínas axonales que posiblemente sean traducidas localmente, comparamos los datos de transcriptómica y proteómica axonales. Como se puede observar en las Fig. 6A-B (Tabla S4), para un quinto de las proteínas identificada en los axones fue también identificado en este dominio el ARNm que la codifica, siendo casi el 50% (75/158) comunes entre ARD y ARV. Curiosamente, las proteínas para las cuales el ARNm que las codifica está localizado en los axones son, en promedio, significativamente más abundantes que las que no poseen su ARNm localizado (Fig. 6C-D). Un estudio previo combinó el análisis "ómico" de neuritas en cultivo a varios niveles (transcriptómica, ribonómica, proteómica) (Zappulo et al., 2017). El mismo describe que el 50% de las proteínas enriquecidas en las neuritas (respecto al soma) posee su ARNm enriquecido en dicho dominio (respecto a los niveles somáticos). A su vez, destaca que los niveles de correlación entre la abundancia de ARNm y proteínas es estadísticamente significativo. En nuestro caso, debemos recordar que los datos del proteoma axonal no son completos, sino que estamos analizando solo las proteínas más abundantes. Probablemente, al obtener los datos del proteoma completo la concordancia entre los ARNm localizados y proteínas axonales sea mayor que la descrita en este momento. Por otro lado, el trabajo mencionado anteriormente también reporta que las proteínas para las cuales se encuentra el ARNm localizado en el axón son, en promedio, más abundantes (Zappulo et al., 2017). Estos resultados podrían sugerir que la acumulación de grandes cantidades de proteínas en el dominio axonal requiere la localización del ARNm y su síntesis local. Al analizar qué funciones cumplen las proteínas que poseen su ARNm localizado tanto en axones motores como sensoriales, encontramos que están enriquecidos en términos ontológicos relacionados a citoesqueleto y mitocondria. Algunos ejemplos de las proteínas citoesqueléticas son: las tres subunidades de los neurofilamentos (Nefl, Nefm y Nefh), la β-actina, tubulinas (Tuba1a, Tuba1b, Tubb3) y algunos motores moleculares (Kif5a, Kif5b, Kif5c); mientras que las asociadas a la mitocondria son las siguientes: Cox5a, Cox5b, Sod1, Sod2, Aco2, ATP1a1, Atp6v1e1, entre otras.

En su conjunto, estos resultados sugieren que los axones poseen la capacidad de sintetizar localmente un quinto de sus proteínas más abundantes, ya que el ARNm codificante de las mismas se encuentra localizado en el dominio axonal. A su vez, una gran proporción de estas proteínas tienen funciones citoesqueléticas y mitocondriales.



Figura 6. Comparación de datos transcriptómicos y proteómicos de axones sensoriales y motores. A-B. Los diagramas de Venn muestran que cerca de un quinto de las proteínas localizadas en axones sensoriales (ARD, A) o motores (ARV, B) tienen también localizado su ARNm. C-D. Comparación de la abundancia promedio de proteínas detectadas en ARD (C) o ARV (D) que poseen o no localizado su ARNm. *: *p-valor* < 1.0E-04.

El transcriptoma y proteoma de las raíces espinales dorsales y ventrales son similares entre sí.

Con el propósito de analizar si existen diferencias tanto a nivel transcriptómicos como proteómicos entre las raíces espinales dorsales y ventrales, analizamos comparativamente los transcriptomas y proteomas de estos dos tejidos (**Fig. 7**). Los resultados mostraron una alta correlación de los niveles de abundancia tanto de los ARNs (**Fig. 7A**, correlación de Pearson de 0.89) como también de las proteínas (**Fig. 7B**, correlación de Pearson de 0.98). Los análisis de expresión diferencial

mostraron que 2076 ARNs poseen niveles de expresión significativamente diferentes entre ambos tejidos (773 más expresados en RD y 1303 en RV). Entre los ARNs que presentan una mayor abundancia en RD se enriquecieron términos ontológicos relacionados a la percepción sensorial del dolor, entre otros. Por otro lado, entre los ARNs con una mayor abundancia en las RV se enriquecen términos ontológicos relacionados al proceso apoptótico, y regulación de la homeostasis de diferentes iones (**Fig. 7C, Tabla S5**). Al analizar los datos proteómicos, se hallaron 35 genes con expresión diferencial a nivel proteico entre ambos tejidos (18 con mayor expresión en RD y 17 con mayor expresión en RV) (**Fig. 7D**). Entre las proteínas con mayor expresión en RV se encuentra la colinacetiltransferasa (Chat), enzima responsable de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina, utilizado comúnmente como marcador de neuronas motoras. Por otro lado, se observó que la calretinina (Calb2), proteína de unión al calcio involucrada en la señalización mediado por dicho ión, presenta mayores niveles de abundancia en las RD. Este resultado está de acuerdo con reportes previos, que indican que esta proteína se expresa en neuronas sensoriales primarias (Duc et al., 1993; Ambrus et al., 1998; Levanti et al., 2008).



Figura 7. Análisis comparativo de transcriptoma y proteoma de raíces espinales dorsales y ventrales. A. Corelación de la abundancia de ARNs (log2 TPM) detectados en raíces dorsales (RD) y raíces ventrales (RV). **B.** Corelación de la abundancia de proteínas (log2 intensidad) detectados en RD y RV. **C.** Representación gráfica de las ontologías enriquecidas en la lista de genes expresados diferenicalmente al comparar los transcriptomas de RD y RV. Se grafica el *p-valor* de los términos GO enriquecidos (-log10) en función del z-score del mismo (n°genes sobreexpresados – n.º genes subexpresados / $\sqrt{(n°genes sobreexpresados + n°genes subexpresados))}$. El tamaño del círculo representa en enriquecimiento, mientras que el color representa el promedio de los cambios de expresión de los genes asociados a ese término GO. **D.** En el volcano-plot se muestran las proteínas que presentan una diferencia significativa de abundancia en RD y RV.

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

DISCUSIÓN

Las células neuronales presentan una gran polaridad, tanto estructural como funcional, y se caracterizan por el gran desbalance en el volumen citoplasmático que poseen los diferentes dominios celulares. Dada las grandes dimensiones que puede poseer el dominio axonal, principalmente en neuronas de proyección, ha sido de gran interés para la neurobiología conocer los mecanismos celulares que participan en el mantenimiento de la masa axoplásmica. Hoy en día, es aceptado que existen tres mecanismos que participan en este mantenimiento. Por un lado, el transporte hacia el axón de proteínas sintetizadas en el soma neuronal, mediante el transporte axoplásmico (Roy, 2014; Black, 2016). Por otro lado, la transferencia de proteínas (así como también ARNs y maquinaria traduccional) desde las glías a los axones (Sotelo et al., 2014; López-Leal et al., 2016). Por último, la localización de ARNs en combinación con la síntesis local de proteínas en el axón (Glock et al., 2017; Cioni et al., 2018). Estos tres mecanismos son complementarios, y se ha evidenciado que el aporte de cada uno puede variar según las condiciones axonales locales o las condiciones generales de la neurona estudiada (Cornejo et al., 2017; Glock et al., 2017; Cioni et al., 2018).

El estudio de la síntesis local axonal, desestimado por un largo período de tiempo, ha sufrido un crecimiento exponencial en las últimas décadas, lográndose recientemente avances muy importantes (revisado en Farias et al., 2019, Trabajo I). Muchos de estos estudios realizaron sus observaciones y caracterizaciones en axones *in vitro*, siendo todavía limitados los datos de lo que ocurre en axones *in vivo*. El objetivo general de esta tesis fue aportar a la comprensión de los mecanismos involucrados en el mantenimiento del proteoma axonal, puntualmente la síntesis local de proteínas, intentando por primera vez la caracterización del transcriptoma *in vivo* de axones completamente diferenciados y mielinizados. Tanto el estado actual del arte en lo que respecta al transcriptoma de axones y la síntesis local axonal, como los datos obtenidos durante la presente Tesis fueron discutidos en cada uno de los trabajos presentados anteriormente (Trabajo I, Trabajo II, Capítulo II y Capítulo III). A continuación, presentamos una discusión de los datos obtenidos de forma integradora, explorando algunas otras zonas interesantes pero no tan desarrolladas en los Trabajos presentados anteriormente.

Diferentes desafíos metodológicos encontrados a la hora del análisis del transcriptoma de axones *in vivo*.

El objetivo de caracterizar los ARNs localizados en los axones in vivo nos enfrentó a diferentes desafíos, tanto a nivel de los procedimientos moleculares realizados, así como a nivel del análisis de datos. En primer lugar nos enfrentamos a que, a partir de las preparaciones axonales obtenidas, se recuperaban muy bajas cantidades de ARN total (en el rango de picogramos) lo que nos imposibilitó realizar la caracterización de muestras individuales. Para la realización de las bibliotecas de secuenciación fue necesario recolectar 5 muestras axonales y amplificarlas linealmente. Cabe señalar que en los estudios previos de caracterización de transcriptomas de axones in vitro también fue necesario recolectar y agrupar varias muestras (Minis et al. 2014; Zappulo et al. 2017) o amplificar los ARNs extraídos de un campo axonal en cultivo (Briese et al., 2015) para la posterior construcción de bibliotecas de secuenciación. Sin embargo, es importante destacar que logramos realizar confirmaciones y validaciones de los datos en réplicas biológicas mediante la utilización de protocolos de RT-qPCR de alta sensibilidad. Los resultados obtenidos indican, por un lado, que el método de microdisección de axones es una técnica reproducible (Fig. 2B y Fig. 6B, Trabajo II), y por otro, que la recolección de muestras y amplificación lineal no provoca grandes cambios en la relación de abundancias de los ARNs identificados (Fig. 6A, Trabajo II).

Una vez obtenidas las listas de ARNs detectados en las muestras axonales y de raíces espinales, nuestro objetivo fue analizar el enriquecimiento de ARNs en axones respecto a las raíces espinales. Los trabajos que analizan axones *in vitro* reportan un número similar de ARNs en cada dominio celular analizado (axonal y somato-dendrítico), por lo que utilizan procedimientos clásicos de análisis de expresión diferencial para identificar aquellos ARNs enriquecidos en los axones. En nuestro caso, observamos una gran diferencia en el número de ARNs detectados en las muestras axonales respecto a las de raíces espinales, rondando los 2000 ARNs detectados para las muestras de axones y más de 10000 ARNs detectados en las muestras de raíces espinales. La realización del mismo protocolo de extracción de ARN, amplificación lineal y preparación de bibliotecas de secuenciación, partiendo de cantidades similares de ARNs, nos permitió asegurar que estas diferencias no se debían a un artefacto metodológico producto de la baja cantidad de ARN que poseen las muestras axonales. El siguiente paso fue demostrar que la presencia de los ARNs detectados en las muestras de raíces espinales. La manera más clara y simple que encontramos para mostrar estos resultados fue graficar la abundancia de los ARNs detectados en los axones en

función de la posición que posee el ARN en el ranking de abundancia en la muestra axonal. De esta manera, comparando los niveles de abundancia en la muestra axonal respecto a los de raíces espinales fue posible evidenciar que no necesariamente los ARNs más abundantes en las muestras axonales eran los más abundantes de las raíces espinales (Fig. 3C, Trabajo II; Fig. 1E-F, Capítulo II; Fig. 2C, Capítulo III). El análisis de los 50 ARNs más expresados en las muestras de axones motores maduros y raíces espinales ventrales evidenció de otra manera que los transcriptos más abundantes de ambas muestras no son los mismos (Fig. 3E, Trabajo II).

Por último, la gran diferencia que encontramos en el repertorio de los ARNs localizados en los axones provenientes de neuronas motoras de diferentes estadios madurativos (Capítulo II), o de neuronas con diferentes funciones (Capítulo III) no nos permitió realizar los análisis clásicos de expresión diferencial. Esto se debe a que los algoritmos de normalización utilizados para este tipo de análisis tienen como supuesto que la gran mayoría de los ARNs no cambian su abundancia relativa en las condiciones a comparar. En nuestro caso, al detectarse una baja proporción de ARNs en común en las muestras a ser comparadas, nos inhabilitaba a realizar estos análisis con los algoritmos clásicos. Por esta razón, decidimos analizar las categorías ontológicas enriquecidas en las listas completas, así como en los genes en común o únicos de cada condición analizada, de manera de caracterizar las similitudes y diferencias de las muestras. Para los casos de los ARNs únicos de cada muestra, chequeamos su abundancia en la muestra detectada, de manera de evitar conclusiones erradas debido a que los mismos presentaran abundancias muy bajas, cercanas al límite fijado para considerar su detección (en nuestro caso TPM ≥ 1). En las tablas suplementarias que acompañan cada análisis de datos (Tabla S1, Trabajo II; Tabla S1 Capítulo II; Tabla S1, Capítulo III) es posible observar que muchos de los ARNs presentes únicamente en una de las muestras analizadas presentas abundancias medias y altas.

En suma, la caracterización del transcriptoma de axones *in vivo* nos enfrentó a una serie desafíos, tanto a nivel de procedimientos experimentales como también a la hora de análisis de datos. Los mismos nos impulsaron a buscar estrategias no estándares o clásicas para lograr realizar los análisis propuestos, considerando que logramos anteponernos a muchos de ellos. Nos queda por delante continuar con la búsqueda de nuevas estrategias que nos permitan lograr una comprensión más profunda de la implicancia funcional que poseen los cambios en el repertorio de ARNs que poseen los axones *in vivo* bajo diferentes circunstancias.

La microdisección de axones como método para la obtención del material axoplásmico proveniente de axones *in vivo*.

La particular estructura que presentan las fibras nerviosas, con el axón envuelto en la vaina de mielina, dificulta el estudio de los componentes de axones mediante técnicas bioquímicas y de biología molecular. En este sentido, los métodos de cultivo *in vitro* de neuronas en cámaras compartimentalizadas permitieron el avance de esta área de la neurobiología, al lograr separar a las neuronas de otros tipos celulares, y al dominio axonal del somato-dendrítico (Taylor et al., 2005; Campenot et al., 2009). Hoy en día existen dos metodologías para la obtención de material axoplásmico de axones *in vivo* de mamíferos: la extrusión y la microdisección del axón. Nuestro grupo de trabajo ha utilizado ampliamente el método de microdisección de axones para la caracterización *in situ* de los componentes moleculares que se localizan en las placas periaxoplásmicas (PARPs) (Koenig et al., 2000; Sotelo-Silveira et al., 2004; Kun et al., 2007; Sotelo-Silveira et al., 2008; Calliari et al., 2014). Asimismo, en trabajos previos realizamos las primeras aproximaciones a la utilización de esta metodología para el análisis molecular a gran escala de los ARNs presentes en los axones (Sotelo-Silveira, 2003; Farias, 2014).

Para lograr nuestros objetivos, fue necesario en primer lugar, modificar la técnica de microdisección de axones para minimizar los posibles contaminantes gliales o del tejido de origen que pudiesen quedar en la muestra de axoplasmas. Posteriormente, realizamos controles de calidad de las muestras de axoplasmas, tanto a nivel microscópico como molecular. A nivel de microscopia, tanto de fluorescencia como electrónica de barrido, se observó que el material axoplásmico obtenido presenta nulos o mínimos contaminantes de mielina (Fig. 1C-D, Trabajo II). A nivel molecular, se observó que las muestras de axoplasma presentan una disminución considerable de los ARNs codificantes para proteínas de mielina, mientras que aumentan aquellos codificantes para proteínas neuro-específicas (Fig. 2B, Trabajo II; Fig. 1G-H, Capítulo II).

Los resultados obtenidos a partir de réplicas biológicas de muestras de axoplasmas, mediante RTqPCR o proteómica, mostraron una muy buena reproducibilidad del método. Esto lo convierte en una valiosa herramienta para obtener material axoplásmico para su posterior estudio a nivel "ómico". Debido a que este método logra aislar axoplasma de raíces espinales, podría ser particularmente útil para el estudio de la participación axonal en patología neurodegenerativas del SNP, como la esclerosis lateral amiotrófica y las atrofias musculares espinales, así como también en la degeneración axonal que ocurre durante el desarrollo de la neuropatía diabética.

El número de ARNs localizados en axones *in vivo* es menor al de axones *in vitro*.

La visión de la potencialidad que poseen los axones a la hora de sintetizar proteínas localmente ha variado considerablemente a medida que se realizaron avances en las metodologías de identificación de ARNs. Los trabajos iniciales, los cuales utilizaron hibridación in situ o bibliotecas de ADNc a bajas escalas, reportaban pocas decenas de ARNm en los axones (revisado en Deglincerti & Jaffrey, 2012). Posteriormente, este número pasó a ser unos cientos mediante la secuenciación de bibliotecas de ADNc (Gioio et al., 2001; Gioio et al., 2004), o unos miles mediante la utilización de microarreglos (Zivraj et al., 2010; Gumy et al, 2011). Actualmente, la utilización de secuenciación masiva de ARNs ha permitido identificar más de diez mil ARNs distintos localizados en axones de neuronas en cultivo (revisado en Farias et al., 2019, Trabajo I). El avance en el conocimiento de los ARNs que podrían sintetizarse localmente en los axones amplía la comprensión de los potenciales roles que puede tener este mecanismo a la hora del mantenimiento de la proteostasis axonal o en respuesta a diferentes estímulos. Por ejemplo, se ha propuesto que el transporte de ARNm a dominios axonales y su síntesis local es un mecanismo favorable energéticamente para la neurona, ya que una sola molécula de ARNm permite la producción de varias copias de la proteína, y se puede dar de manera local en el momento que sea necesario (Perry & Fainzilber, 2014). Así mismo, se ha planteado que la síntesis local de proteínas es un mecanismo que permite la respuesta rápida a diferentes estímulos externos, como la respuesta a señales quimiotrópicas o frente a una lesión (revisado en Glock et al., 2017; Cioni et al., 2018; Farias et al., 2019). También se ha reportado que este mecanismo permite un recambio de proteínas dañadas por pares nuevos, ampliando el tiempo de vida media de complejos proteicos u organelos (Shigeoka et al., 2019). Por último, también se ha propuesto que las nuevas proteínas proporcionan oportunidades para un procesamiento post-traduccional único, el cual es crucial para funciones específicas en el compartimiento axonal maduro (revisado en Jung et al., 2012; Perry & Fainzilber, 2014).

