

**PEDECIBA**

**Área Biología**

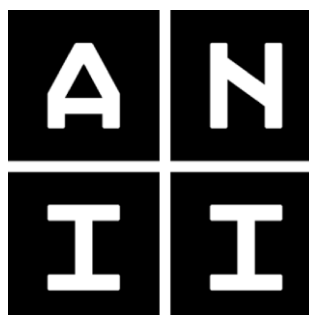
**Subárea Biología Celular y Molecular**

**Tesis de Doctorado**

**“Estudio de la localización, regulación  
e identificación de proteínas  
neo-sintetizadas en el axón”**

**Magister Andrés Di Paolo Forné**

**Diciembre, 2021**



**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas  
(PEDECIBA)  
Área Biología  
Subárea Biología Celular y Molecular  
Tesis de Doctorado**

***“Estudio de la localización, regulación e  
identificación de proteínas neo-sintetizadas  
en el axón”***

**Magister Andrés Di Paolo Forné  
Orientador. Dr. José Sotelo Sosa  
Co-orientadores. Dr. José Sotelo Silveira  
Dr. Federico Dajas Bailador**

**Tribunal  
Dr. Carlos Escande (Presidente)  
Dr. Leonel Malacrida (Vocal)  
Dra. Florencia Arredondo (Vocal)**

**Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

**Diciembre, 2021**

## **AGRADECIMIENTOS.**

*Esta tesis de doctorado resume una etapa de formación académica muy importante para mí en donde un gran número de personas permitieron el desarrollo de la misma, participando de las más diversas maneras. Seguramente esta sección no haga justicia a la importancia que todos ellos (y quizás algunos que no llego a mencionar) tuvieron en esta etapa.*

*Em primer término, agradezco al tribunal por una lectura crítica, enriquecedora y constructiva de esta tesis, brindando un entorno de discusión académica el cual valoro mucho.*

*Agradezco a mis padres y hermanos por apoyarme antes, durante y después de esta etapa de todas las formas que se me puedan ocurrir.*

*A mis amigos del DPAN (Ale, Carlitos, Marianita, Aldo, Karina) con quienes compartí los primeros años de formación y me ayudaron mucho en aquel entonces.*

*A mis amigos del Departamento de Genómica (Pablo, Rafa, Lucia, Lucas, “Chaveta”, Miguel, Martin, Valeria, Juan). Quisiera agradecer muy especialmente a Joaquina, con quien aprendí mucho, desarrollamos varios experimentos y tuvimos un sinfín de discusiones académicas, a Guille con quien formamos el “Team PDCD4” y a Joaquin por toda la ayuda, compañerismo y discusiones científicas que tuvimos y espero sigamos teniendo.*

*A Lucia Canclini por darme todas las herramientas y formación iniciales de mesada y formas de razonar para convertirme en un científico.*

*Al Boli por ser mucho más que un tutor, sino toda una fuente de inspiración sobre como pensar y sentir la ciencia dentro y fuera del laboratorio.*

*Al Coya por darme la oportunidad de desarrollarme como científico, por siempre estar ahí para apoyarme, bancar mis rabietas, felicitar mis logros y acompañarme en todo este largo trayecto.*

*A Federico Dajas y su laboratorio en Nottingham Inglaterra (Raquel, Cristiano, Alex, Alice) por recibirme como si fuera un compañero de toda la vida y lograr que hoy considere Inglaterra como mi segundo lugar en el mundo.*

*A Thomas Kislinger y todo su laboratorio de proteómica en Toronto, Canadá por apoyarnos en nuestros experimentos, permitirnos acceder a tecnologías de punta y brindar toda su calidez humana en mi corta estadía.*

*Más que agradecer, quiero darle una mención honorífica a mi esposa “Flopi” y mis dos hijos Nacho y Piero por enseñarme que es lo verdaderamente importante en la vida y bancarme la cabeza en todos los momentos, muy especialmente en las etapas de frustración y enojo que todos tenemos a lo largo de los años producto del estrés laboral y los resultados fallidos que son los que más abundan en esta carrera.*

*A todo aquel que tome este documento y pueda, aunque sea mínimamente, serle útil en alguna parte de su vida académica.*