Si bien los trabajos realizados a escalas genómicas *in vitro* observan y analizan el conjunto de ARNs que presentan un enriquecimiento respecto al dominio somato-dendrítico, resulta llamativo que el número total de ARNs identificado en el axón sea muy similar al del dominio somato-dendrítico. Recientemente, Nijssen y colaboradores (2018) reportaron alrededor de 4500 ARNs localizados en axones *in vitro*, número significativamente menor al reportado por trabajos previos de las mismas características. Los autores plantean que en las muestras axonales analizadas en los trabajos previos existe una contaminación de las muestras axonales con material proveniente

del dominio somato-dendrítico, aumentando de esta manera el número de ARNs detectados en los axones (Nijssen et al., 2018).

Hasta el momento, los trabajos que analizan el transcriptoma de axones lo han realizado en modelos de neuronas en cultivo, siendo los resultados obtenidos durante esta Tesis los primeros datos a gran escala del repertorio de ARNs localizados en axones maduros y mielinizados de mamíferos. Nuestros resultados mostraron que el número de ARNs localizado en axones in vivo puede variar dependiendo del estado madurativo de la neurona analizada, identificándose hasta 2500 ARNs diferentes. Una vez obtenido los datos de axones in vivo, resultaba sumamente interesante compararlo con los datos reportados para axones in vitro. Varios trabajos han demostrado las diferencias que existen entre transcriptomas del mismo tipo celular in vivo e in vitro. Estudios enfocados en analizar estos contrastes en hepatocitos y células provenientes de tumores, indican que es difícil establecer el grado de correlación que existe entre los niveles de expresión génica en estas dos condiciones (Boess et al. 2003; Dabrowski et al. 2003; Liu et al. 2008). Asimismo, un estudio centrado en el transcriptoma de neuronas hipocampales reportó que las neuronas cultivadas expresan un 30% más de genes que las mismas neuronas en su microambiente natural (Lovatt et al. 2014). Al comparar el número de ARNs localizados en axones in vivo e in vitro, se observa que el repertorio de ARNs localizados en axones in vivo es menor, incluso al compararlo con el trabajo de Nijssen y colaboradores (2018). Si bien esta diferencia podría deberse a no haber alcanzado la sensibilidad suficiente para detectar todos los ARNs presentes en la muestra, los análisis de saturación mostraron que la profundidad de secuenciación utilizada fue la correcta, ya que se alcanzó la saturación a nivel global como en la categoría de genes codificantes de proteínas, tanto para las muestras de axones como de raíces espinales (Fig. 3B, Trabajo II; Fig. 1C-D, Capítulo II; Fig. 2B, Capítulo III). Estos resultados van en línea con lo antes expuesto, ya que el mayor número de ARNs identificado en axones in vitro podría deberse a una respuesta local del axón a las condiciones de crecimiento en cultivo, ya que el mismos se encuentra desprovisto de su micro-ambiente natural y en condiciones de crecimiento regenerativo.

ARNs codificantes para proteínas con funciones relacionadas a la traducción, citoesqueleto y mitocondrias localizados en axones *in vivo*.

El análisis funcional de los distintos transcriptomas de axones *in vivo* muestra que todos ellos poseen un enriquecimiento significativo en ARNs codificantes para proteínas con funciones

traduccionales, mitocondriales o relacionadas al citoesqueleto. A su vez, tanto al comparar entre sí los transcriptomas de axones *in vivo* obtenidos en este trabajo (resultados presentados en Capítulo II y Capítulo III), como al comparar el transcriptoma de axones motores *in vivo* con datos de axones *in vitro* (Minis et al., 2014; Briese et al., 2015; Zappulo et al., 2017; Nijssen et al., 2018) (resultados presentados en Trabajo II), se observa que la gran mayoría de los ARNs comunes codifican proteínas que pertenecen a estas tres categorías. Por otro lado, al analizar el proteoma axonal se observó que las proteínas más abundantes pertenecen a estas tres categorías, y para muchas de ellas está localizado en el dominio axonal los ARNm que las codifican (Fig. 6C, Capítulo III). Estos resultados indicarían que la síntesis local de proteínas en el axón es un mecanismo celular activo para este grupo de proteínas, actuando en niveles basales o en circunstancias especiales.

Varios trabajos han reportado el rol que cumple la síntesis local de proteínas con funciones relacionadas a la traducción, mitocondria y citoesqueleto en el correcto mantenimiento de la masa axoplásmica. En el caso de la β-actina, se describió que su síntesis local en axones en crecimiento contribuye a la estabilización de nuevas ramificaciones, y muy probablemente ayude a la aparición de las mismas (Wong et al., 2017). A su vez, se ha planteado que las proteínas recientemente sintetizadas pueden brindar oportunidades para un procesamiento postraduccional único, el cual es crucial para funciones específicas en el compartimento axonal maduro (Jung et al., 2012; Perry & Fainzilber, 2014). Por ejemplo, se ha propuesto que la β-actina recién sintetizada puede polimerizar o nuclear la polimerización de manera más eficiente que la "actina más antigua", debido a la unión de la chaperona a la cadena naciente de β-actina (revisado en Liao et al., 2015). En los axones maduros identificamos los ARNm codificantes para proteínas estructurales del citoesqueleto, tanto de expresión ubicua como la β-actina, así como los que codifican proteínas neurono-específicas como las tres subunidades de los neurofilamentos y la tubulina β3. Al analizar el proteoma de axones motores y sensoriales maduros observamos que estas proteínas son muy abundantes, pudiendo ser la síntesis local un mecanismo clave para mantener la homeostasis de las mismas, así como también responder de forma rápida a estímulos intrínsecos o extrínsecos. A su vez, también fueron identificados ARNm que codifican proteínas con funciones regulatorias del citoesqueleto y motores moleculares asociados al mismo.

Por otro lado, observamos que los ARNs más abundantes en todas las muestras de axones *in vivo* analizadas son aquellos codificados por el genoma mitocondrial (13 genes). Incluso, la abundancia relativa de estos ARNs en los axones es considerablemente mayor a la que presentan las raíces medulares de origen (Fig. 5A, Trabajo II). Este hecho ya fue reportado para axones *in vitro* (Minis et al., 2014; Nijssen et al., 2018), debiéndose probablemente a la gran cantidad de

mitocondrias que poseen los axones. Asimismo, observamos que en los axones in vivo también se localizan ARNm que dan lugar a proteínas mitocondriales codificadas por el genoma nuclear. Los axones in vivo poseen localizado entre un 10 y un 15% de los ARNs que codifican para el proteoma mitocondrial (que ronda las 1200 proteínas, todas codificadas por el genoma nuclear, salvo 13, que son codificadas por el genoma mitocondrial). Este hecho nos impulsó a estudiar si las proteínas codificadas por estos ARNs poseen alguna característica particular que explique por qué potencialmente sea necesaria su síntesis local. Al analizar los tiempos de vida media de las proteínas mitocondriales de neuronas in vitro (Dörrbaum et al., 2018) o in vivo (Fornasiero et al., 2018), no observamos que las proteínas codificadas por los ARNm presentes en el axoplasma tengan una vida media más corta (Fig. 5B, Trabajo II). Sin embargo, observamos que varias de las proteínas que podrían ser sintetizadas localmente en axones in vivo son blancos clásicos de daño por especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Estos resultados nos lleva a plantear que asistir a un proceso de renovación local de estos componentes luego de un daño puede ser de suma importancia para mantener la correcta funcionalidad mitocondrial. En favor de esta idea, existe evidencia de que la síntesis local de proteínas mitocondriales podría contribuir al mantenimiento de las mitocondrias estacionarias de los axones, proporcionando un rejuvenecimiento constante de sus proteínas (Misgeld & Schwarz, 2017). Adicionalmente, se observó que la inhibición de la síntesis de proteínas, incluso en tiempos cortos (3-4 horas), así como el bloque del importe a las mitocondrias de proteínas sintetizadas localmente es suficiente para inducir la despolarización de la membrana mitocondrial y disminuir la capacidad del organelo para generar ATP (Hillefors et al. 2007). En conjunto, estas observaciones indican que una porción significativa de las proteínas mitocondriales se está sintetizando rápidamente en el axón, y plantea la posibilidad de que una de las principales funciones del sistema sintético de proteínas local sea reemplazar los componentes altamente lábiles de este orgánulo. Por otro lado, el análisis del repertorio de ARNs codificante para proteínas mitocondriales a lo largo de la maduración y envejecimiento de axones in vivo indica que el mismo varía según el estadio del axón, presentando diferencias en los proceso biológicos que serían apoyados por la síntesis local (Fig. 4B, Capítulo II).

La localización en axones de ARNm codificantes para proteínas ribosomales ha sido ampliamente reportado *in vitro* (Willis et al., 2007; Taylor et al., 2009; Zivraj et al., 2010; Gumy et al., 2011; Saal et al., 2014 ; Briese et al., 2015; Rotem et al., 2017; Nijssen et al., 2018; Tóth et al., 2018), y recientemente se proporcionó evidencias de su síntesis local en axones *in vitro* (Shigeoka et al., 2016) e *in vivo* (Cagnetta et al., 2018). En nuestros datos observamos que los axones *in vivo* poseen localizado una gran proporción de los ARNm codificantes de proteínas ribosomales. La función que cumplirían estas proteínas si son sintetizadas localmente abre un debate interesante, ya que esto implicaría que las mismas posean funciones extra-ribosomales o que exista un

ensamblaje de ribosomas muy alejado del nucleolo, el sitio de ensamblaje clásico (revisado en Fromont-Racine et al., 2003; Peña et al., 2017). Apoyando esto último, Shigeoka y colaboradores muestran la incorporación de proteínas ribosomales sintetizadas localmente a los ribosomas citosólicos presentes en los axones (Shigeoka et al., 2019). En axones motores maduros observamos la localización de varios de estos ARNm, sugiriendo que si los mismos son sintetizados localmente puedan incorporarse a los ribosomas allí presentes. A través de este mecanismo, los axones podrían reparar o modificar los ribosomas localmente, extendiendo su vida media o cambiando los ARNm blancos a ser traducidos (Shi et al., 2017). Alternativamente, se plantea que las proteínas ribosomales traducidas localmente cumplan funciones extra-ribosomales (Warner & McIntosh, 2009).

En suma, se ha evidenciado la gran importancia que posee la síntesis local de proteínas con funciones relacionadas al citoesqueleto, mitocondria y traducción, tanto en axones *in vitro* como *in vivo*. Una gran proporción de los ARNs identificados en todos los axones *in vivo* analizados en nuestro estudio codifican proteínas con estas funciones. Muchos de ellos se encuentran presentes en todos los set de datos analizados, mientras que otros parecen ser localizados diferencialmente. Estudios complementarios que indiquen cuáles de estas proteínas se sintetizan localmente y qué funciones cumplen, son de suma importancia para dimensionar el aporte de este mecanismo a la fisiología axonal.

Otros ARNs localizados en axones in vivo.

Si bien los axones *in vivo* presentan un enriquecimiento en ARNm que codifican proteínas relacionadas a la traducción, mitocondrias y citoesqueleto, existe otro grupo de ARNs localizados que codifican proteínas con otras funciones. Por ejemplo, en axones motores maduros identificamos ARNm codificantes para proteínas que forman parte del proteosoma y relacionadas a procesos de ubiquitinación de proteínas (Fig. S1A, Trabajo II). Múltiples evidencias plantean que la regeneración exitosa de algunos axones lesionados depende de la capacidad para sintetizar localmente nuevas proteínas y degradar otras en el sitio de la lesión, de forma autónoma del cuerpo celular (revisado en Gumy et al., 2010). De esta manera, la presencia de ARNm que codifican proteínas del proteasoma podría proporcionar un mecanismo para responder rápidamente a estímulos externos, por ejemplo, en el caso de una lesión.

A su vez, los axones *in vivo* también poseen localizados ARNm que codifican factores de transcripción, algunos de ellos variando de forma significativa en los axones motores a lo largo de la maduración. Este grupo de ARNm fue también reportado en axones *in vitro*, surgiendo la interrogante del rol que cumplirían estas proteínas de ser sintetizadas. Varios trabajos plantean la existencia de una respuesta transcripcional del soma a estímulos periféricos, la cual sería llevada a cabo por factores de transcripción sintetizados localmente en los axones y transportados retrógradamente al núcleo (revisado en Ji & Jaffrey, 2014).

Por último, nos gustaría destacar que en los axones *in vivo* analizados fue detectada una gran variedad de ARNs no codificantes, presentando algunos de ellos abundancias elevadas. Cabe señalar que para una precisa caracterización de algunos tipos de ARNs no codificantes es necesaria la realización de bibliotecas específicas, como bibliotecas direccionales o de ARNs pequeños, lo cual no fue realizado en nuestro caso. No obstante, en trabajos previos ya se había identificado la presencia de estos ARNs en axones *in vitro* (Briese et al., 2015). Se han descrito a los ARNs no codificantes como actores centrales en el desarrollo y maduración de las neuronas, actuando como reguladores postrancripcionales. Varios trabajos han analizado particularmente la localización y funciones de los microARNs en los axones (revisado en Wang & Bao, 2017), los cuales permitirían un control rápido y preciso de la síntesis local.

Cambios en el repertorio de ARNs axonales asociados la maduración y envejecimiento de los nervios periféricos.

Los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en los nervios debido al envejecimiento son similares a los observados en las enfermedades neurodegenerativas (revisado en Salvadores et al., 2017, Hou et al., 2019), sugiriendo que posiblemente estén actuando los mismos mecanismos celulares en ambos casos. A su vez, se ha observado que la degeneración axonal puede preceder la pérdida de los somas neuronales (Spencer & Ochoa, 1981; Chung et al., 2017). Estos hallazgos nos impulsaron a estudiar si existen cambios en el repertorio de ARNs localizados en axones durante los procesos de maduración y envejecimiento, de manera de aportar a comprender las bases moleculares detrás de estos procesos. El análisis comparativo del transcriptoma de axones inmaduros, maduros y envejecidos mostró una gran diferencia en el número de ARNs detectados en cada estadio. Mientras que los axones maduros presentan alrededor de 1000 ARNs, el número detectado en axones inmaduros y envejecidos asciende aproximadamente a 2500 (Fig. 2B, Capítulo II). Esta diferencia podría estar relacionada al estado madurativo del axón. Por ejemplo,

se ha descrito que los axones de nervios periféricos presentan un período de estabilidad, tanto morfológica como funcional, entre los 6 y 12 meses de edad en roedores (Verdú et al., 2000). El menor número de ARNs localizados en los axones in vivo maduros analizados podría estar relacionado al estado estacionario que presentan los axones en este período. Sin embargo, los axones inmaduros así como los envejecidos están cursando estadios más dinámicos, pudiendo tener, de esta manera, una mayor importancia la síntesis local de proteínas en dichos estadios. Más allá de la diferencia en el número de ARNs detectados en axones maduros respecto a axones inmaduros y envejecidos, también observamos un gran cambio en la identidad de los ARNs detectados (Fig. 2B, Capítulo II). Al comparar los axones inmaduros con los envejecidos, los cuales poseen un número similar de ARNs detectados, se observa que solo la mitad de ellos fueron identificados en ambas muestras. Este hallazgo indica que existe una gran regulación del mecanismo de transporte y localización de ARNs hacia el dominio axonal durante el proceso de maduración y envejecimiento de los nervios periféricos, variando las proteínas que potencialmente puedan ser sintetizadas localmente. Estos resultados van en línea con lo reportando previamente, donde se observó un gran cambio en los ARNs localizados en axones in vitro de diferentes estadios (Zivraj et al., 2010; Gumy et al., 2011). Más aún, un estudio reciente evidenció cambios considerables en los ARNm que están siendo traducidos en los axones in vivo durante el desarrollo y la formación de los circuitos visuales, e incluso en estadios adultos (Shigeoka et al., 2016).

Como se describió anteriormente, al analizar los ARNs presentes en todos los estadios, se observa un enriquecimiento en funciones relacionadas al citoesqueleto, mitocondria y traducción (Fig. 2C, Capítulo II). Por otro lado, analizamos los términos ontológicos enriquecidos en los ARNs presentes únicamente en cada uno de los estadio estudiados. Si bien esperábamos identificar un enriquecimiento en términos relacionados a los procesos de maduración y envejecimiento que están ocurriendo, los resultados mostraron que los tres estadios se enriquecen en las mismas funciones o procesos (Tabla S2, Capítulo II). Esto indica que, en axones de distintos estadios, la síntesis local de proteínas apoyaría o complementaría a las mismas funciones pero con un repertorio distinto de proteínas asociadas a las mismas.

Por otro lado, observamos que tanto el número relativo como absoluto de ARNm codificantes para proteínas mitocondriales (productos de genes nucleares) localizado en axones motores desciende en los axones envejecidos, siento particularmente más afectados el grupo de ARNs que codifican para proteínas que cumplen funciones en la membrana mitocondrial interna y matriz mitocondrial (Fig. 4A, Capítulo II). Estudios posteriores son necesarios para lograr el entendimiento del efecto que provocan estos cambios en la fisiología mitocondrial y, por ende, en la fisiología axonal.

Por último, nos resultó interesante indagar qué cambios ocurren durante la maduración y envejecimiento del nervio a nivel del micro-ambiente de los axones analizados. Datos recientes indican que las causas de las fallas de algunos mecanismos en nervios envejecidos, como la regeneración nerviosa, se deben principalmente a cambios en el micro-ambiente axonal, y no a un cambios propios del axón (Painter et al., 2014; Scheib y Höke, 2016). Los hallazgos encontrados indican que en los nervios envejecidos hay una alta expresión de genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria, lo que va en línea con los datos morfológicos y funcionales ya reportados (Ceballos et al., 1999; Verdú et al., 2000; Walsh et al., 2015; Büttner et al., 2018).

Neuronas con distintas funciones poseen diferencias en el repertorio de ARNs localizado en sus axones.

Los resultados analizados hasta el momento nos permitieron caracterizar el transcriptoma de axones motores maduros, y analizar los cambios en el repertorio de ARNs localizados en axones motores asociados a la maduración y envejecimiento de los nervios. Posteriormente, nos preguntamos si axones provenientes de distintos tipos neuronales poseen diferencias en los componentes localizados en dicho dominio neuronal, tanto a nivel de ARNs como proteínas. Las raíces espinales resultan ser un excelente modelo para este tipo de análisis, ya que las raíces ventrales están compuestas por axones provenientes de neuronas motoras y las raíces dorsales por axones provenientes de neuronas sensoriales. Las neuronas motoras llevan información desde el SNC hacia la periferia. Por el contrario, las neuronas sensoriales son neuronas aferentes, las cuales llevan información desde la periferia hacia el SNC. Además, estas neuronas se diferencian en el tipo de neurotransmisor que utilizan para transmitir la información, siendo las neuronas motoras y las sensoriales participan entonces en diferentes circuitos y difieren en su estructura básica (multipolares y pseudounipolares, respectivamente).

El análisis comparativo de los transcriptomas de axones motores y sensoriales mostró que aproximadamente el 50% del repertorio de ARNs es común para ambos tipos de axones (Fig. 3A, Capítulo III). El conjunto de proteínas codificadas por este grupo de ARNs está enriquecido en términos ontológicos relacionados al citoesqueleto, mitocondria y traducción. Este resultado resalta una vez más estas categorías de proteínas, sugiriendo que la síntesis local de las mismas es un proceso clave para el correcto mantenimiento de axones provenientes de diferentes tipos

neuronales o etapas madurativas. Al analizar conjuntamente en transcriptoma y proteoma de cada uno de los axones, observamos que para aproximadamente un quinto de las proteínas axonales identificadas se encuentra localizado el ARNm que las codifican (Fig. 6A-B, Capítulo III). Mayoritariamente, estas proteínas poseen funciones relacionadas al citoesqueleto y mitocondria. A su vez, la abundancia promedio de las proteínas axonales para las cuales el ARNm que las codifica está localizado en los axones es mayor a la abundancia del resto de proteínas axonales (Fig. 6C-D, Capítulo III). Un hallazgo similar fue reportado para neuritas en cultivo (Zappulo et al., 2017), colocando a la síntesis local de proteínas como un mecanismo necesario para el correcto mantenimiento de los altos niveles de abundancia de este grupo de proteínas.

Al analizar los ARNs únicos de cada tipo axonal observamos que los dos conjuntos se enriguecen en términos ontológicos diferentes (Fig. 3D, Tabla S2, Capítulo III). Este hecho difiere de lo observado al analizar los axones motores de diferentes estadios (Capítulo II), donde las categorías enriguecidas en los conjuntos de ARNs únicos de cada estadio eran las mismas, pero con un repertorio diferente de ARNm. Los análisis de enriquecimiento realizados hasta el momento no nos permiten establecer una correlación entre las diferencias en el repertorio de ARNs localizado en axones proveniente de neuronas con diferentes funciones y las consecuencias funcionales que traería la síntesis local de estos ARNs. Estudios más exhaustivos de las funciones que poseen estos grupos de proteínas son necesarios para dimensionar el rol de la síntesis local de proteínas a la hora de mantener las diferencias funcionales de axones provenientes de distintos tipos neuronales. Al realizar un análisis comparativo entre los transcriptomas de raíces espinales ventrales y dorsales observamos que las raíces dorsales presentaban una mayor expresión de genes relacionados a la percepción del dolor (Fig. 7C, Tabla S5). A su vez, el análisis proteómico mostró que entre las proteínas con mayor expresión en raíces ventrales se encuentra la colinacetiltransferasa (Chat), enzima responsable de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina, utilizado comúnmente como marcador de neuronas motoras. Por otro lado, las raíces dorsales presentaron una mayor abundancia de la calretinina (Calb2), proteína de unión al calcio involucrada en la señalización mediado por dicho ión, la cual es expresada en neuronas sensoriales primarias (Duc et al., 1993; Ambrus et al., 1998; Levanti et al., 2008).
CONCLUSIONES

El objetivo general del trabajo de Tesis estuvo orientado hacia el estudio de los mecanismos celulares involucrados en el mantenimiento de la masa axoplásmica, más específicamente, hacia el aporte de la síntesis local de proteínas en axones *in vivo*. Este objetivo fue abordado mediante la caracterización del repertorio de ARNs localizado en los axones, los cuales podrían ser traducidos localmente bajo distintas condiciones.

Los resultados de la tesis nos permitieron concluir que :

1) El método de microdisección de axones es una valiosa técnica que permite el estudio de los componentes axonales, tanto ARNs como proteínas, mediante técnicas de biología molecular a gran escala.

2) El número de ARNs localizados en el dominio axonal es menor en condiciones *in vivo* que en condiciones *in vitro*.

3) Los axones *in vivo* poseen la capacidad de sintetizar localmente proteínas con variadas funciones.

4) El transcriptoma de axones *in vivo* está compuesto por dos grupos de ARNs, uno grupo presente en axones en diferentes condiciones, los cuales codifican proteínas con funciones relacionadas a la traducción, mitocondrias y citoesqueleto; y otro grupo, el cual codifica proteínas con funciones más específicas según el estadio o condiciones del axón.

5) Existe un cambio en el número e identidad de los ARNs localizados en los axones *in vivo* provenientes de neuronas motoras en diferentes estadios madurativos.

6) Axones provenientes de neuronas con distintas funciones poseen variaciones en el repertorio de ARNs localizados en dicho dominio neuronal.

PERSPECTIVAS

En el transcurso de esta Tesis hemos obtenido una gran cantidad de datos de los transcriptomas de axones *in vivo*, y se ha realizado una caracterización a nivel global de los mismos. A continuación, planteamos las perspectivas a corto y mediano plazo para profundizar esta caracterización.

Dada la disponibilidad actual de métodos más sensibles de preparación de bibliotecas de secuenciación (por ejemplo, los que permiten el análisis transcriptómico de una sola célula, singlecell RNA-Seq), sería interesante analizar la variabilidad biológica del transcriptoma axonal mediante el análisis de réplicas biológicas a escalas "ómicas". A su vez, nos gustaría continuar los análisis a nivel proteómico, intentando obtener los datos del proteoma completo, y no solo las proteínas más abundantes como conseguimos hasta el momento.

Por otro lado, nos planteamos analizar la síntesis local en axones in vivo de algunos genes candidatos. El primero sería el Nefl, ya que posee una elevada abundancia en nuestros datos, se confirmó su presencia en los axones estudiados mediante hibridación in situ de molécula única (smFISH) y es conocida la importancia de esta proteína citoesquelética en los axones. Por otro lado, sería también interesante identificar si existe síntesis local de proteínas ribosomales en axones in vivo. Para ambos casos, tenemos algunos resultados preliminares. En primer lugar, analizamos la co-localización de las proteínas de interés con puromicina, mediante microscopia confocal. La puromicina es un antibiótico que inhibe la síntesis proteica mediante su incorporación a la cadena peptídica, produciendo la terminación prematura. Utilizándola en conjunto con cicloheximida, se logra mantener a la cadena naciente unida al ribosoma. De esta manera, se puede identificar el sitio preciso de traducción de esa proteína mediante la utilización de un anticuerpo que reconozca a la puromicina y otro específico para la proteína de interés. Los resultados preliminares obtenidos hasta el momento muestran que los axones in vivo poseen una gran cantidad de ribosomas activos, aumentando luego de una lesión en el nervio. Por otro lado, nos planteamos realizar ensayos más precisos, utilizando la técnica de Puro-PLA. Esta técnica permite identificar, mediante microscopia de fluorescencia, los sitios donde ocurre la síntesis de una proteína específica, detectando la proximidad de dos anticuerpos (uno contra la proteína de interés y otra contra la puromicina) mediante una PCR in situ fluorescente. Actualmente hemos comenzado con la puesta a punto de esta técnica.

En cuanto a la caracterización más profunda de los transcriptomas obtenidos, nos planteamos analizar los ARNm que codifican factores de transcripción. Como se discutió anteriormente, varios

ARNm que codifican factores de transcripción fueron detectados en nuestros datos, algunos de ellos variando de forma significativa en los axones motores a lo largo de la maduración. En primera instancia, planteamos estudiar si algunos de estos ARNs identificados son traducidos localmente, y posteriormente, analizar si el nivel de síntesis cambia frente a diferentes estímulos, como por ejemplo una lesión. Este análisis podría ser llevado a cabo mediante la utilización de la técnica Puro-PLA presentada anteriormente.

Por otro lado, sería muy interesante analizar los ARNs no codificantes que fueron detectados en los axones *in vivo*, ya que se identificó una gran variedad de ellos y en algunos casos con abundancias elevadas. Para confirmar la localización axonal de algunos de ellos podríamos realizar smFISH, ya que es posible el diseño de sondas para ARNs no codificantes. En lo que respecta a los microARNs, tenemos resultados preliminares de los microARNs presentes en axones motores y sensoriales. Este trabajo está siendo realizado en colaboración con el Dr. Federico Dajas-Bailador (Profesor Asistente de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Nottingham, UK).

Asimismo, resulta interesante comprender cuáles son los mecanismos responsables de la categorización de los ARNm a ser transportados hacia el dominio axonal. Varios trabajos han descrito que existen señales tanto en los 5' como en los 3' UTRs de los ARNm responsables de esta localización diferencial. Estas señales (tanto de estructura primaria como secundaria) serían reconocidas por proteínas de unión al ARN (RBP, del ingles RNA Binding Protein) y transportadas hacia el axón mediante la asociación con motores moleculares (revisado en Sahoo et al., 2018). Mecanismos de transporte alternativos han sido descritos recientemente, como por ejemplo el transporte de ARNs asociados a la membrana mitocondrial externa (Fazal et al., 2019), lisososmas (Liao et al., 2019) o endosomas móviles (Cioni et al., 2019). Con los datos obtenidos hasta el momento podríamos realizar un análisis comparativo de isoformas detectadas en axones y raíces espinales, de manera de detectar si existe alguna isoforma preferentemente localizada en axones. A su vez, nos planteamos complementar este análisis mediante la comparación de estos datos con los ARNs asociados a MyoVa (motor molecular asociado al citoesqueleto de actina) y ZBP1 (proteína de unión al ARN), ambas proteínas detectadas en axones, asociadas a las PARPs (Sotelo-Silveira et al., 2008; Calliari et al., 2014). Estos datos fueron obtenidos a partir de raíces ventrales, realizando inmunoprecipitación de ribonucleopartículas con anti-MyoVa y anti-ZBP1, e identificando, mediante secuenciación masiva, los ARNs que co-inmunoprecipitan con dichas proteínas.

Por último, sería interesante evaluar los cambios a nivel de los distintos componentes axonales (ARNs y proteínas) en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas del SNP, como la esclerosis lateral amiotrófica y la atrofia muscular espinal.

BIBLIOGRAFÍA

Adalbert R, Coleman MP. 2013. Review: Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* **39**:90–108.

Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, Han SSW, Kiskinis E, Winborn B, Freibaum BD, Kanagaraj A, Clare AJ, Badders NM, et al. 2014. Axonal Transport of TDP-43 mRNA Granules Is Impaired by ALS-Causing Mutations. *Neuron* **81**:536–543.

Alexa A, Rahnenführer J. 2019. Gene set enrichment analysis with topGO. *http://www.mpi-sb.mpg.de/~alexa Contents*.

Alvarez J, Torres JC. 1985. Slow axoplasmic transport: a fiction? J Theor Biol 112:627–51.

Ambrus A, Kraftsik R, Barakat-Walter I. 1998. Ontogeny of calretinin expression in rat dorsal root ganglia. *Dev Brain Res* **106**:101–108.

Arrigo AP. 2001. Hsp27: Novel regulator of intracellular redox state. *IUBMB Life* **52**:303–307.

Ben-Yaakov K, Dagan SY, Segal-Ruder Y, Shalem O, Vuppalanchi D, Willis DE, Yudin D, Rishal I, Rother F, Bader M, Blesch A, Pilpel Y, et al. 2012. Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J* **31**:1350–63.

Benech C, Sotelo JR, Menéndez J, Correa-Luna R. 1982. Autoradiographic study of RNA and protein synthesis in sectioned peripheral nerves. *Exp Neurol* **76**:72–82.

Bentley M, Banker G. 2016. The cellular mechanisms that maintain neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* **17**:611–622.

Black MM. 2016. Axonal transport: The orderly motion of axonal structures. Methods Cell Biol 131:1-19.

Black MM, Lasek RJ. 1980. Slow components of axonal transport: two cytoskeletal networks. *J Cell Biol* **86**:616–23.

Bliek AM van der, Shen Q, Kawajiri S. 2013. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**:a011072.

Boess F, Kamber M, Romer S, Gasser R, Muller D, Albertini S, Suter L. 2003. Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol Sci* **73**:386–402.

Briese M, Saal L, Appenzeller S, Moradi M, Baluapuri A, Sendtner M. 2015. Whole transcriptome profiling reveals the RNA content of motor axons. *Nucleic Acids Res* **44**:1–19.

Burke RE, O'Malley K. 2013. Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol* **246**:72–83.

Büttner R, Schulz A, Reuter M, Akula AK, Mindos T, Carlstedt A, Riecken LB, Baader SL, Bauer R, Morrison H. 2018. Inflammaging impairs peripheral nerve maintenance and regeneration. *Aging Cell* **17**:e12833.

Cagnetta R, Frese CK, Shigeoka T, Krijgsveld J, Holt CE. 2018. Rapid Cue-Specific Remodeling of the Nascent Axonal Proteome. *Neuron* **99**:29–46.

Calliari A, Farías J, Puppo A, Canclini L, Mercer J a, Munroe D, Sotelo JR, Sotelo-Silveira JR. 2014. Myosin Va associates with mRNA in ribonucleoprotein particles present in myelinated peripheral axons and in the central nervous system. *Dev Neurobiol* **74**:382–96.

Campbell DS, Holt CE. 2001. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* **32**:1013–1026.

Campenot RB, Eng H. 2000. Protein synthesis in axons and its possible functions. *J Neurocytol* **29**:793–8.

Campenot RB, Lund K, Mok S-A. 2009. Production of compartmented cultures of rat sympathetic neurons. *Nat Protoc* **4**:1869–1887.

Carlson M. 2019. org.Rn.eg.db: Genome wide annotation for Rat. R version 3.2.8.

Ceballos D, Cuadras J, Verdú E, Navarro X. 1999. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat* **195**:563–576.

Chung T, Park J, Kim S, Montes N, Walston J, Höke A. 2017. Evidence for dying-back axonal degeneration in age-associated skeletal muscle decline. *Muscle and Nerve* **55**:894–901.

Cioni JM, Koppers M, Holt CE. 2018. Molecular control of local translation in axon development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* **51**:86–94.

Cohen LD, Zuchman R, Sorokina O, Müller A, Dieterich DC, Armstrong JD, Ziv T, Ziv NE. 2013. Metabolic Turnover of Synaptic Proteins: Kinetics, Interdependencies and Implications for Synaptic Maintenance. *PLoS One* **8**:e63191.

Coleman M. 2011. Molecular Signaling. How Do Axons Die? Elsevier Inc. 185–217 p.

Conway L, Ross JL. 2013. A model system to study transport of self-assembled cargos. *Commun Integr Biol* **6**:e25387.

Cornejo V, Luarte A, Couve A. 2017. Global and local mechanisms sustain axonal proteostasis of transmembrane proteins. *Traffic* **18**:255–266.

Court FA, Midha R, Cisterna BA, Grochmal J, Shakhbazau A, Hendriks WT, Minnen J Van. 2011. Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons. *Glia* **59**:1529–39.

Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. 2014. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* **13**:2513–2526.

Cox J, Mann M. 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**:1367–1372.

Dabrowski M, Aerts S, Hummelen P Van, Craessaerts K, Moor B De, Annaert W, Moreau Y, Strooper B De. 2003. Gene profiling of hippocampal neuronal culture. *J Neurochem* **85**:1279–88.

Deglincerti A, Jaffrey SR. 2012. Insights into the roles of local translation from the axonal transcriptome. *Open Biol* **2**:120079.

Dixit S, Fessel JP, Harrison FE. 2017. Mitochondrial dysfunction in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease and a novel protective role for ascorbate. *Free Radic Biol Med* **112**:515–523.

Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, Jensen LJ. 2019. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *J Proteome Res* **18**:623–632.

Dörrbaum AR, Kochen L, Langer JD, Schuman EM. 2018. Local and global influences on protein turnover in neurons and glia. *Elife* **7**:1–24.

Droz B, Leblond CP. 1963. Axonal migration of proteins in the central nervous system and pheripheral nerves as shown by radioautography. *J Comp Neurol* **121**:325–46.

Duc C, Barakat-Walter I, Droz B. 1993. Peripheral projections of calretinin-immunoreactive primary sensory neurons in chick hindlimbs. *Brain Res* **622**:321–324.