## **Tabla de Contenidos.**

1) RESUMEN.	<b>8</b>
2) INTRODUCCIÓN.	<b>10</b>
2.1. La síntesis proteica local es una estrategia importante para el mantenimiento del proteoma axonal en neuronas.	<b>10</b>
2.2. Importancia de la localización de ARNm en los axones y sus principales mecanismos de regulación.	<b>14</b>
2.3. Participación de la vía mTOR en la regulación de la síntesis proteica local axonal.	<b>22</b>
2.4. Papel de los componentes río abajo de mTORC1 en regeneración axonal.	<b>25</b>
2.5. Posible participación de la proteína Pcd4 en la regulación de la síntesis proteica local y regeneración axonal.	<b>27</b>
2.6. Las Placas Periaxoplásmicas Ribosomales o “ <i>PARPs</i> ” como potenciales dominios axonales donde puede ocurrir la síntesis proteica local axonal.	<b>29</b>
2.7. Estudios transcriptómicos y proteómicos en axones.	<b>32</b>
2.8. Aportes de esta tesis al tópico de la síntesis proteica local axonal.	<b>35</b>
3) HIPÓTESIS DE TRABAJO.	<b>36</b>
4) OBJETIVOS.	<b>36</b>
4.1. Objetivo General.	<b>36</b>
4.2. Objetivos Específicos.	<b>36</b>
5) MATERIALES Y MÉTODOS.	<b>37</b>
5.1. Procedimientos quirúrgicos (Capítulos. I, II y III).	<b>37</b>
5.2. Protocolos de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica (Capítulos I y II).	<b>37</b>
5.3. Protocolo de Puro-PLA (Capítulos I y II).	<b>37</b>
5.4. Cuantificación y Análisis de Imágenes (Capítulos I y II).	<b>39</b>
5.4.1 Cuantificación de señal de fluorescencia para PURO-PLA.	<b>39</b>

5.4.2. Cuantificación de señales de fluorescencia de proteína total.	<b>47</b>
5.5. Cultivos celulares (Capítulo. II).	<b>47</b>
5.6. Protocolos de transfección (Capítulo. II).	<b>47</b>
5.7. PCR en tiempo real (Capítulo II).	<b>48</b>
5.8. Protocolo de extracción de proteínas del material axoplásmico obtenido mediante el método de Fainzilber y colaboradores (Capítulo III).	<b>48</b>
5.9. Protocolo de extracción de proteínas totales en nervios enteros (Capítulo III).	<b>50</b>
5.10. Protocolo de extracción de proteínas neo-sintetizadas en el axón mediante <i>BONCAT</i> (Capítulo III).	<b>51</b>
5.11. Protocolos de extracción de péptidos, MS/MS para obtener los proteomas de axón y nervio entero y los análisis estadísticos asociados (Capítulo III).	<b>52</b>
<b>6) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>53</b>
6.1) Capítulo I. Localización <i>in situ</i> de los sitios de neosíntesis del Neurofilamento Liviano en axones de nervio ciático <i>in vivo</i> mediante el sistema de PURO-PLA.	<b>53</b>
6.1.1) Introducción Capítulo I.	<b>53</b>
6.1.1.1. Fosforilación de los neurofilamentos.	<b>55</b>
6.1.1.2. Transporte de los neurofilamentos en el axón.	<b>56</b>
6.1.2) Resultados Capítulo I.	<b>59</b>
6.1.2.1. La puesta a punto del protocolo de Puro-PLA en nervios periféricos <i>in vivo</i> muestra que el mejor tiempo de incubación de puromicina es de 30 minutos a 300 uM de concentración.	<b>59</b>
6.1.2.2. La proteína Nefl es neo sintetizada en axones del nervio ciático de ratas adultas, no detectandose cambios significativos en el número de centros activos de traducción en las primeras horas post injuria.	<b>66</b>
6.1.3) Discusión Capítulo I.	<b>70</b>
6.2) CAPÍTULO II. La proteína Pdcd4 es capaz de regular el crecimiento axonal, es modulada durante procesos de regeneración <i>in vivo</i> y se sintetiza localmente en axones periféricos.	<b>74</b>
6.2.1) Introducción Capítulo II.	<b>74</b>

6.2.2) ARTÍCULO I. PDCD4 regulates axonal growth by translational repression of neurite growth-related genes and is modulated during nerve injury responses.	<b>76</b>
6.2.3) Resultados Capítulo II.	<b>105</b>
6.2.3.1. La proteína Pdcd4 se expresa en diferentes tejidos del sistema nervioso central y periférico de rata y ratón tanto en individuos adultos como en etapas del desarrollo embrionario.	<b>105</b>
6.2.3.2. La proteína Pdcd4 aumenta sus niveles de expresión cuanto mayores son los tiempos de cultivo <i>in vitro</i> en neuronas corticales “E16” de ratón.	<b>106</b>
6.2.3.3. La modulación específica de los niveles de expresión de PDCD4 en cultivos primarios de neuronas centrales y periféricas tiene un efecto represor sobre el crecimiento axonal <i>in vitro</i> .	<b>106</b>
6.2.3.4. Pdcd4 disminuye sus niveles de expresión en axones de nervio ciático regenerantes.	<b>110</b>
6.2.3.5. Pdcd4 es neo-sintetizado localmente en axones de raíces ventrales y nervio ciático <i>in vivo</i> y aumenta el número de centros traduccionales tras un evento de injuria. 6.2.3.4. Pdcd4 disminuye sus niveles de expresión en axones de nervio ciático regenerantes.	<b>110</b>
6.2.4) Discusión Capítulo II.	<b>116</b>
6.3) Capítulo III. Las proteínas ribosomales se encuentran enriquecidas en el proteoma axonal de nervios periféricos <i>in vivo</i> .	<b>120</b>
6.3.1) Introducción Capítulo III.	<b>120</b>
6.3.2) ARTÍCULO II. Rat sciatic nerve axoplasm proteome is enriched with ribosomal proteins during regeneration processes.	<b>123</b>
6.3.3) Resultados Capítulo III.	<b>142</b>
6.3.3.1. El protocolo para extracción de material axoplásmico muestra un enriquecimiento en la detección de proteínas axonales y una pérdida de las mielínicas.	<b>142</b>
6.3.3.2. El método de extracción de axoplasmas en buffer hipotónico puede ser utilizado en diferentes grupos de nervios periféricos.	<b>143</b>
6.3.3.3. El proteoma axonal del nervio ciático está enriquecido con proteínas relacionadas con citoesqueleto y proteínas ribosomales que aumentan tras la injuria.	<b>144</b>
6.3.3.4. Los grupos de proteínas detectados en axón han sido previamente reportados en proteomas axonales <i>in vitro</i> .	<b>145</b>
6.3.3.5. Se detectaron 42 proteínas neo-sintetizadas en axones mediante un protocolo de <i>BONCAT</i> combinado con proteómica cuantitativa basada en el sistema <i>LFQ</i> .	<b>146</b>

6.3.4) Discusión Capítulo III.	<b>146</b>
7) DISCUSIÓN GENERAL y PERSPECTIVAS	<b>152</b>
7.1. Localización <i>in situ</i> de proteínas neo-sintetizadas en axón.	<b>152</b>
7.2. Regulación de la traducción local en axones periféricos.	<b>154</b>
7.3. Identificación de las proteínas totales y las sintetizadas localmente en axones periféricos.	<b>156</b>
7.4. Futuro de la temática estudiada.	<b>158</b>
8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES.	<b>160</b>
9) ANEXOS	<b>181</b>
9.1) Anexo 1.	<b>181</b>
ARTÍCULO III. Functional Genomics of Axons and Synapses to Understand Neurodegenerative Diseases	<b>181</b>
9.2) Anexo 2.	<b>206</b>
<i>In vivo</i> Local Protein Synthesis in Peripheral Axons using Click iT Chemistry and Confocal Fluorescence Microscopy.	<b>206</b>
9.3) Anexo 3. Materiales y Métodos suplementarios del Artículo I: “PDCD4 regulates axonal growth by translational repression of neurite growth-related genes and is modulated during nerve injury responses”.	<b>209</b>