Esquisatto MAM, Aro AA de, Fêo HB, Gomes L. 2014. Changes in the connective tissue sheath of Wistar rat nerve with aging. *Ann Anat* **196**:441–448.

Farias J. 2014. Análisis del transcriptoma de axones mielínicos mediante secenciación masiva. *Tesis Maest PEDECIBA Uruguay*.

Farias J, Holt CE, Sotelo JRJR, Sotelo-Silveira JRJR. 2020. Axon micro-dissection and transcriptome profiling reveals the in vivo RNA content of fully differentiated myelinated motor axons. *RNA* 1–52.

Farias J, Sotelo JR, Sotelo-Silveira J. 2019. Towards Axonal System Biology: Genome Wide Views of Local mRNA Translation. *Proteomics* **19**:1900054.

Fischer LR, Glass JD. 2007. Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neurodegener Dis* **4**:431–442.

Flynn JM, Melovn S. 2013. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* **62**:4–12.

Forgue ST, Dahl JL. 1978. The Turnover Rate of Tubulin in Rat Brain. J Neurochem **31**:1289–1297.

Fornasiero EF, Mandad S, Wildhagen H, Alevra M, Rammner B, Keihani S, Opazo F, Urban I, Ischebeck T, Sakib MS, Fard MK, Kirli K, et al. 2018. Precisely measured protein lifetimes in the mouse brain reveal differences across tissues and subcellular fractions. *Nat Commun* **9**:4230.

Frankel RD, Koenig E. 1978. Identification of locally synthesized proteins in proximal stump axons of the neurotomized hypoglossal nerve. *Brain Res* **141**:67–76.

Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**:17–42.

Fu W, Liu Y, Yin H. 2019. Mitochondrial Dynamics: Biogenesis, Fission, Fusion, and Mitophagy in the Regulation of Stem Cell Behaviors. *Stem Cells Int Vol* **2019**:9757201.

Gilbert DS. 1975. Axoplasm architecture and physical properties as seen in the Myxicola giant axon. *J Physiol* **253**:257–301.

Gioio AE, Chun J-T, Crispino M, Capano CP, Giuditta A, Kaplan BB. 2002. Kinesin mRNA Is Present in the Squid Giant Axon. *J Neurochem* **63**:13–18.

Gioio AE, Eyman M, Zhang H, Lavina ZS, Giuditta A, Kaplan BB. 2001. Local synthesis of nuclearencoded mitochondrial proteins in the presynaptic nerve terminal. *J Neurosci Res* **64**:447–453. Gioio AE, Lavina ZS, Jurkovicova D, Zhang H, Eyman M, Giuditta A, Kaplan BB. 2004. Nerve terminals of squid photoreceptor neurons contain a heterogeneous population of mRNAs and translate a transfected reporter mRNA. *Eur J Neurosci* **20**:865–72.

Glock C, Heumüller M, Schuman EM. 2017. mRNA transport & local translation in neurons. *Curr Opin Neurobiol* **45**:169–177.

Grossmann S, Bauer S, Robinson PN, Vingron M. 2007. Improved detection of overrepresentation of Gene-Ontology annotations with parent-child analysis. *Bioinformatics* **23**:3024–3031.

Gumy LF, Tan CL, Fawcett JW. 2010. The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Exp Neurol* **223**:28–37.

Gumy LF, Yeo GSHH, Tung Y-CCL, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, Lam BYHH, Twiss JL, Holt CE, Fawcett JW, Gumy LF, Fawcett JW, et al. 2011. Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA* **17**:85–98.

Hanz S, Perlson E, Willis D, Zheng JQ, Massarwa R, Huerta JJ, Koltzenburg M, Kohler M, Van-Minnen J, Twiss JL, Fainzilber M. 2003. Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron* **40**:1095–1104.

Hemminki K. 1973. Turnover of actin in rat brain. Brain Res 57:259–260.

Heo S, Diering GH, Na CH, Nirujogi RS, Bachman JL, Pandey A, Huganir RL. 2018. Identification of long-lived synaptic proteins by proteomic analysis of synaptosome protein turnover. *Proc Natl Acad Sci* **115**:E3827–E3836.

Hillefors M, Gioio AE, Mameza MG, Kaplan BB. 2007. Axon Viability and Mitochondrial Function are Dependent on Local Protein Synthesis in Sympathetic Neurons. *Cell Mol Neurobiol* **27**:701–716.

Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. 2019. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **15**:565–581.

Howarth C, Gleeson P, Attwell D. 2012. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**:1222–1232.

Ikeda M, Oka Y. 2012. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain Behav* **2**:382–390.

Jang YC, Remmen H Van. 2011. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* **46**:193–198.

Ji S-J, Jaffrey SR. 2014. Axonal transcription factors: Novel regulators of growth cone-to-nucleus signaling. *Dev Neurobiol* **74**:245–58.

Jung H, Yoon BC, Holt CE. 2012. Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci* **13**:308–324.

Kadas D, Duch C, Consoulas C. 2019. Postnatal increases in axonal conduction velocity of an identified drosophila interneuron require fast sodium, L-type calcium and shaker potassium channels. *eNeuro* **6**:ENEURO.0181-19.2019.

Kanaan NM, Pigino GF, Brady ST, Lazarov O, Binder LI, Morfini GA. 2013. Axonal degeneration in Alzheimer's disease: When signaling abnormalities meet the axonal transport system. *Exp Neurol* **246**:44–53.

Kaplan BB, Gioio AE, Hillefors M, Aschrafi A. 2009. Axonal Protein Synthesis and the Regulation of Local Mitochondrial Function. *Results Probl Cell Differ* **48**:225–242.

Kerezoudi E, Thomas PK. 1999. Influence of age on regeneration in the peripheral nervous system. *Gerontology* **45**:301–306.

Kevenaar JT, Hoogenraad CC. 2015. The axonal cytoskeleton: From organization to function. *Front Mol Neurosci* **8**:1–12.

Kim D, Langmead B, Salzberg SL. 2015. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* **12**:357–360.

Kislinger T, Cox B, Kannan A, Chung C, Hu P, Ignatchenko A, Scott MS, Gramolini AO, Morris Q, Hallett MT, Rossant J, Hughes TR, et al. 2006. Global Survey of Organ and Organelle Protein Expression in Mouse: Combined Proteomic and Transcriptomic Profiling. *Cell* **125**:173–186.

Ko HG, Choi JH, Park DI, Kang SJJ, Lim CS, Sim SE, Shim J, Kim J II, Kim SS, Choi TH, Ye S, Lee J, et al. 2018. Rapid Turnover of Cortical NCAM1 Regulates Synaptic Reorganization after Peripheral Nerve Injury. *Cell Rep* **22**:748–759.

Koenig E. 1979. Ribosomal RNA in Mauthner axon: implications for a protein synthesizing machinery in the myelinated axon. *Brain Res* **174**:95–107.

Koenig E. 2009. Organized Ribosome-Containing Structural Domains in Axons. *Results Probl Cell Differ* **48**:173–191.

Koenig E, Giuditta A. 1999. Protein-synthesizing machinery in the axon compartment. *Neuroscience* **89**:5–15.

Koenig E, Martin R. 1996. Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *J Neurosci* **16**:1400–11.

Koenig E, Martin R, Titmus M, Sotelo-Silveira JR. 2000. Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J Neurosci* **20**:8390–400.

Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, Wallace DC. 2001. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2278–2283.

Kun A, Otero L, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR. 2007. Ribosomal Distributions in Axons of Mammalian Myelinated Fibers. *J Neurosci Res* **85**:2087–2098.

Kwon YN, Yoon SS. 2017. Sarcopenia: Neurological Point of View. J Bone Metab 24:83.

Landi F, Liperoti R, Russo A, Giovannini S, Tosato M, Capoluongo E, Bernabei R, Onder G. 2012. Sarcopenia as a risk factor for falls in elderly individuals: Results from the iISIRENTE study. *Clin Nutr* **31**:652–658.

Lane RK, Hilsabeck T, Rea SL. 2015. The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1847**:1387–1400.

Lasek RJ, Garner JA, Brady ST. 1984. Axonal transport of the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol* **99**:212s-221s.

Lee RH, Mitchell CS. 2015. Axonal transport cargo motor count versus average transport velocity: Is fast versus slow transport really single versus multiple motor transport? *J Theor Biol* **370**:39–44.

Levanti MB, Montalbano G, Laurà R, Ciriaco E, Cobo T, García-Suarez O, Germanà A, Vega JA. 2008. Calretinin in the peripheral nervous system of the adult zebrafish. *J Anat* **212**:67–71.

Liao G, Mingle L, Water L Van De, Liu G. 2015. Control of cell migration through mRNA localization and local translation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **6**:1–15.

Liu M-G, Li H, Xu X, Barnstable CJ, Zhang SS-M. 2008. Comparison of gene expression during in vivo and in vitro postnatal retina development. *J Ocul Biol Dis Infor* **1**:59–72.

Loeb LA, Wallace DC, Martin GM. 2005. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:18769–18770.

López-Leal R, Alvarez J, Court FA. 2016. Origin of Axonal Proteins: is the axon-Schwann cell unit a functional syncytium? *Cytoskeleton* **73**:629–639.

Lopez-Verrilli MA, Picou F, Court FA. 2013. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia* **61**:1795–1806.

Lorenz T, Willard M. 1978. Subcellular fractionation of intra-axonally transport polypeptides in the rabbit visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:505–9.

Lovatt D, Ruble BK, Lee J, Dueck H, Kim TK, Fisher S, Francis C, Spaethling JM, Wolf JA, Grady MS, Ulyanova A V, Yeldell SB, et al. 2014. Transcriptome in vivo analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods* **11**:190–6.

Mathieson T, Franken H, Kosinski J, Kurzawa N, Zinn N, Sweetman G, Poeckel D, Ratnu VS, Schramm M, Becher I, Steidel M, Noh KM, et al. 2018. Systematic analysis of protein turnover in primary cells. *Nat Commun* **9**:689.

Mathur C, Johnson KR, Tong BA, Miranda P, Srikumar D, Basilio D, Latorre R, Bezanilla F, Holmgren M. 2018. Demonstration of ion channel synthesis by isolated squid giant axon provides functional evidence for localized axonal membrane protein translation. *Sci Rep* **8**:2207.

Mattson MP, Magnus T. 2006. Ageing and neuronal vulnerability. Nat Rev Neurosci 7:278–294.

McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* **40**:4288–4297.

Melcangi R., Magnaghi V, Cavarretta I, Martini L, Piva F. 1998. Age-induced decrease of glycoprotein Po and myelin basic protein gene expression in the rat sciatic nerve. Repair by steroid derivatives. *Neuroscience* **85**:569–578.

Melcangi RC, Magnaghi V, Martini L. 2000. Aging in peripheral nerves: regulation of myelin protein genes by steroid hormones. *Prog Neurobiol* **60**:291–308.

Michaelevski I, Medzihradszky KF, Lynn A, Burlingame AL, Fainzilber M. 2010a. Axonal Transport Proteomics Reveals Mobilization of Translation Machinery to the Lesion Site in Injured Sciatic Nerve. *Mol Cell Proteomics* **9**:976–987. Michaelevski I, Segal-Ruder Y, Rozenbaum M, Medzihradszky KF, Shalem O, Coppola G, Horn-Saban S, Ben-Yaakov K, Dagan SY, Rishal I, Geschwind DH, Pilpel Y, et al. 2010b. Signaling to Transcription Networks in the Neuronal Retrograde Injury Response. *Sci Signal* **3**:ra53.

Michalski A, Damoc E, Hauschild JP, Lange O, Wieghaus A, Makarov A, Nagaraj N, Cox J, Mann M, Horning S. 2011. Mass spectrometry-based proteomics using Q exactive, a high-performance benchtop quadrupole orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics* **10**:M111.011015.

Milde S, Adalbert R, Elaman MH, Coleman MP. 2015. Axonal transport declines with age in two distinct phases separated by a period of relative stability. *Neurobiol Aging* **36**:971–981.

Millecamps S, Julien J-P. 2013. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **14**:161–176.

Minis A, Dahary D, Manor O, Leshkowitz D, Pilpel Y, Yaron A. 2014. Subcellular transcriptomicsdissection of the mRNA composition in the axonal compartment of sensory neurons. *Dev Neurobiol* **74**:365–381.

Misgeld T, Schwarz TL. 2017. Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture. *Neuron* **96**:651–666.

Müller K, Schnatz A, Schillner M, Woertge S, Müller C, Graevenitz I von, Waisman A, Minnen J van, Vogelaar CF. 2018. A predominantly glial origin of axonal ribosomes after nerve injury. *Glia* **66**:1591–1610.

Ni HM, Williams JA, Ding WX. 2015. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol* **4**:6–13.

Nijssen J, Benitez JA, Hoogstraaten R, Kee N, Hedlund E. 2018. Axon-seq decodes the motor axon transcriptome and its modulation in response to ALS. *Stem Cell Reports* **11**:321596.

Painter MW. 2017. Aging Schwann cells: mechanisms, implications, future directions. *Curr Opin Neurobiol* **47**:203–208.

Painter MW, Brosius Lutz A, Cheng YC, Latremoliere A, Duong K, Miller CM, Posada S, Cobos EJ, Zhang AX, Wagers AJ, Havton LA, Barres B, et al. 2014. Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. *Neuron* **83**:331–343.

Pannese E. 2011. Morphological changes in nerve cells during normal aging. *Brain Struct Funct* **216**:85–89.

Pannese E, Ledda M. 1991. Ribosomes in myelinated axons of the rabbit spinal ganglion neurons. *J Submicrosc Cytol Pathol* **23**:33–8.

Peña C, Hurt E, Panse VG. 2017. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat Struct Mol Biol* **24**:689–699.

Perry RB-T, Doron-Mandel E, lavnilovitch E, Rishal I, Dagan SY, Tsoory M, Coppola G, McDonald MK, Gomes C, Geschwind DH, Twiss JL, Yaron A, et al. 2012. Subcellular knockout of importin β 1 perturbs axonal retrograde signaling. *Neuron* **75**:294–305.

Perry RB, Fainzilber M. 2014. Local translation in neuronal processes--in vivo tests of a "heretical hypothesis." *Dev Neurobiol* **74**:210–217.

Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* **11**:1650–1667.

Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol* **33**:290–295.

Raff MC, Whitmore A V., Finn JT. 2002. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science (80-)* **296**:868–871.

Rage F, Boulisfane N, Rihan K, Neel H, Gostan T, Bertrand E, Bordonné R, Soret A. 2013. Genomewide identification of mRNAs associated with the protein SMN whose depletion decreases their axonal localization. *RNA* **19**:1755–1766.

Reeve A, Simcox E, Turnbull D. 2014. Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev* **14**:19–30.

Reitz C, Brayne C, Mayeux R. 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **7**:137–152.

Rishal I, Michaelevski I, Rozenbaum M, Shinder V, Medzihradszky KF, Burlingame AL, Fainzilber M. 2010. Axoplasm isolation from peripheral nerve. *Dev Neurobiol* **70**:126–133.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**:139–40.

Rotem N, Magen I, Ionescu A, Gershoni-Emek N, Altman T, Costa CJ, Gradus T, Pasmanik-Chor M, Willis DE, Ben-Dov IZ, Hornstein E, Perlson E. 2017. ALS along the Axons - Expression of coding and noncoding RNA differs in axons of ALS models. *Sci Rep* **7**:44500.

Roy S. 2014. Seeing the unseen: The hidden world of slow axonal transport. *Neuroscientist* **20**:71–81.

Rygiel KA, Picard M, Turnbull DM. 2016. The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. *J Physiol* **594**:4499–4512.

Saal L, Briese M, Kneitz S, Glinka M, Sendtner M. 2014. Subcellular transcriptome alterations in a cell culture model of spinal muscular atrophy point to widespread defects in axonal growth and presynaptic differentiation. *RNA* **20**:1789–1802.

Safaei R, Fischer I. 1990. Turnover of cytoskeletal proteins in vivo. *Brain Res* **533**:83–90.

Sahoo PK, Smith DS, Perrone-Bizzozero N, Twiss JL. 2018. Axonal mRNA transport and translation at a glance. *J Cell Sci* **131**:jcs196808.

Sakita M, Murakami S, Fujino H. 2016. Age-related morphological regression of myelinated fibers and capillary architecture of distal peripheral nerves in rats. *BMC Neurosci* **17**:17–39.

Salvadores N, Sanhueza M, Manque P, Court FA. 2017. Axonal degeneration during aging and its functional role in neurodegenerative disorders. *Front Neurosci* **11**:451.

Sarasija S, Norman KR. 2018. Role of presenilin in mitochondrial oxidative stress and neurodegeneration in caenorhabditis elegans. *Antioxidants* **7**:111.

Scheib JL, Höke A. 2016. An attenuated immune response by Schwann cells and macrophages inhibits nerve regeneration in aged rats. *Neurobiol Aging* **45**:1–9.

Scott DA, Das U, Tang Y, Roy S. 2011. Mechanistic logic underlying the axonal transport of cytosolic proteins. *Neuron* **70**:441–454.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga N, Wang J, Ramage D, Ami N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* **13**:6.

Shi Z, Fujii K, Kovary KM, Genuth NR, Röst HL, Teruel MN, Barna M. 2017. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol Cell* **67**:71–83.

Shigeoka T, Jung H, Jung J, Turner-Bridger B, Ohk J, Lin JQ, Amieux PS, Holt CE. 2016. Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits. *Cell* **166**:181–192.

Shigeoka T, Koppers M, Wong HHW, Lin JQ, Cagnetta R, Dwivedy A, Freitas Nascimento J de, Tartwijk FW van, Ströhl F, Cioni JM, Schaeffer J, Carrington M, et al. 2019. On-Site Ribosome Remodeling by Locally Synthesized Ribosomal Proteins in Axons. *Cell Rep* **29**:3605–3619.