## 1) RESUMEN.

La síntesis proteica local en compartimentos subcelulares es un mecanismo importante para asegurar la homeostasis de células con un alto grado de polarización, como es el caso de las neuronas. En los últimos 10 años ha quedado en evidencia la importancia de la síntesis proteica local en el axón, principalmente en procesos relacionados con el crecimiento y regeneración axonal de nervios periféricos, analizados principalmente en modelos *in vitro*. A pesar de los avances surgidos entorno a estos procesos, poco se conoce aún sobre los dominios axonales donde ocurre la síntesis local, los mecanismos de regulación que gobiernan tales procesos y cuáles son las identidades de los ARNm neo-sintetizados, especialmente en axones maduros *in vivo*. En estos tópicos se enmarca mi tesis de doctorado la cual está dividida en tres capítulos, cada uno asociado a uno de los tres puntos previamente mencionados. En el capítulo I se estudia la localización *in situ* de los sitios de neosíntesis del Neurofilamento Liviano (NefL) en axones del nervio ciático de rata en estado basal y de regeneración, adaptando el sistema de PURO-PLA combinado con microscopía confocal de alta resolución óptica. En el capítulo II se demuestra el efecto inhibitorio del crecimiento axonal de la proteína *Programmed Cell Death 4* (Pcd4), un componente de la vía mTOR descrito como supresor tumoral y represor traduccional en diversos modelos de cáncer *in vitro* e *in vivo*. En el capítulo III se reporta el proteoma total y neo-sintetizado del axón de nervios ciático normal y lesionado en ratas adultas comparado con el proteoma del nervio ciático entero, donde se evidencia un enriquecimiento en las proteínas ribosomales en axones regenerantes. Los resultados obtenidos a partir de estos tres trabajos aportan datos novedosos en torno al estudio de la síntesis local de proteínas en axones *in vivo* a través de nuevas herramientas para su estudio *in situ* en modelos *in vivo*. Además, se introduce a Pcd4 como un nuevo actor en la regulación de los mecanismos de crecimiento y regeneración axonal y se generó una base de datos sobre qué proteínas están presentes en axones maduros, tanto en estado basal como tras un evento de lesión en nervios periféricos.



**La opción seleccionada para la presentación de esta tesis de doctorado ha sido realizar una introducción general a la temática, seguida de la hipótesis de trabajo y un listado de los objetivos general y específicos.**

**Los resultados obtenidos se han dividido en 3 capítulos, cada uno asociado a uno de los objetivos específicos. En cada capítulo se realizó una breve introducción seguida de una discusión y conclusiones específicas al mismo. Para los capítulos II y III, se presentan las comunicaciones científicas asociadas.**

**Finalizamos con una discusión y perspectivas generales a toda la tesis. Como anexos incluimos una revisión sobre el uso de las herramientas omicas para el estudio de axones y sinápsis publicada en una revista arbitrada, una breve comunicación científica producto de un congreso de microscopía y los materiales y métodos suplementarios del Artículo presentado en el Capítulo II. Los artículos científicos son referidos en el texto con el numeral romano correspondiente (I-III) y están listados a continuación.**

**I) Di Paolo, A., Eastman, G., Mesquita-Ribeiro, R., Farias, J., Macklin, A., Kislinger, T., Colburn, N., Munroe, D., Sotelo Sosa, J.R, Dajas-Bailador, F., Sotelo-Silveira, J.R. (2020). PDCD4 regulates axonal growth by translational repression of neurite growth-related genes and is modulated during nerve injury responses. RNA 26, 1637–1653.**

**II) Di Paolo, A., Farias, J., Garat, J., Macklin, A., Ignatchenko, V., Kislinger, T., Sotelo-Silveira, J.R. (2021). Rat Sciatic Nerve Axoplasm Proteome Is Enriched with Ribosomal Proteins during Regeneration Processes. Journal of Proteome Research. 20, 2506–2520.**

**III) Di Paolo, A., Garat, J., Eastman, G., Farias, J., Dajas-Bailador, F., Smircich, P., Sotelo-Silveira, J.R. (2021). Functional Genomics of Axons and Synapses to Understand Neurodegenerative Diseases. Frontiers in Cellular Neuroscience 15, 686722.**