Singh A, Zhi L, Zhang H. 2019. LRRK2 and mitochondria: Recent advances and current views. *Brain Res* **1702**:96–104.

Sinha A, Ignatchenko V, Ignatchenko A, Mejia-Guerrero S, Kislinger T. 2014. In-depth proteomic analyses of ovarian cancer cell line exosomes reveals differential enrichment of functional categories compared to the NCI 60 proteome. *Biochem Biophys Res Commun* **445**:694–701.

Siu LT, Gordon T. 2003. Mechanisms controlling axonal sprouting at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* **32**:961–974.

Smith AC, Robinson AJ. 2019. Mitominer v4.0: An updated database of mitochondrial localization evidence, phenotypes and diseases. *Nucleic Acids Res* **47**:D1225–D1228.

Song Y, Kang M, Morfini G, Brady ST. 2016. Fast axonal transport in isolated axoplasm from the squid giant axon. *Methods Cell Biol* **131**:331–348.

Sotelo-Silveira J, Crispino M, Puppo A, Sotelo JR, Koenig E. 2008. Myelinated axons contain beta-actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation. *J Neurochem* **104**:545–57.

Sotelo-Silveira JR. 2003. Caracterización molecular de las placas periaxoplasmicas en axones mielínicos de vertebrados. *Tesis Dr PEDECIBA Uruguay*.

Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cárdenas M, Koenig E, Sotelo JR. 2004. Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (periaxoplasmic ribosomal plaques) of myelinated axons. *J Neurobiol* **60**:187–96.

Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cal K, Bresque M, Dipaolo A, Farias J, Mercer JA. 2014. Glia to axon RNA transfer. *Dev Neurobiol* **74**:292–302.

Sotelo JR, Canclini L, Kun A, Sotelo-Silveira JR, Xu L, Wallrabe H, Calliari A, Rosso G, Cal K, Mercer JA. 2013. Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from Schwann cells to axons. *PLoS One* **8**:e61905.

Spencer P, Ochoa J. 1981. The Mammalian Peripheral Nervous System in Old Age. In: Johnson JEJ, editor. Aging and Cell Structure, Springer, p 35–104.

Taetzsch T, Valdez G. 2018. NMJ maintenance and repair in aging. Curr Opin Physiol 4:57-64.

Tang Y, Das U, Scott DA, Roy S. 2012. The slow axonal transport of alpha-synuclein-mechanistic commonalities amongst diverse cytosolic cargoes. *Cytoskeleton* **69**:506–513.

Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrà D, Pietro A Di, Nueda MJ, Ferrer A, Conesa A. 2015. Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res* **43**:e140.

Taylor AM, Berchtold NC, Perreau VM, Tu CH, Li Jeon N, Cotman CW. 2009. Axonal mRNA in Uninjured and Regenerating Cortical Mammalian Axons. *J Neurosci* **29**:4697–4707.

Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL. 2005. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* **2**:599–605.

Terenzio M, Koley S, Samra N, Rishal I, Zhao Q, Sahoo PK, Urisman A, Marvaldi L, Oses-prieto JA, Forester C, Gomes C, Kalinski AL, et al. 2018. Locally translated mTOR controls axonal local translation in nerve injury. *Science* **359**:1416–1421.

Tóth EN, Lohith A, Mondal M, Guo J, Fukamizu A, Pourmand N. 2018. Single-cell nanobiopsy reveals compartmentalization of mRNAs within neuronal cells. *J Biol Chem* **293**:4940–4951.

Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J. 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* **13**:731–740.

Tytell M, Lasek RJ, Gainer H. 2016. Axonal maintenance, glia, exosomes, and heat shock proteins. *F1000Research* **5**:205.

Verdier V, Csárdi G, Preux-Charles AS De, Médard JJ, Smit AB, Verheijen MHG, Bergmann S, Chrast R. 2012. Aging of myelinating glial cells predominantly affects lipid metabolism and immune response pathways. *Glia* **60**:751–760.

Verdú E, Butí M, Navarro X. 1996. Functional changes of the peripheral nervous system with aging in the mouse. *Neurobiol Aging* **17**:73–77.

Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. 2000. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst* **5**:191–208.

Verma P, Chierzi S, Codd AM, Campbell DS, Meyer RL, Holt CE, Fawcett JW. 2005. Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J Neurosci* **25**:331–42.

Visser M, Schaap LA. 2011. Consequences of sarcopenia. Clin Geriatr Med 27:387–399.

Walsh ME, Sloane LB, Fischer KE, Austad SN, Richardson A, Remmen H Van. 2015. Use of Nerve Conduction Velocity to Assess Peripheral Nerve Health in Aging Mice. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* **70**:1312–1319.

Wang B, Bao L. 2017. Axonal microRNAs: Localization, function and regulatory mechanism during axon development. *J Mol Cell Biol* **9**:82–90.

Warner JR, McIntosh KB. 20009. How common are extra-ribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* **34**:3–11.

Waxman SG. 1980. Determinants of conduction velocity in myelinated nerve fibers. *Muscle Nerve* **3**:141–150.

Wilkinson L. 2012. Exact and approximate area-proportional circular venn and euler diagrams. *IEEE Trans Vis Comput Graph* **18**:321–331.

Willis D, Li KW, Zheng J-Q, Chang JH, Smit AB, Kelly T, Merianda TT, Sylvester J, Minnen J van, Twiss JL, Smit AB, Kelly T, et al. 2005. Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J Neurosci* **25**:778–91.

Willis DE, Niekerk EA Van, Sasaki Y, Mesngon M, Merianda TT, Williams GG, Kendall M, Smith DS, Bassell GJ, Twiss JL. 2007. Extracellular stimuli specifically regulate localized levels of individual neuronal mRNAs. *J Cell Biol* **178**:965–80.

Wojtowicz EE, Lechman ER, Hermans KG, Schoof EM, Wienholds E, Isserlin R, Veelen PA van, Broekhuis MJC, Janssen GMC, Trotman-Grant A, Dobson SM, Krivdova G, et al. 2016. Ectopic miR-125a Expression Induces Long-Term Repopulating Stem Cell Capacity in Mouse and Human Hematopoietic Progenitors. *Cell Stem Cell* **19**:383–396.

Wong HHW, Lin JQ, Ströhl F, Roque CG, Cioni JM, Cagnetta R, Turner-Bridger B, Laine RF, Harris WA, Kaminski CF, Holt CE. 2017. RNA Docking and Local Translation Regulate Site-Specific Axon Remodeling In Vivo. *Neuron* **95**:852–868.

Yoo S, Niekerk E a van, Merianda TT, Twiss JL. 2010. Dynamics of axonal mRNA transport and implications for peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* **223**:19–27.

Zappulo A, Bruck D Van Den, Ciolli Mattioli C, Franke V, Imami K, McShane E, Moreno-Estelles M, Calviello L, Filipchyk A, Peguero-Sanchez E, Müller T, Woehler A, et al. 2017. RNA localization is a key determinant of neurite-enriched proteome. *Nat Commun* **8**:583.

Zelená J. 1970. Ribosome-like particles in myelinated axons of the rat. Brain Res 24:359–63.

Zhang X, Poo M. 2002. Localized Synaptic Potentiation by BDNF Requires Local Protein Synthesis in the Developing Axon. *Neuron* **36**:675–688.

Zhang X, Smits AH, Tilburg GBA Van, Ovaa H, Huber W, Vermeulen M. 2018. Proteome-wide identification of ubiquitin interactions using UbIA-MS. *Nat Protoc* **13**:530–550.

Zheng J, Kelly TK, Chang B, Ryazantsev S, Rajasekaran AK, Martin KC, Twiss JL. 2001. A Functional Role for Intra-Axonal Protein Synthesis during Axonal Regeneration from Adult Sensory Neurons. **21**:9291–9303.

Zivraj KH, Tung YCLYCL, Piper M, Gumy L, Fawcett JW, Yeo GSHH, Holt CE. 2010. Subcellular Profiling Reveals Distinct and Developmentally Regulated Repertoire of Growth Cone mRNAs. *J Neurosci* **30**:15464–15478.

ANEXO I

El material suplementario de esta tesis se puede encontrar en los siguientes links:

Trabajo II.

- * Datos crudos RNA-seq: Repositorio SRA (NCBI), Project ID: PRJNA598237.
- * Material suplementario: https://rnajournal.cshlp.org/content/26/5/595/suppl/DC1

Capítulo II.

* Tablas suplementarias:

https://drive.google.com/drive/folders/1NEqMTea6u1kKnvesvJxkrTpX03UVJgLl?usp=sharing

Capítulo III.

* Tablas suplementarias:

https://drive.google.com/drive/folders/1dOA2VmExOaVxGflebp2D7LdQwRUjRccV?usp=sharing

ANEXO II

Age-related changes in RNA repertoire localized in peripheral motor axons.

Joaquina Farias^{1,#}, José R. Sotelo-Silveira ^{1,2}

1- Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, 11600, Uruguay.

2- Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 11400, Uruguay.

#- Current address: PDU "Espacio de Biología Vegetal del Noreste", Centro Universitario de Tacuarembó, Universidad de la República, Tacuarembó, 45000, Uruguay.

Running title: Age-related changes in motor axonal transcriptome

Keywords: axonal mRNAs, mRNA localization, motor neuron, peripheral nerve; aging; maturation.

Abstract.

Aging is associated with many functional and morphological changes in the nervous system. Since some of them are similar to those observed in neurodegenerative diseases, it is interesting to understand the mechanisms that underlie both processes. Here, we examined the RNAs localized in motor axons derived from immature, mature and aged medullary ventral roots in order to identify the possible transcriptomic changes that occur in axons at different maturation stages.

Both, the number and identity of the RNAs localized in axons undergo drastic changes. Less than 30% of the total RNAs identified in the axons were detected in all three stages analyzed. These RNAs mostly encodes proteins with functions related to cytoskeleton, mitochondria and translation. Since mitochondria is a key organelle for a wide variety of neuronal functions, and their dysfunctions are related to aging and neurodegenerative diseases, we focus on the study of RNAs encoding mitochondrial proteins. The aged axons had a lower number of RNAs coding for mitochondrial proteins, being the most affected those that fulfill functions in the inner mitochondrial membrane or the mitochondrial matrix.

These results show for the first time the age-related changes in the repertoire of RNAs localized in *in vivo* peripheral motor axons. Additionally, it is also shown that gene expression in medullary ventral roots change across the maturation and aging, and these differences occur mainly in genes involved in immune and inflammatory response, cell proliferation and ion channels. Overall, these results provide important bases for future studies that seek to correct the impairments that occur in the normal aging of peripheral nerves, as well as in neurodegenerative diseases.

Introduction.

Aging is a developmental biological process, which implies functional changes ranging from the cellular to the systemic level. Particularly, age-related changes in the nervous system are multiple and important, affecting both central and peripheral systems. In humans, after the sixth decade of life there is a dramatic increase in the probability of developing neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's, Parkinson's and amyotrophic lateral sclerosis, being aging the most important risk factor for its development (reviewed in Mattson & Magnus, 2006; Reitz et al., 2011; Reeve et al., 2014). Interestingly, some changes observed in aged nervous system are common to those observed in neurological diseases (reviewed in Salvadores et al., 2017, Hou et al., 2019), suggesting that some mechanisms could be involved in both processes. Additionally, aging affects the integrity of the neuromuscular system, which connects the brain and skeletal muscles through motor neurons and neuromuscular junction (Rygiel et al., 2016). This process leads to loss of muscle mass and function, causing sarcopenia, leading in some cases to immobility and loss of autonomy (Visser & Schaap, 2011; Landi et al. 2012). While the causes of sarcopenia are not yet known in depth, it has become clear that both the muscle and the innervating nerve play important roles.

Functional, structural and biochemical changes in peripheral nerves related to aging have been reported. Studies performed in peripheral nerves of mouse demonstrated that most of those changes are not linear throughout life (Verdú et al., 2000). Until 6 months of age there is an increase in nerve action potential and nerve conduction velocity, indicating the existence of a long period of postnatal maturation of peripheral nerve fibers, affecting the fiber diameter and conduction velocity. From 6 to 12 months of age there is an apparent morphological stability of the nerve, followed by a period (from 12 to 20 months of age) where slight changes associated with aging are observed: the number and density of nerve fibers begin to decrease, the presence of myelin loops increases and several characteristics of progressive degeneration appear (Verdú et al., 2000). After 20 months of age, nerves show a general disorganization and a marked fiber loss. Furthermore, some morphologic parameters of myelinated nerve fibers were also altered, with a decrease in size, circularity and myelin thickness in aged animals (Verdú et al., 1996; Ceballos et al., 1999; Sakita et al., 2016), and the occurrence of onion bulb-like and collagen pockets derived from changes in Schwann cells (Ceballos et al., 1999). These alterations are probably due to downregulation of myelin structural genes (such as Mbp, Mpz, Pmp22 and Gjb1), downregulation of genes involved in sphingolipid metabolism and lipid transport (Melcangi et al., 1998, Melcangi et al., 2000; Verdier et al., 2012), as well as the partial state of de-differentiation between the steady

state and the repair state in response to injury that present the aged Schwann cells (reviewed in Painter, 2017). Other aging-related changes were described in non-neuronal cells, with a significantly increase in number of macrophages and mast cells in the endoneurium (Ceballos et al., 1999; Büttner et al., 2018). Additionally, it was reported that both nerve and muscle action potential and also nerve conduction velocity decrease with age (Verdú et al., 1996, Walsh et al., 2015).

At the neuronal level, it was described that axons degenerate as a result of normal aging and this feature is one of the earliest events that occurs in neurodegenerative diseases (Raff et al., 2002; Fischer & Glass, 2007; Burke & O'Malley, 2013; Kanaan et al., 2013; Salvadores et al., 2017). Axoplasms of peripheral nerve fibers of aged rats present an increase in vacuoles, degenerated mitochondria and lysosomes, likely leading to axon degeneration (reviewed in Verdú et al., 2000; Pannese, 2011). Moreover, fast and slow axonal transport falls dramatically with aging, affecting the transport of many cargoes in both direction (retrograde and anterograde) (Milde et al., 2015; reviewed in Adalbert and Coleman, 2013). This age-related decline of axonal transport could predispose to a range of age-related disorders or even cause some, since this impairment is clearly established as a cause of some neurodegenerative conditions (reviewed in Coleman, 2011).

Since there is an extensive loss of axons during normal aging that precedes the loss of neuronal cell bodies (Spencer & Ochoa, 1981; Chung et al., 2017), it is interesting to understand the molecular basis involved in the development, maintenance and aging of axons. In the last decade, significant advances have been made regarding the contribution of RNA localization and local protein synthesis in axonal physiology (reviewed in Glock et al., 2017; Cioni et al., 2018; Farias et al., 2019). Particularly, two of these studies were focused on characterizing the composition of the pool of transcripts present in growth cone (Zivraj et al., 2010) or axon (Gumy et al., 2011) during development. The study of mRNAs located in growth cones of retinal ganglion cell (RGC) of Xenopus in stages of "pathfinding" (young, stage 32) or "target-arriving" (old, stage 40) revealed that the number and complexity of transcriptome increases dramatically with age. The authors state that the localization of mRNA in growth cones is dynamically regulated with age, adapted to the functional demands of the growing axon tip as it transforms into the presynaptic terminal (Zivraj et al., 2010). The examination of axonal transcriptome from embryonic and adult stages of mouse dorsal root ganglion (DRG) allowed to determine that there are a similar number of localized transcripts in both stages. However, it was observed a significant change in the identity of the localized mRNAs. This suggests that, although the repertoire of localized mRNAs changes,

the overall ability to transport axonal mRNAs does not change during development into adulthood (Gumy et al., 2011). Additionally, a recent work described the translatome of terminal axons of RGC *in vivo* at different time points during the assembly of visual circuits, including adulthood. One of the main findings was that the axonal translatome is composed of two components, one constitutive and the other specifically regulated according to the needs of each stage (Shigeoka et al., 2016).

It should be noted that the vast majority of axonal transcriptomic or translatomic studies were performed in axons grown *in vitro* (reviewed in Farias et al, 2019), being scarce the information on what happens in *in vivo* axons. In order to characterize the transcriptome of fully differentiated motor axons, our group modified the axon micro-dissection technique, developed originally by Koenig (1979), to obtain pure axoplasm derived from lumbar ventral roots. In this way, we identify that the repertoire of RNAs detected in mature axons is lower in comparison with the described for *in vitro* data. Additionally, as well as in *in vitro* axons, the RNAs localized in mature axons are mainly enriched in mRNAs related to cytoskeleton, translation and oxidative phosphorylation (Farias et al., 2020).

Based on the results described above, in this work, our purpose was to investigate changes in the repertoire of RNAs localized in axonal domain of peripheral motor nerves as consecuence of aging. For these, we used the modified axon micro-dissection technique to isolate pure axonal RNAs from immature and aged lumbar ventral roots (Farias et al., 2020). Additionally, the transcriptome of the whole ventral root at each stage was also obtained. The results indicate that both the number and the repertoire of RNAs localized in motor axons present age-related changes. One part of the axonal RNA repertoire is identified in all the ages analyzed, which mainly includes RNAs encoding translation, cytoskeleton and mitochondria related proteins. On the other hand, stage-specific RNAs were identified at each stage. The aged axons presented a smaller relative number of RNAs coding for mitochondrial proteins, mainly depleting those that encode proteins of the mitochondrial matrix and internal membrane. Finally, the age-related changes that occur in the micro-environment of motor axons (lumbar ventral roots) were studied. In the elderly, an activated inflammatory response was identified, as well as changes in the expression level of genes related to the lipid metabolism. In summary, this study showed for the first time the agerelated changes in the repertoire of RNA localized in peripheral motor axons. These results provide important bases for understanding the axonal processes that occur in the normal aging of peripheral nerves, which could also occur in neurodegenerative diseases.