**Previo a la presentación de cada artículo, se mencionan mis contribuciones específicas a los mismos.**

## 2) INTRODUCCIÓN.

### 2.1. La síntesis proteica local es una estrategia fundamental para el mantenimiento del proteoma axonal en neuronas.

La síntesis de proteínas es un proceso esencial del metabolismo celular y se encuentra finamente regulado en todos los tipos celulares. El control de la tasa traduccional de cada proteína, así como su localización subcelular son factores importantes para el correcto funcionamiento celular tanto en organismos eucariotas (Perry and Fainzilber, 2014; Bauer *et al.*, 2015; Sahoo *et al.*, 2018; Turner-Bridger *et al.*, 2020), como en procariotas (Nevo-Dinur *et al.*, 2011; Laloux and Jacobs-Wagner, 2014; Hu *et al.*, 2020). Del concepto de localización subcelular de los ARNm es que surge la importancia de la síntesis local de proteínas (de ahora en adelante, SPL) como estrategia para el mantenimiento del proteoma local en cada compartimento celular. La necesidad de SPL es notoria en células con un alto grado de polarización como es el caso de las neuronas, siendo un proceso extensamente evidenciado por diversos autores décadas atrás en dendritas (Palay and Palade, 1955; Bodian, 1965; Steward and Levy, 1982; Steward and Falk, 1986; Cáceres *et al.*, 1988), y axones (Koenig and Koelle, 1960; Koenig, 1967b, 1991; Giuditta *et al.*, 1968; Edström and Sjöstrand, 1969), encontrándose también revisiones recientes en la temática (Sotelo-Silveira and Holt, 2014; Rangaraju *et al.*, 2017; Sahoo *et al.*, 2018; Holt *et al.*, 2019; Dalla Costa *et al.*, 2021) y otras que muestran su relación con desórdenes del sistema nervioso (Fernandopulle *et al.*, 2021). Para el mantenimiento funcional de axones y dendritas es necesario la expresión local de proteínas específicas en los tiempos y sitios necesarios (Perry and Fainzilber, 2014; Sotelo-Silveira and Holt, 2014; Batista and Hengst, 2016; Spaulding and Burgess, 2017).

La SPL en dendritas ha sido demostrada en numerosos estudios *in vitro*, siendo un evento importante para la integridad y correcto funcionamiento de dicho compartimento (Bodian, 1965; Steward and Levy, 1982; Torre and Steward, 1992; Steward and Schuman, 2001; Tom Dieck *et al.*, 2014; Biever *et al.*, 2019; Holt *et al.*, 2019). La SPL en dendritas es ampliamente aceptada por la comunidad científica debido a la temprana detección de partículas ribosomales (Bodian, 1965) y posteriormente de polirribosomas (Steward and Levy, 1982; Steward and Falk, 1986) principalmente dentro de las espinas dendríticas (Steward and Levy,

1982; Cajigas *et al.*, 2012a; Kindler and Kreienkamp, 2012). Además de los estudios *in vitro* de SPL en dendritas, se han desarrollado trabajos concluyentes *in vivo* (Miller *et al.*, 2002; An *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2020) y es considerada un requisito para los procesos de plasticidad sináptica importantes para el correcto desarrollo cognitivo en mamíferos (Sutton and Schuman, 2005; Buffington *et al.*, 2014; Batista and Hengst, 2016; Kosik, 2016).

Sin embargo, demostrar la existencia de la SPL en axones fue un proceso más difícil. Alcanzar el consenso que actualmente mantiene gran parte de la comunidad científica sobre el hecho de que la SPL existe en axones (incluso en mamíferos) y que cumple un rol importante en el metabolismo neuronal, llevó un largo proceso de numerosos grupos de investigación, incluyendo el grupo científico en el que realicé esta tesis. Antes de continuar con el desarrollo de la misma, considero apropiado realizar un pequeño paréntesis mencionando algunos puntos relevantes que sin duda posibilitaron, al menos indirectamente, el desarrollo del presente trabajo.

### **2.1.1. Hitos en relación a la síntesis proteica local en axones.**

Las primeras evidencias de SPL axonal datan de los años sesenta cuando el grupo de Koenig y colaboradores analizaron las tasas de reposición de acetilcolinesterasa en regiones distales de axones de los nervios hipogloso y simpático de gato. Los datos sugerían que, dadas las velocidades del transporte reportadas, la fuente de esas proteínas no podría ser únicamente provenientes del soma neuronal (Koenig and Koelle, 1960). Una serie de cuidadosos estudios posteriores encabezados por el mismo autor analizando la misma proteína aportaron evidencias que sugerían la existencia de SPL axonal (Koenig, 1965a, 1965b, 1967a). Se llegaron a resultados aún más concluyentes tras identificar señal de neo-síntesis proteica en axones *in vitro* de conejo (Koenig, 1967b), calamar (Giuditta *et al.*, 1968) y pez dorado (Edström and Sjöstrand, 1969) mediante aminoácidos marcados radiactivamente. Sin embargo, la SPL axonal no fue aceptada ya que los primeros estudios por microscopía electrónica no identificaron ribosomas y polirribosomas en el dominio axonal (Weiss and Hiscoe, 1948; Palay and Palade, 1955; Lasek *et al.*, 1973). A raíz de estos resultados iniciales, varios autores concluyeron que la SPL axonal no existía, o en su defecto solo ocurría en las mitocondrias. Por tanto, el recambio de las proteínas axonales sólo se

desarrollaría mediante el aporte de proteínas sintetizadas en el soma y transportadas hacia las regiones distales del axón. A pesar de ello, otros autores sostenían que la SPL axonal debería de existir ya que los sistemas de transporte axonales hacia zonas distales al soma (incluso a metros de distancia en axones periféricos de algunas especies de mamíferos, por ejemplo en la ballena) no serían “suficientemente rápidos” para cumplir con todas las necesidades metabólicas del axón ni tampoco serían compatibles con el tiempo de vida media de muchas proteínas axonales (Alvarez and Torres, 1985). En base a esta hipótesis se aportaron nuevas evidencias sobre la SPL axonal, identificando componentes de la maquinaria traduccional dentro de los axones (Giuditta *et al.*, 1980, 1986, 1991; Benech *et al.*, 1982; Alvarez and Benech, 1983; Sotelo *et al.*, 1992; Koenig and Giuditta, 1999). Sin embargo, aún continuaban las posiciones encontradas respecto al tema ya que el dogma centralista, el cual expresaba que los ARNm axonales se traducen únicamente en el soma neuronal, era el que prevalecía generando debates científicos al respecto (Jarlstedt and -O. Karlsson, 1973; Capano *et al.*, 1987). Incluso algunos debates continúan hasta nuestros días, por ejemplo en referencia a las evidencias de la SPL de neurofilamentos en el axón gigante de calamar donde el grupo de Gainer y colaboradores sugieren que la misma no ocurre mientras que el grupo de Giuditta muestra evidencias de lo contrario analizando desde nuevas perspectivas los mismos datos publicados hace décadas (Gainer *et al.*, 2017; Crispino *et al.*, 2018). Una de las principales críticas que persistía en la comunidad científica entorno a la SPL axonal es que muchos de los resultados fueron descritos casi únicamente en axón gigante de calamar, *Aplysia* y otros modelos de invertebrados que cuentan con capacidades regenerativas únicas (Costa and Willis, 2018). De este modo, se asumía que la SPL axonal era una característica única de esta clase de organismos y que posiblemente no sucedía de la misma forma en los axones de mamíferos. Con el desarrollo de nuevas tecnologías, comenzaron a surgir estudios donde se demostró la presencia de ARNm en axones de mamíferos por hibridación *in situ* (Sotelo-Silveira *et al.*, 2000, 2011), se aportaron evidencias de ribosomas en axones mielínicos de mamíferos en estadios embrionarios *in vitro* (Bunge, 1973; Bassell *et al.*, 1998) y en animales adultos *in vivo* (Kun *et al.*, 2007; Biever *et al.*, 2020), surgieron metodologías para el aislamiento de material axoplásmico y grandes avances asociados a los análisis de transcriptómica y proteómica axonales. Respecto a los sistemas de aislamiento de material axoplásmico, se desarrollaron sistemas *in vitro* incluyendo las cámaras de Campenot

(Campenot, 1977; Eng *et al.*, 1999), de Boyden modificadas (Willis and Twiss, 2011) y de microfluidos (Taylor *et al.*, 2005) y también diseños *in vivo*, como la microdissección de axoplasmas (Koenig and Martin, 1996; Koenig *et al.*, 2000) y la protrusión de material axoplásmico en buffer salino isotónico (Perlson *et al.*, 2005) e hipotónicos (Rishal *et al.*, 2010). Para una revisión completa de estos análisis omicos en axón y los métodos de aislamiento axonales consultar la revisión presentada en el Anexo 1 (página 182 y Figura 1 de dicho artículo).