Results.

Axon micro-dissection technique allows the isolation of pure axoplasm from myelinated motor axons of different developmental stages of peripheral nerve.

In a previous work, we characterized the repertoire of RNAs that reside in axoplasm of fully differentiated peripheral motor axons derived from adults rats (10 months old, 10MO axons) (Farias et al., 2020). To achieve this, we modified the axon micro-dissection technique, originally developed by Koenig (1979) and used by our group for the *in situ* characterization of *in vivo* axons components (Koenig et al., 2000; Sotelo-Silveira et al., 2004; Kun et al., 2007; Sotelo-Silveira et al., 2008; Calliari et al., 2014). The modified technique allowed us to obtain highly pure axoplasm samples to perform the analysis of the axonally localized transcriptome (Farias et al., 2020). Using the same axonal micro-dissection method, in the present work, we study if RNAs localized in axons vary during maturation and aging of the nerve. We obtained transcriptomes in two defined time points of motor nerves: immature (2 months, 2MO axons) and old/elderly (24 months, 24MO axons), to study them comparatively. Transcriptome of the whole medullary ventral root of each stage were also obtained (2MO ventral roots and 24MO ventral roots), serving as a point of comparison for quality analysis.

RNA-seg analysis of axoplasm samples detected 2470 genes in 2MO axons and 2353 genes in 24MO axons. Moreover, 12059 and 12380 genes were detected in 2MO and 24MO ventral roots, respectively. In order to know the performance of the axon micro-dissection technique in these samples, we performed quality control previously developed in our initial characterization of RNA extracted from 10MO axon (Farias et al., 2020). The number of genes detected in axoplasm samples was significantly less than the number of genes detected in ventral roots. The vast majority of genes detected in the axons samples were also detected in whole tissue of the same stage (Fig. 1A-B). The saturation plots showed that saturation was achieved globally and in the protein coding category in both types of samples (Fig. 1C-D), suggesting that there were no biases in library preparation. In order to demonstrate that the genes detected in the axoplasm samples were not the most abundant of the ventral roots we analyzed the abundance of genes detected at each stage as a function of gene position (ranking) in the axoplasm sample. The pattern obtained indicates that not all genes detected in axons have high expression in the ventral roots. Moreover, axonal genes not detected in the ventral roots did not necessarily show low abundance in axons (Fig. 1E-F). This suggests that RNAs detected in the axoplasm samples is not due to a mere dilution of the most abundant RNAs of the ventral roots. By focusing on the

mRNAs coding for myelin constitutive proteins (such Mbp, Pmp2, Pmp22, Mpz, S100b), it could be seen that axoplasm samples are partially depleted of them. On the other hand, it was observed that neuronal markers (Nefl, Nefm, Nefh) increase their abundance in axoplasm samples (Fig. 1E-F). Additionally, we confirm the degree of purity of the axoplasm samples by performing a molecular quality control implemented previously. This consists in a relative quantification of mRNAs coding glial (Mbp, Pmp22, Mag) and neuronal (Nefl, Nefm, Nefh) markers in unamplified RNA of biological replicates of axoplasm and ventral root samples by RT-qPCR (Farias et al., 2020). The 2MO axons sample showed a great decrease in the abundance of glial markers in comparison with the 2MO ventral root sample, which range from 8-fold for Mbp and more than 24fold for *Pmp22* and *Mag* (Fig. 1G, relative abundance expressed in log2: *Mbp*: 22.333 ± 0.681 and 25.467 ± 0.451; *Pmp22*: 19.500 ± 0.458 and 24.133 ± 0.702 and *Mag*: not detectable and 14.233 ± 0.702; in axoplasm and ventral root sample, respectively). Meanwhile, neuronal markers increase their abundance in 2MO axons sample in comparison with 2MO ventral root sample more than 18-fold (**Fig. 1G**, relative abundance expressed in log2: Nefl: 25.133 ± 0.569 and 14.867 ± 0.569 0.551; Nefm: 19.767 ± 0.833 and 15.533 ± 0.569 and Nefh: 14.667 ± 0.451 and not detected; in axoplasm and ventral root samples, respectively). On the other hand, the 24MO axons sample also showed a decrease in the abundance of glial markers of more than 4-fold (Fig. 1H, relative abundance expressed in log2: *Mbp*: 21.667 ± 0.513 and 23.467 ± 0.351; *Pmp22*: 18.833 ± 0.603 and 20.700 ± 0.529 and Mag: not detectable and 13.033 ± 0.902; in axoplasm and ventral root sample, respectively). The increase in the abundance of neuronal markers was observed in the 24MO axons samples too, ranging from 7-fold for Nefm and more than 22-fold for Nefl and Nefh (Fig. 1H, relative abundance expressed in log2: Nefl: 22.100 ± 0.59 and 17.533 ± 0.551 ; Nefm: 20.467 ± 0.569 and 17.600 ± 0.458 and Nefh: 10.167 ± 0.0751 and not detected; in axoplasm and ventral root samples, respectively).

These results showed that axoplasm samples possess low glial components but contain mainly neuron-specific mRNAs. Therefore, we can affirm that the modified axon micro-dissection method is a useful technique to obtain axoplasms derived from peripheral nerves of different stages.

Aging modifies the repertoire of RNAs localized in in vivo axons.

To assess the maturation and aging-related changes in the repertoire of RNA located in axons we compared the RNAs detected in the axoplasm samples of 2MO axons and 24MO axons with those previously described in 10MO axons (Farias et al., 2020). The number of RNAs detected in

the axoplasm samples varies significantly, decreasing in the fully differentiated axon (10MO), while the immature (2MO) and aged (24MO) axon samples displayed a greater number of localized RNAs, and similar between both samples. However, the RNAs detected in the ventral roots samples showed little change over the periods examined (**Fig. 2A, Table S1**). In addition, axons also showed a great variation in the repertoire of RNAs located in each stage analyzed. The comparison showed that immature, mature and aged axons shared only 401 RNAs. Additionally, 1286 RNAs were detected exclusively in the 2MO axons sample, 340 RNAs in the 10MO axons sample and 1223 RNAs in the 24MO axons sample (**Fig. 2B**). Both the variation in the number of RNAs localized, and the variation in their identity is in agreement with the data reported in two previous studies (Gumy et al., 2011; Shigeoka et al., 2016).

Given the great differences found in the repertoire of RNAs located in axons of different ages, we focused on the analysis of the underlying biological processes in these axons. To achieve this, we performed a Gene Ontology (GO) analysis to identify the biological process terms most significant to each axon data set, using the genes detected in each axon sample as target lists and the total number of genes detected in axons and ventral roots samples in all the stages studied as background (14301 genes, **Table S1**). Most of the enriched GO terms are shared by the three stages studied, although it was possible to find some differences. The transcriptome of immature and mature axons were highly enriched with cellular metabolic process GO terms related to protein synthesis, including "translation", "peptide metabolic process", and "amide biosynthetic process". While these categories were also enriched in the transcriptome of aged axons, the most enriched correspond to terms related to "cellular component organization" (Fig. 2C, Table S2). When performing the analysis using 575 neuron-related GO terms (Table S2), it was observed that immature axons are enriched in peripheral nervous system development GO terms, including "Schwann cell development" and "Schwann cell differentiation". On the other hand, mature axons are enriched in terms related to peripheral nervous system neuron development and differentiation, and neuronal action potential propagation, while aged axons are enriched in terms related to axon development, including "axon development" and "axonogenesis" (Fig. 2C, Table S2). An interesting category that is enriched (and marginally significant) in aged axons is the neuroinflammatory response, in which the RNAs of Lrrk2, Igf1, Psen1, Nr1d1, Nampt, Ifngr1, Jun and Atm are localized (Table S2). The presence of these RNAs could be related to a neuron response to degeneration that occurs during normal aging, both in the neuron itself and also in the surrounding Schwann cells. Additionally, we found it interesting to analyze the ontology of the unique RNAs of each stage. Surprisingly, we found that the GO terms enriched in these data sets were very similar to each other (Table S2). This suggests that the local synthesis of proteins in the

axon would be supporting/complementing the same functions with new proteins throughout development, but changing the identity of locally synthesized proteins.

Therefore, these results show that the repertoire of RNA localized in axoplasm changes during maturation and aging of the nerve, although many biological processes are enriched in all stages.

Shared RNAs through ages belong to core functions mainly related to translation, cytoskeleton and mitochondria.

As noted above, when the identity of the RNAs located in axons is compared throughout the samples, it was observed that only 401 RNAs were present in axons of the three ages studied (Fig. 2B). The protein-protein interaction (PPI) network of these genes was enriched in interactions (nodes= 276, edges=2525, average node degree=18.3, PPI enrichment p-value < 1.0E-16), indicating that the nodes were not random and that the observed number of edges is significant (Fig. 3A). The result showed three clusters formed by highly connected protein nodes, which combine proteins related to translation (GO:0006412, 4.30E-29), mitochondria (GO:0005739, 1.62E-10) and cytoskeleton (GO:0005856, 4.15E-08), being these some of the terms enriched in the GO analysis. The analysis of the position occupied by the 401 common RNAs in axons of different ages in the expression ranking showed that they have high, medium and low abundances, although a large proportion (73% for axons 2MO, 59% for axons 10MO and 76% for axons 24MO) is above the middle-ranked of each sample (Fig. 3B). Although these RNAs are present in all samples, we identify some cases where there is a large change in their position. RNAs encoded by mitochondrial DNA were located in the first 60 positions in all samples (Fig 3C, red lines), except for *Mt-nd3* RNA, which change its ranking from 36 in 2MO, to 61 in 10MO and to 138 in 24MO (Fig. 3C, arrow 1). In turn, there were changes in the ranking of RNAs coding for mitochondrial proteins encoded by nuclear DNA, such as Ndufb (ranking 46 in 2MO, 75 in 10MO and 1040 in 24MO, Fig. 3C arrow 2) and Cox8a (ranking 1432 in 2MO, 361 in 10MO and 375 in 24MO, Fig. 3C arrow 3). In the case of RNAs coding for ribosomal proteins, we identified Rpl21 RNA, which its ranking decreases as age increase (ranking 92 in 2MO, 247 in 10MO and 794 in 24MO, Fig. 3D arrow 1) and Rpl26 RNA, which its ranking increases as the axon ages (ranking 2068 in 2MO, 613 in 10MO and 145 in 24MO, Fig. 3D arrow 2). Finally, we highlight two examples of RNAs coding for cytoskeleton-related proteins. The Nefh RNA ranking decreases as age

increases (ranking 182 in 2MO, 735 in 10MO and 1596 in 24MO, **Fig. 3E** arrow 1), while the *Map4* ranking rises (ranking 1864 in 2MO, 188 in 10MO and 147 in 24MO, **Fig. 3E** arrow 2).

The presence of different amounts of RNAs coding for cytoskeleton, translation and mitochondrialrelated proteins in axons of different stages of development was also described by Holt and collaborators in embryonic and adult DRG axons (Gumy et al., 2011), as well as in the axonal terminal translatome of RGCs derived from embryonic, postnatal and adult stages (Shigeoka et al., 2016), which indicate the localization and translation of this group of central genes in axons of different stages of development, even in adult axons.

Age-related changes in the axonal localized RNAs coding for mitochondrial proteins.

Mitochondria are essential organelles in all cells, but specifically important for many neuron functions, such as maintaining the resting potential and firing action potentials and neurotransmission on the pre and post synaptic sides, which are energetically expensive processes (Howarth et al., 2012). It is widely accepted that mitochondrial dysfunction is a general mechanism of aging and age-related diseases (reviewed in Lane et al., 2015), and its roles in aging are grouped in the mitochondrial theory of aging, a variant of the theory of free radical aging (Loeb et al., 2005). Given the large number of mitochondria in axons and the fact that are involved in a large number of axonal processes, we wonder if during the maturation and aging of peripheral nerve there are changes in the mRNAs localized in axons that codes for mitochondrial proteins. The percentage of mRNAs coding for mitochondrial proteins in relation to the total number of genes detected in axons changes during maturation and aging of the neuron. In immature axons, 12.3% of the RNAs detected in axons encodes mitochondrial proteins, while this number is the 14.2% in mature axons and less than 10% in aged axons (Fig. 4A, Table S3). Additionally, as axons age we observed a considerable decrease both in the relative or absolute number of mRNA coding for mitochondrial proteins located in the inner mitochondrial membrane (IMM) and in the mitochondrial matrix (Fig. 4A). The global GO analysis of the RNAs coding for mitochondrial proteins did not show large differences in enriched terms in the different ages (Table S3). Analyzing the identity of the RNAs coding for mitochondrial proteins it was observed that 71 of those RNAs were present in all three ages, while there was a large proportion of RNAs present only in one of the stages studied (Fig. 4B). The RNAs only present in immature axons were enriched in GO terms related to mitochondrial dynamics, identifying RNAs that code for key proteins in fission and fusion processes, such as *Fis1*, *Dnm1l*, *Bnip3*, *Mief1* and *Oma1* (reviewed in van der Bliek et al., 2013; Ni et al., 2015; Fu et al., 2019). On the other hand, mature axons were enriched in the GO term "*regulation of cellular response to oxidative stress*", identifying the mRNAs of key proteins such as *Sod2* (Kokoszka et al., 2001; reviewed in Flynn & Melov, 2013) and *Hspb1* (Arrigo, 2001) only in this stage. Finally, among the RNAs coding for proteins with mitochondrial-related functions located only in aged axons were some associated with the aging process, such as *Lrrk2* (Singh, et al., 2019), *Psen1* (Dixit et al., 2017; Sarasija & Norman, 2018).

These results showed that there is a change in the number and repertoire of mRNAs coding for proteins with mitochondrial function throughout the maturation and aging of the axon, thus changing the ability to synthesize them locally and possibly impacting mitochondrial function.

The micro-environment surrounding motor axons also presents age-related changes in its transcriptome.

In order to identify age-related changes that occur in the micro-environment of peripheral motor axons during the maturation and aging of the nerve, we analyzed the differential expressed genes (DEG) of immature (2MO), fully mature (10MO) and aged (24MO) medullary ventral roots. We identified 12059, 11334 and 12380 genes expressed in ventral roots of 2, 10 and 24 months, respectively. The identification of DEGs were performed through two comparisons. On the one hand, the 10MO versus 2MO samples were compared, looking for genes that change their expression when the nerve becomes fully mature. On the other hand, we compared the 24MO versus 10MO samples, searching for genes that change their expression when the nerve becomes aged. To understand the underlying biological processes in these differentiation, we carried out GO analysis of the DEGs (using all genes detected in samples as background, Fig. 5A-B). Nearly fifteen percent of the genes were differential expressed in fully mature nerves compared to the immature ones, 743 of these up-regulated and 970 down-regulated (Table S4). The most significant enriched GO terms in the DEGs were related to ion transport (including calcium and potassium ions) and cell cycle process (including terms related to the regulation of mitotic process) (Fig. 5A, Table S4). As can be observed in Figure 5A, z-score values for terms related to ion transport indicate a greater number of up-regulated genes than down-regulated genes associated with these categories. In contrast, the z-score values for terms related to cell cycle process indicate a greater number of down-regulated genes than up-regulated genes

associated with these categories (**Fig. 5A**). On the other hand, 2171 genes were differential expressed when comparing the aged with the mature ventral root (1341 up-regulated and 830 down-regulated) (**Table S4**). The GO terms related to immune and inflammatory response (including "immune system process" and its regulation, "inflammatory response" and its regulation, among others), lysosomes localization, lipid homeostasis, actin nucleation and proteoglycan metabolic process were among the most significantly (*p-value* < 0.01) (**Fig. 5B**, **Table S4**). The GO terms related to the inflammatory and immune response showed high z-score values (**Fig. 5B**), indicating that they were enriched in the up-regulated genes. This would suggest that these pathways are activated in the aged nerves. One of the terms enriched in down-regulated genes was "proteoglycan metabolic process", which could be related to the changes observed in the extracellular matrix of aged nerves (Esquisatto et al., 2014).

Hierarchical cluster analysis of all DEGs allowed us to observe the expression patterns of the genes throughout the period studied (from immature to aged nerve), identifying groups of genes that have stage-specific expression and others that were expressed at two of the three time points studied (**Fig. 5C**). Further co-expression analysis grouped the DEGs into six clusters (**Fig. 5D**). Clusters 1 to 3 grouped genes with stage-specific expression, while Clusters 4 to 6 grouped genes present in two of the three stages studied. Subsequently, we performed the ontological analysis of the genes grouped in each cluster (**Table S4**), highlighting some of the results. Cluster 3 (highly expressed RNAs in the aged sample) was enriched in GO terms related to immune response, cytokine production, and cell proliferation. Cluster 4, which groups highly expressed RNAs in immature and mature nerves, is enriched in GO terms related to the production of ATP, organization of the cytoskeleton and synapse. Meanwhile, Cluster 5, which groups genes highly expressed in mature and aged nerves, is enriched in the GO term aging.

These results allowed us to know the changes that occur in peripheral nerves throughout the development at a molecular level, which are in accordance with what was reported at the morphological and functional level. Immature nerves (2 months) express genes related to development, while the aged (24 months) express genes related to the immune and inflammatory response.

Discussion.

The effects of the aging process can be observed in all cells and tissues, but perhaps those produced in the nervous system become more important due to the severity of the age-related disorders and diseases that this system develops. While it is known that diseases that affect the central nervous system such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington taking an enormous personal and financial toll on those affected and their families, as well as for health services, age-related changes in the peripheral nervous system also affect the elderly frequently and contribute significantly to a decrease in the quality of life. Since the changes that occur in nerves due to aging are similar to those observed in neurodegenerative diseases (reviewed in Salvadores et al., 2017; Hou et al., 2019), it is interesting to understand the mechanisms that underlie both processes. In order to identify the possible transcriptomic changes that occur in axons at different stages of maturation and aging of peripheral nerves, we analyze RNAs localized in motor axons derived from immature and aged medullary ventral roots, and we compared them with the data of axons derived from mature ventral roots, previously obtained (Farias et al., 2020).

Both the results of the purity analysis of the axoplasm samples through RNA-seq data analysis (Fig. 1E-F) and by RT-qPCR of glial and neuronal markers (Fig. 1G-H) showed that the microdissection technique, modified previously by our group (Farias et al., 2020), works in a similar way in axons of different ages, maintaining the pureness of the axoplasm isolated. Although the 2MO and 24MO axons have fewer detected RNAs than cultured in vitro axons (reviewed in Farias et al., 2019), more than twice as many RNAs were detected in these samples as in the 10MO axons (Fig. 2A). Future analyzes are necessary to understand the difference in the number of RNAs localized in axons. In addition to the difference in the number of RNA localized in axons of different ages, there was a wide change in the repertoire of localized RNA. Only 401 RNAs were detected in axons of the three ages analyzed, and when comparing the axons of 2MO and 24MO it is observed that less than half of the RNAs are detected in both samples (Fig. 2B). These findings are in accordance with the results of Gumy and collaborators, who found that embryonic and adult DRG axons contain a significant number of transcripts that are unique to each developmental stage (Gumy et al., 2011). Shigeoka and collaborators went a step further, analyzing the mRNAs that were being translated into the axonal terminals of RGC at different times during the assembly of the visual circuits, including adulthood. They reported that axonal translatome has extensive regulation throughout development, with only 27% of mRNAs translated at all stages (Shigeoka et al., 2016). In our case, changes in the repertoire of RNAs localized in the axons over time were reflected in some differential enriched GO terms (Fig. 2C, Table S2). Analyzing "neuronal" GO

terms (see material and methods) it was observed that the 2MO sample is enriched in RNAs associated with terms related to development of the Schwann cell. This could be in accordance with the maturation process that is occurring in the peripheral nerve at this age, which affects both the diameter of the fiber and the conduction velocity (Verdú et al., 2000; Sakita et al., 2016). On the other hand, 24MO axons possess an enrichment in terms such as "axon development" and "axonogenesis". This could indicate an activation of axonal growth pathways in aged axons, supporting locally the compensatory axonal sprouting documented in the neuromuscular junction of adult individuals (Siu & Gordon, 2003; Jang & Van Remmen, 2011; Kwon & Yoon, 2017; Taetzsch & Valdez, 2018). However, when analyzing the ontology of the unique RNAs of each stage studied, we observe that they were practically enriched in the same GO terms as observed for all the RNAs for each age. This could indicate that the transport of RNAs, in combination with the local protein synthesis, would be supporting/complementing the same functions, but with a different repertoire of mRNAs depending on the stage. Focusing on common RNAs present in axons of different ages, we observed that the vast majority of them encode translation, cytoskeleton and mitochondria related proteins (Fig. 3A). This group of core genes present in axons of different ages was also previously observed by our group when comparing axons from different types of neurons and under different growth conditions (in vitro vs in vivo) (Farias et al., 2020). Although this group of genes was present in all stages studied, we observed that the ranking occupied by some of these RNAs changes markedly as the axon ages (Fig. 3C-E). This could indicate a regulation of the expression of these genes, at least at the level of transport and axonal localization. Together, these findings are in line with the work of Shigeoka and collaborators (2016), where it is proposed that the axonal translatome is composed of two components: a constitutive translatome, coding for translation, cytoskeleton, and mitochondria related proteins; and other stage-specific, which encodes proteins necessary for the functions to be fulfilled at that particular stage.

Additionally, we analyze if there were changes in the repertoire of axonal RNAs coding for mitochondrial proteins, since this is a key organelle for a wide variety of neuronal functions (Howarth et al., 2012), as well as its dysfunction is related to several neurodegenerative diseases (reviewed in Lane et al., 2015). The percentage of RNAs coding for mitochondrial proteins decreases in aged axons, being the axonal localization of RNAs coding for proteins that fulfill functions in the mitochondrial matrix and inner mitochondrial membrane the most affected (**Fig. 4A**). Immature axons had a set of RNAs encoding mitochondrial proteins related to mitochondrial fission and fusion, and these GO terms were not enriched in the other two ages. The latter could indicate a mismatch in mitochondrial dynamics, which leads to mitochondrial dysfunction. On the

other hand, among the RNAs coding for mitochondrial proteins present only in aged axons, some of them are related to the aging process, such as *Lrrk2* and *Psen1* (Dixit et al., 2017; Sarasija & Norman, 2018; Singh, et al., 2019). When these proteins show alterations, mitochondrial dysfunction occurs at various levels (higher oxidative stress, reduced mitochondria membrane potential and decreased ATP production, mitochondrial DNA damage, elongated mitochondria, mitochondrial fragmentation, mitophagy) (Sarasija et al., 2018; Singh, et al., 2019). The axonal location of these mRNAs in aged axons, and their local synthesis, could serve as a replacement mechanism for their damaged peers, impacting against mitochondrial dysfunction. On the other hand, the change in heir abundance could be also impacting in the generation of dysfunction in itself.

Morphological and functional age-related changes of peripheral nerves include: decrease in the number of myelinated fibers, decrease in fiber caliber, decrease in conduction velocity, as well as axonal degeneration (Ceballos et al., 1999; Verdú et al., 2000; Walsh et al., 2015). Additionally, it has been described that nerve regeneration fails in aged peripheral nerves (Kerezoudi & Thomas, 1999; Verdú et al., 2000; Painter et al., 2014; Scheib & Höke, 2016; Büttner et al., 2018). Recent data indicate that this failure is mainly due to the state of de-differentiation of the Schwann cell and not to a diminished neuronal growth responses (Painter et al., 2014; Scheib & Höke, 2016). In order to identify the transcriptomic changes that occur in the micro-environment of motor axons throughout the maturation and aging of the nerve, we analyze the transcriptome of 2MO, 10MO and 24MO ventral roots samples. In the nerve maturation process (10MO vs. 2MO), overexpression of genes related to ion transport, both potassium and calcium, is observed (Fig. 5A). Maturation of the peripheral nerves occurs until 6 months of age in rodents, where an increase in nerve conduction velocity is observed (Ceballos et al., 1999; Verdú et al., 2000; Walsh et al., 2014). Although it is suggested that this is mainly due to the increase in the thickness of myelin sheaths of myelinated fibers (Waxman, 1980; Ikeda & Oka, 2012), it is possible that the differential expression of some ion channels could play a role in the increase of the conduction velocity of unmyelinated fibers, as observed for the Drosophila giant fiber escape circuit (Kadas et al., 2019). In the aged nerves, an increase in the expression of genes associated with immune and inflammatory responses was observed (Fig. 5B). Several studies have reported an increase in the infiltration of immune system cells in aged nerves (Ceballos et al., 1999; Verdier et al., 2012; Büttner et al., 2018), as well as an increase in cytokine expression (Büttner et al., 2018). In turn, GO terms related to lipid homeostasis were enriched in the DEGs, which is in line with the decrease in gene expression related to lipid metabolism in mice peripheral nerves (Verdier et al., 2012). When analyzing the variations in the expression levels of the differential expressed genes

over the period studied, six expression patterns are observed, presenting some groups stagespecific expression (**Fig. 5C-D**).

Taking together, this study showed for the first time the age-related changes in the repertoire of RNAs localized in peripheral motor axons. Additionally, it was also shown that gene expression in medullary ventral roots change across the maturation and aging, and these differences occur mainly in genes involved in immune and inflammatory response, cell proliferation and ion channels. Therefore, these results provide new insights that lay new ground for future studies that seek to correct the impairments that occur in the normal aging of peripheral nerves, as well as in neurodegenerative diseases.

Materials and methods.

Animals.

Sprague–Dawley male adult rats of 2 and 24 months were obtained from the animal facility at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay), maintained on a 12-h light/dark cycle, with food and water provided *ad libitum*. All experimental procedures were conducted in strict accordance with the Institution's Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA-IIBCE) under law 18.611 of the República Oriental del Uruguay. The specific protocol was approved by the CEUA-IIBCE (experimental protocol N°005/05/2012). The animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of 100 mg/Kg ketamine and 20 mg/Kg xylazine, and then euthanized by decapitation.

Isolation of axoplasmic whole-mounts from myelinated ventral root fibers.

Isolation of axoplasmic whole-mounts was performed according to (Farias et al., 2020). Briefly, lumbar spinal ventral roots were dissected from euthanized rats. The tissue was suspended in a modified gluconate-substituted calcium-free Cortland salt solution (Koenig and Martin, 1996) containing 132 mM Na-gluconate, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM glucose, 3.5 mM MgSO4, and 2 mM EGTA, pH 7.2, stored at 4°C. A ventral root, 3–5 mm, was immersed in a solution of 30 mM zinc acetate, 0.1 M Tricine, pH 4.8, for 10 min for denaturation. Then, it was transferred to a 35 mm plastic culture dish containing an axon "pulling" solution in which axoplasm was translated out of its myelin sheath with a pair of micro-tweezers #5. The "pulling" solution contained 40 mM aspartic acid, 38 mM Tris, 1 mM NaN3, and 0.02% Tween 20 to reduce surface tension, pH 5.5. The pulling generates a spray of axons (about 30 axon segments) that can be condensed into a bundle, being easier to process in further steps. Each spray was condensed into a compact bundle by briefly drawing the spray out of solution except for one end. By drawing the bundle in and out of solution several times we eliminate the remaining pieces of myelin on the surface of the axon. Isolated axoplasmic whole-mounts bundles were attached with the aid of eyebrow hair tools to a coverslips coated with 1% (3-aminopropyl)triethoxysilane (Sigma-Aldrich) in ethanol. The tissue that remains still at the end of the spray was removed by a scalpel. Additionally, three washes with fresh "pulling" solution were performed to further decrease any possible contamination. The isolated axoplasmic whole-mounts were removed from the coverslip with the aid of eyebrow hair tool, placed in the cap of an eppendorf 1.5 mL tube in 20 ul of "pulling" solution and stored at -80°C until RNA extraction were performed.

RNA extraction from axoplasm whole-mount.

For axoplasmic samples, RNA extraction was performed with RNAqueous[™]-Micro Total RNA Isolation Kit (Ambion, Invitrogen, ThermoFisher Scientific), a kit designed to obtain RNA from as little as 10 laser capture microdissected sections. First, axoplasm samples were centrifuged at maximum speed, and the buffer was removed very carefully. Five axoplasm samples from different animals were pooled before RNA extraction to reach the minimal input amount of linear amplification kit (500 pg). Briefly, 100 ul of lysis buffer was added to the pellet of axoplasms and incubated at 42°C for 5 minutes. Then, 3 ul of LCM additive and 129 ul (1.25 volumes) of 100% ethanol was added to the mixture to recover large and small RNAs. The lysate/ethanol mixture was loaded onto a Micro Filter Cartridge Assembly and centrifuged for 1 min at 10000xg. Afterward, 180 ul of Wash Solution 1 was added, and the mixture was centrifuged again for 1 min at 10000xg. Wash Solution 2/3 (180 ul) was added, and the mixture was centrifuged for 30 sec at 13000xg and repeated the wash one more time. The flow-through was discarded and the Micro Filter Cartridge was centrifuged for another minute at 13000xg to dry the filter. The Micro Filter Cartridge was transferred into a Micro Elution Tube, and 8 ul of preheated Elution Solution was added. The mixture was left at room temperature for 5 min and then centrifuged for 1 min at 13000xg. Subsequently, the treatment with DNase was made, adding 1/10 volume of 10X DNase I Buffer and 1 uL of DNase I, and incubating the DNase reaction for 5 min at 37°C. For the DNase inactivation, 1/10 volume of DNase Inactivation Reagent was used. After centrifuging the reaction 1.5 min at maximum speed to pellet the DNase Inactivation Reagent, the RNA was transferred to a fresh RNase-free tube and stored at -80°C until further processing.

RNA extraction from ventral root samples.

The RNA from ventral roots were obtained using TRI Reagent (Sigma-Aldrich), following the recommendations of the manufacturer. Quality and quantity of RNA was evaluated using spectrophotometry (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) and fluorimetry (Qubit 2.0 and RNA HS Assay kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Five ventral root samples were pooled and diluted to 500 pg. Following that, a second step of RNA extraction (with RNAqueousTM -Micro Total RNA Isolation Kit) were performed as described above.

RNA-seq of micro-dissected axons and ventral roots.

RNA linear amplification. Both micro-dissected axons and ventral roots pools were subjected to RNA linear amplification using Ovation RNA-Seq System v2 (NuGEN, Tecan), following the

manufacturer's recommendations. Quality and quantity of the resulting double-stranded cDNA were evaluated by means of a 2100 Bioanalyzer (Agilent) and Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). *Sequencing.* Libraries were constructed and sequenced at BGI Genomics (Hong Kong), on Illumina HiSeq4000 platform.

RNA-Seq Data Processing and Analysis.

The raw reads were aligned to the rat reference genome (Rnor_6.0, GCA_000001895.4) using HISAT v2.0.5 (Kim et al., 2015). The mapped reads were assembled by StringTie v1.3.3b (Pertea et al., 2015, 2016) in a reference-based approach ("-e" option). The TPM (transcripts per million reads) method was used to normalize the gene expression in each sample, and lowly expressed (<1 TPM) genes were filtered. The python script "prepDE.py" was used to obtain the count values.

For saturation plot analysis the NOISeq R package was used (Tarazona et al., 2015). The graphics were performed using the following R packages: gplots for heatmap and venneuler (Wilkinson, 2012) for proportional Venn diagrams. For Venn diagram of several data sets, a web tool (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/) was used.

Functional annotation analysis were performed using the R package topGO v2.38.1 (Alexa & Rahnenfuhrer, 2019), using the Biological Process (BP) and Cellular Component (CC) GO terms from the database of genome wide annotation for rat, org.Rn.eg.db v3.8.2 (Carlson, 2019a). Transcripts detected in axoplasms samples were used as gene lists, and those detected in all the samples analyzed (including ventral roots and axoplasm samples) were used as background. Parent-Child algorithm associated with Fisher's statistical test was used. The Parent–Child algorithm measures over-representation conditional on annotations to the parent of any term (taking the graph structure of GO into account), whereas previous approaches (*term-for-term* approach) measure over-representation of each term in isolation. In the Parent-Child algorithm, the over-representation of a term is measured with respect to the presence of its parental terms in the set, resolving the problem that the *term-for-term* approach tends to falsely detect an over-representation of more specific terms below terms known to be over-represented (Grossman et al., 2007). A *p-value* < 0.05 was considered statistically significant. Statistically significant enrichment is annotated as follows: *: 5.0E-2 - 1.0E-05; **: 1.0E-05 - 1.0E-10; ***: 1.0E-10 - 1.0E-15; ****: < 1.0E-15 (**Fig. 2C**).

To perform a GO-based analysis for neuronal functions (**Fig. 2C**), we selected 575 neuron-related GO terms (**Table S2**) using the following criteria: all offspring GO terms (512 terms) of 'Neuron differentiation (GO:0030182)', all offspring GO terms (40 terms) of "Neuron death (GO:0070997)", all offspring GO terms (9 terms) of "Transmission of nerve impulse (GO:0019226)", and all offspring GO terms (19 terms) of "PNS development (GO:0007422)". The offspring GO terms were identified using the GOBPOFFSPRING function of GO.db v3.8.2 (Carlson, 2019b), an R package.

The protein-protein interactions (PPI) networks were performed with the stringApp (Doncheva et al., 2019) of Cytoscape (Shannon et al., 2003).

The list of mitochondrial proteins was obtained from MitoMiner database v4.0 (<u>http://mitominer.mrc-mbu.cam.ac.uk/release-4.0/begi</u>n.do, Smith & Robinson, 2019), using the Integrated Mitochondrial Protein Index (IMPI).

Differential gene expression between the three ventral roots samples were obtained by pairwise comparisons in chronological order (10MO vs. 2MO; 24MO vs 10MO). Differential gene expression analysis was conducted in R using the Bioconductor R-package edgeR v3.24.3 (Robinson et al., 2010; McCarthy et al., 2012). The input file was the list of counts, and cpm > 1 was used as the filtering criteria. Subsequently, normalization was performed, using the command "calcnormfactor". The biological coefficient of variation (BCV) was set manually at 0.4 as recommended in user guides for no replicates. Those genes with a TPM > 1, [Fold Change] > 2and p-value < 0.05 were considered differential expressed. Functional annotation analysis of the DEGs were performed using topGO. For easy visualization and understanding of the results, we used the *plotGODESeq* function (https://github.com/gambardella/plotGODESeq) in R. The inputs for the function plotGODESeq() are a file containing GO enrichment data, and a file containing differential gene expression data. The y-axis of the plot is the negative log of the Parent-Child pvalue (obtained with the topGO). The x-axis of the plot is the z-score, defined for a given GO term as follows: (n° genes up-regulated - n° genes down-regulated)/sqrt(n° genes up-regulated + n° genes down-regulated). The area of each bubble is proportional to the enrichment (n° observed genes/ n° expected genes). The color of the bubble refers to the average fold change of all the genes annotated with a given GO term. For the heatmap plot was used the R library pheatmap (scale = row, clustering method = average, distance row = correlation Pearson, cutree row=6). For the clusters analysis was used the R library TCSeq (algorithm = cmeans, k = 6, standarized = T, distance = euclidean).
RT-qPCR for quality control and validation of RNA-seq.

The quality control of the axoplasm samples were performed using biological replicates of both axoplasms and ventral roots samples, by RT-qPCR for three glial markers and three neuronal markers (Farias et al., 2020). For this purpose, RT-gPCR assays EXPRESS gPCR SuperMix (Life technologies, ThermoFisher Scientific) was used according to the manufacturer's instructions. All the reactions were performed in three biological replicas in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad). The cycle program used for all cases was 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 seg and 60°C for 1 min. The following primers were used for RT-gPCR: Nef-L, 5'-CCGGTTCTTCTCTCTAGGTCCC-3' and 5'-GTAGGAGGTCGAAAAGTACGGC-3'; Nef-M, 5'-AGTCGAGGCCCCCAAGCTCA-3' and 5'-CAGAGGCTGCCAATTCCTCTGC-3'; 5'-Nef-H. CCTAAGCAATGGCCCAGAG-3'and 5'-CCTCAAGCTGCCTCACCTTA-3': MBP. 5'-ACGGACACCCTTTCAAGTTCAC-3' 5'-GTGCCTGTCTATCCGCAGTG-3': 5'and Mag, GTGGAGCTGAGCGTCATGTAT-3' and 5'-GTGGAACACAGGATGGAGACTG-3'; Pmp22, 5'-5'-GAATTCCTGTTCCTGTTCTTCTGCCAGCTC-3' and AAGCTTGTAGATGGCCGCTGCACTCATC-3'.

Availability of data and materials.

The datasets supporting the results of this article are available at the Sequence Read Archive repository, Project ID: XXXX.

The supplementary Tables are available at the following link: <u>https://drive.google.com/drive/folders/1NEqMTea6u1kKnvesvJxkrTpX03UVJgLl?usp=sharing</u>

Acknowledgments.

This work was partially supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA). PhD fellowships awarded to Joaquina Farias (ANII: POS_NAC_2014_1_102151 and Comisión Académica de Posgrados (CAP, UdelaR)).

References.

Adalbert R, Coleman MP. 2013. Review: Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* **39**:90–108.

Alexa A, Rahnenführer J. 2019. Gene set enrichment analysis with topGO. *http://www.mpi-sb.mpg.de/~alexa Contents*.

Arrigo AP. 2001. Hsp27: Novel regulator of intracellular redox state. *IUBMB Life* **52**:303–307.

Bliek AM van der, Shen Q, Kawajiri S. 2013. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**:a011072.

Burke RE, O'Malley K. 2013. Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol* **246**:72–83.

Büttner R, Schulz A, Reuter M, Akula AK, Mindos T, Carlstedt A, Riecken LB, Baader SL, Bauer R, Morrison H. 2018. Inflammaging impairs peripheral nerve maintenance and regeneration. *Aging Cell* **17**:e12833.

Calliari A, Farías J, Puppo A, Canclini L, Mercer J a, Munroe D, Sotelo JR, Sotelo-Silveira JR. 2014. Myosin Va associates with mRNA in ribonucleoprotein particles present in myelinated peripheral axons and in the central nervous system. *Dev Neurobiol* **74**:382–96.

Carlson M. 2019. org.Rn.eg.db: Genome wide annotation for Rat. R version 3.2.8.

Ceballos D, Cuadras J, Verdú E, Navarro X. 1999. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat* **195**:563–576.

Chung T, Park J, Kim S, Montes N, Walston J, Höke A. 2017. Evidence for dying-back axonal degeneration in age-associated skeletal muscle decline. *Muscle and Nerve* **55**:894–901.

Cioni JM, Koppers M, Holt CE. 2018. Molecular control of local translation in axon development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* **51**:86–94.

Coleman M. 2011. Molecular Signaling. How Do Axons Die? Elsevier Inc. 185–217 p.

Dixit S, Fessel JP, Harrison FE. 2017. Mitochondrial dysfunction in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease and a novel protective role for ascorbate. *Free Radic Biol Med* **112**:515–523.

Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, Jensen LJ. 2019. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *J Proteome Res* **18**:623–632.

Esquisatto MAM, Aro AA de, Fêo HB, Gomes L. 2014. Changes in the connective tissue sheath of Wistar rat nerve with aging. *Ann Anat* **196**:441–448.

Farias J, Holt CE, Sotelo JRJR, Sotelo-Silveira JRJR. 2020. Axon micro-dissection and transcriptome profiling reveals the in vivo RNA content of fully differentiated myelinated motor axons. *RNA* 1–52.

Farias J, Sotelo JR, Sotelo-Silveira J. 2019. Towards Axonal System Biology: Genome Wide Views of Local mRNA Translation. *Proteomics* **19**:1900054.

Fischer LR, Glass JD. 2007. Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neurodegener Dis* **4**:431–442.

Flynn JM, Melovn S. 2013. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* **62**:4–12.

Fu W, Liu Y, Yin H. 2019. Mitochondrial Dynamics: Biogenesis, Fission, Fusion, and Mitophagy in the Regulation of Stem Cell Behaviors. *Stem Cells Int Vol* **2019**:9757201.

Glock C, Heumüller M, Schuman EM. 2017. mRNA transport & local translation in neurons. *Curr Opin Neurobiol* **45**:169–177.

Grossmann S, Bauer S, Robinson PN, Vingron M. 2007. Improved detection of overrepresentation of Gene-Ontology annotations with parent-child analysis. *Bioinformatics* **23**:3024–3031.

Gumy LF, Yeo GSHH, Tung Y-CCL, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, Lam BYHH, Twiss JL, Holt CE, Fawcett JW, Gumy LF, Fawcett JW, et al. 2011. Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA* **17**:85–98.

Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. 2019. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **15**:565–581.

Howarth C, Gleeson P, Attwell D. 2012. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**:1222–1232.

Ikeda M, Oka Y. 2012. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain Behav* **2**:382–390.

Jang YC, Remmen H Van. 2011. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* **46**:193–198.

Kadas D, Duch C, Consoulas C. 2019. Postnatal increases in axonal conduction velocity of an identified drosophila interneuron require fast sodium, L-type calcium and shaker potassium channels. *eNeuro* **6**:ENEURO.0181-19.2019.

Kanaan NM, Pigino GF, Brady ST, Lazarov O, Binder LI, Morfini GA. 2013. Axonal degeneration in Alzheimer's disease: When signaling abnormalities meet the axonal transport system. *Exp Neurol* **246**:44–53.

Kerezoudi E, Thomas PK. 1999. Influence of age on regeneration in the peripheral nervous system. *Gerontology* **45**:301–306.

Kim D, Langmead B, Salzberg SL. 2015. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* **12**:357–360.

Koenig E. 1979. Ribosomal RNA in Mauthner axon: implications for a protein synthesizing machinery in the myelinated axon. *Brain Res* **174**:95–107.

Koenig E, Martin R, Titmus M, Sotelo-Silveira JR. 2000. Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J Neurosci* **20**:8390–400.

Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, Wallace DC. 2001. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2278–2283.

Kun A, Otero L, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR. 2007. Ribosomal Distributions in Axons of Mammalian Myelinated Fibers. *J Neurosci Res* **85**:2087–2098.

Kwon YN, Yoon SS. 2017. Sarcopenia: Neurological Point of View. J Bone Metab 24:83.

Landi F, Liperoti R, Russo A, Giovannini S, Tosato M, Capoluongo E, Bernabei R, Onder G. 2012. Sarcopenia as a risk factor for falls in elderly individuals: Results from the ilSIRENTE study. *Clin Nutr* **31**:652–658.

Lane RK, Hilsabeck T, Rea SL. 2015. The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1847**:1387–1400.

Loeb LA, Wallace DC, Martin GM. 2005. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:18769–18770.

Mattson MP, Magnus T. 2006. Ageing and neuronal vulnerability. Nat Rev Neurosci 7:278–294.

McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* **40**:4288–4297.

Melcangi R., Magnaghi V, Cavarretta I, Martini L, Piva F. 1998. Age-induced decrease of glycoprotein Po and myelin basic protein gene expression in the rat sciatic nerve. Repair by steroid derivatives. *Neuroscience* **85**:569–578.

Melcangi RC, Magnaghi V, Martini L. 2000. Aging in peripheral nerves: regulation of myelin protein genes by steroid hormones. *Prog Neurobiol* **60**:291–308.

Milde S, Adalbert R, Elaman MH, Coleman MP. 2015. Axonal transport declines with age in two distinct phases separated by a period of relative stability. *Neurobiol Aging* **36**:971–981.

Ni HM, Williams JA, Ding WX. 2015. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol* **4**:6–13.

Painter MW. 2017. Aging Schwann cells: mechanisms, implications, future directions. *Curr Opin Neurobiol* **47**:203–208.

Painter MW, Brosius Lutz A, Cheng YC, Latremoliere A, Duong K, Miller CM, Posada S, Cobos EJ, Zhang AX, Wagers AJ, Havton LA, Barres B, et al. 2014. Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. *Neuron* **83**:331–343.

Pannese E. 2011. Morphological changes in nerve cells during normal aging. *Brain Struct Funct* **216**:85–89.

Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* **11**:1650–1667.

Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol* **33**:290–295.

Raff MC, Whitmore A V., Finn JT. 2002. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* (80-) **296**:868–871.

Reeve A, Simcox E, Turnbull D. 2014. Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev* **14**:19–30.

Reitz C, Brayne C, Mayeux R. 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **7**:137–152.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**:139–40.

Rygiel KA, Picard M, Turnbull DM. 2016. The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. *J Physiol* **594**:4499–4512.

Sakita M, Murakami S, Fujino H. 2016. Age-related morphological regression of myelinated fibers and capillary architecture of distal peripheral nerves in rats. *BMC Neurosci* **17**:17–39.

Salvadores N, Sanhueza M, Manque P, Court FA. 2017. Axonal degeneration during aging and its functional role in neurodegenerative disorders. *Front Neurosci* **11**:451.

Sarasija S, Norman KR. 2018. Role of presenilin in mitochondrial oxidative stress and neurodegeneration in caenorhabditis elegans. *Antioxidants* **7**:111.

Scheib JL, Höke A. 2016. An attenuated immune response by Schwann cells and macrophages inhibits nerve regeneration in aged rats. *Neurobiol Aging* **45**:1–9.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga N, Wang J, Ramage D, Ami N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* **13**:6.

Shigeoka T, Jung H, Jung J, Turner-Bridger B, Ohk J, Lin JQ, Amieux PS, Holt CE. 2016. Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits. *Cell* **166**:181–192.

Singh A, Zhi L, Zhang H. 2019. LRRK2 and mitochondria: Recent advances and current views. *Brain Res* **1702**:96–104.

Siu LT, Gordon T. 2003. Mechanisms controlling axonal sprouting at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* **32**:961–974.

Smith AC, Robinson AJ. 2019. Mitominer v4.0: An updated database of mitochondrial localization evidence, phenotypes and diseases. *Nucleic Acids Res* **47**:D1225–D1228.

Sotelo-Silveira J, Crispino M, Puppo A, Sotelo JR, Koenig E. 2008. Myelinated axons contain beta-actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation. *J Neurochem* **104**:545–57.

Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Cárdenas M, Koenig E, Sotelo JR. 2004. Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (periaxoplasmic ribosomal plaques) of myelinated axons. *J Neurobiol* **60**:187–96.

Spencer P, Ochoa J. 1981. The Mammalian Peripheral Nervous System in Old Age. In: Johnson JEJ, editor. Aging and Cell Structure, Springer, p 35–104.

Taetzsch T, Valdez G. 2018. NMJ maintenance and repair in aging. Curr Opin Physiol 4:57–64.

Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrà D, Pietro A Di, Nueda MJ, Ferrer A, Conesa A. 2015. Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res* **43**:e140.

Verdier V, Csárdi G, Preux-Charles AS De, Médard JJ, Smit AB, Verheijen MHG, Bergmann S, Chrast R. 2012. Aging of myelinating glial cells predominantly affects lipid metabolism and immune response pathways. *Glia* **60**:751–760.

Verdú E, Butí M, Navarro X. 1996. Functional changes of the peripheral nervous system with aging in the mouse. *Neurobiol Aging* **17**:73–77.

Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. 2000. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst* **5**:191–208.

Visser M, Schaap LA. 2011. Consequences of sarcopenia. Clin Geriatr Med 27:387–399.

Walsh ME, Sloane LB, Fischer KE, Austad SN, Richardson A, Remmen H Van. 2015. Use of Nerve Conduction Velocity to Assess Peripheral Nerve Health in Aging Mice. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci* **70**:1312–1319.

Waxman SG. 1980. Determinants of conduction velocity in myelinated nerve fibers. *Muscle Nerve* **3**:141–150.

Wilkinson L. 2012. Exact and approximate area-proportional circular venn and euler diagrams. *IEEE Trans Vis Comput Graph* **18**:321–331.

Zivraj KH, Tung YCLYCL, Piper M, Gumy L, Fawcett JW, Yeo GSHH, Holt CE. 2010. Subcellular Profiling Reveals Distinct and Developmentally Regulated Repertoire of Growth Cone mRNAs. *J Neurosci* **30**:15464–15478.

Tables.

Table S1. Transcriptome of ventral roots and mature motor axons. This table contains Gene_ID, Gene Name, Gene Description, and TPM (Transcript per Million) for Axons and Ventral Roots samples of the three stages studied. Data partially displayed in Figures 1, 2A and 2B.

Table S2. Gene Ontology (GO) terms enriched in immature, mature and aged motor axons transcriptomes. Data partially displayed in Figure 2C.

Table S3. RNAs coding for mitochondrial proteins detected in immature, mature and aged motor axons. Data partially displayed in Figure 4.

Table S4. Differential gene expression (DEG) of immature, mature and aged ventral roots. Contains the lists of DEG in the maturation and aging processes. The GO terms enriched in each comparison is also reported.

Figures and figure legends.



Figure 1. RNA-Seq analysis of immature and aged motor axons. A-B. Venn diagrams showing the number of detected genes in ventral root and axoplasm samples derived from immature (**A**) and aged (**B**) rats. **C-D.** Saturation plots of ventral root and axoplasm RNA-seq data derived from

immature (**C**) and aged (**D**) samples. Solid lines indicate the global saturation plot and dashed lines indicate the saturation for protein-coding genes. **E-F.** Relative abundance (log 2 TPM) of genes detected in axoplasm samples (blue dots) in function of their ranking in immature (**E**) and aged (**F**) samples. The abundance in ventral root samples is also shown (orange dots). The genes detected in axoplasm samples and not in ventral root samples are shown as a black lines. The position of some glial markers (*Mpz*, *Mbp*, *Pmp2*, *Pmp22* and *S100b*) and neuronal markers (*Nefl*, *Nefm* and *Nefh*) is indicated. **G-H.** Molecular quality control of purity of immature (**G**) and aged (**H**) axoplasm samples by RT-qPCR. Relative quantification of glial (*Mbp*, *Mag* and *Pmp22*) and neuronal markers (*Nefl*, *Nefm* and *Nefh*) in different axoplasmic and ventral root samples isolated from three individual animals.



Figure 2. Characterization of *in vivo* motor axons transcriptome throughout the maturation and aging of the nerve. A. Change in numbers of detected genes in ventral roots and axoplasm samples along maturation and aging of nerve. B. Comparison of the repertoires of RNAs detected in immature (2MO), mature (10MO) and aged (24MO) axons which shows the common and unique detected genes. C. Enriched GO (biological process) terms for axonal transcriptomes, sorted by significance for each stage (*p*-value = Parent-Child algorithm and Fisher's exact test). The enrichment was analyzed by topGO (Table S2). Color indicates the log2 of Fold enrichment. Statistically significant cells are marked as follows: *: 5.0E-02 - 1.0E-05; **: 1.0E-05 - 1.0E-10; ***: 1.0E-10 - 1.0E-15; **** < 1.0E-15.







Figure 4. Age-related changes in the localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in motor axons. **A.** Percentage of mRNAs coding for mitochondrial proteins in relation to the total number of RNAs detected in immature (2MO), mature (10MO) and aged (24MO) motor axons. The percentage of mRNAs encoding for mitochondrial proteins that fulfill functions in different mitochondrial domains in relation to the number of mRNAs coding for mitochondrial proteins is also shown. OMM: Outer mitochondrial membrane; Inter. space: Intermembrane space; IMM: Inner mitochondrial membrane; Matrix: Mitochondrial matrix. Mito-proteins: Mitochondrial proteins, Mito-domains: mitochondrial domains. **B.** Comparison of the repertoires of RNAs coding for mitochondrial proteins detected in immature (2MO), mature (10MO) and aged (24MO) axons. GO terms enriched, and genes related to them, in RNAs unique detected in each stage are shown.



Figure 5. Clustering analysis of all differential expressed genes (DEGs) in the ventral roots along peripheral nerve maturation (10MO vs 2MO) and aging (24MO vs 10MO). A-B. Enriched Gene ontology (GO, biological process) terms for DEGs in the maturation (A) and aging (B) of ventral roots. The enrichment was analyzed by topGO (Table S4). Y-axis represents Parent-Child *p-value* (-log10), and X-axis represents the z-score, defined for a given GO term as follows: (n°

genes up-regulated – n° genes down-regulated)/sqrt(n° genes up-regulated + n° genes downregulated). The area of each bubble is proportional to the Fold enrichment of the GO term and the color refers to the average fold change of all the genes annotated with a given GO term. **C**. Hierarchical clustering of all DEGs. TPM (transcript per million) was used to estimate the level of gene expression. The color change from yellow (highly expressed) to blue (low expression) represents the relative expression level value log2 (ratios). The membership of the gene to each of the clusters presented in D is indicated with colors. **D**. Co-expression analysis of all DEGs. Red, the high correlation between genes; yellow, the low correlation between genes. The numbers of DEGs in each cluster are displayed. The DEGs in each cluster are listed in Table S4.