A partir de todos estos avances, se demostró que la SPL ocurre tanto en los axones en desarrollo como en los ya maduros y que está íntimamente asociada con la capacidad de regeneración (Twiss *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2005; Gumy *et al.*, 2010; Terenzio *et al.*, 2018). Se evidenció su importancia durante el crecimiento del cono axónico (Jung *et al.*, 2011; Deglincerti *et al.*, 2015; Sasaki, 2020), desarrollo de la sinapsis (Schuman, 1999; Pfeiffer and Huber, 2006; Jung *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2017; Hafner *et al.*, 2019), maduración de axones distales (Alvarez *et al.*, 2000) y la respuesta a las señales guía axonales durante su crecimiento (Jung and Holt, 2011; Nédelec *et al.*, 2012; Cagnetta *et al.*, 2018). Actualmente, se acepta también que la SPL axonal permite responder localmente a cambios del entorno más rápidamente que las cascadas de señalización desencadenadas en el soma (Jung *et al.*, 2012; Perry and Fainzilber, 2014). De esta forma, si los ARNm de proteínas señalizadoras ya están presentes en regiones distales del axón y son traducidos localmente, esas proteínas nacientes pueden activarse como respuesta a un estímulo, desencadenar cascadas de señalización en el dominio axonal y finalmente ser transportadas al soma produciendo cambios en la expresión génica neuronal. Otro punto que demuestra la importancia de la SPL axonal es que se han identificado numerosas enfermedades del sistema nervioso que en parte se desencadenan por problemas en la localización, regulación y/o traducción de ciertos ARNm en axones centrales o periféricos (Cestra *et al.*, 2017; Spaulding and Burgess, 2017; López-Erauskin *et al.*, 2018; Epple *et al.*, 2021). Para una revisión completa de algunas de estas enfermedades y como pueden ser abordadas mediante ensayos omicos en axón, consultar la revisión del Anexo 1 (página 192 y Tablas 3-4 del artículo).

Por último y respondiendo a la interrogante inicial de por qué los polirribosomas siempre han sido difíciles de identificar en axones por microscopía electrónica, se ha demostrado muy

recientemente que, al menos en axones del SNC, existen monosomas activos traduccionalmente sin ensamblarse en polirribosomas (Biever *et al.*, 2020). Dado que los monosomas son muy difíciles de distinguir por microscopía electrónica, quizás esto explica el por qué se ha demostrado la SPL axonal aún cuando es difícil visualizar los centros traduccionales activos por técnicas de MET tradicionales.

Este breve resumen pone en evidencia la importancia de la SPL en axones y en cómo esta repercute sobre la homeostasis neuronal. A continuación, describiré los mecanismos que aseguran la localización específica de los ARNm en axones, así como los pasos esenciales para que pueda darse la SPL axonal.

## **2.2. Importancia de la localización de ARNm en los axones y sus principales mecanismos de regulación.**

La SPL en axones no es por sí misma suficiente para regular el metabolismo de células altamente polarizadas en donde la localización de las proteínas es crítica. En este contexto se ha investigado cuáles mecanismos aseguran que los ARNm alcancen su destino en los axones para luego ser traducidos localmente. Tomando en cuenta los estudios por secuenciación masiva, se han detectado con alta confianza estadística alrededor de 2250 ARNm en axones *in vitro* y unos 1000 en axones periféricos *in vivo* (Farias *et al.*, 2020) y se ha visto que la localización de éstos es un factor determinante para la regulación de su traducción local (Zappulo *et al.*, 2017; Farias *et al.*, 2019). A continuación, describimos los principales factores de regulación reportados en relación con la localización de ARNm en los axones.

**Secuencias nucleotídicas específicas.** Un primer nivel de regulación es través de secuencias nucleotídicas específicas presentes en ciertos ARNm, también conocidas como elementos en cis o “*zipcodes*” en inglés (Das *et al.*, 2019). Se ubican principalmente en los extremos 3' *UTR* y en algunos casos han sido reportados también en los extremos 5' *UTR* de los mensajeros maduros (Das *et al.*, 2019). Estas secuencias son el eslabón inicial de varios niveles de regulación que definen si un ARNm en particular será transportado hacia el axón o a las dendritas, dependiendo de la identidad de dicha secuencia (Yoo *et al.*, 2010). Más

recientemente se han detectado secuencias ricas en guanidina en ciertos ARNm que forman estructuras secundarias conocidas como “cuadruplex-G”, los cuales intervienen en la interacción del ARNm con otras proteínas de transporte agregando un nivel extra de regulación respecto al destino dendrítico o axonal del mensajero (Subramanian *et al.*, 2011; Schofield *et al.*, 2015; Asamitsu *et al.*, 2019).

**Proteínas de unión al ARN.** Un segundo nivel de regulación de la localización es a través de proteínas de unión al ARN o *RBP*s por las siglas en inglés de “*RNA Binding Proteins*”. Éstas reconocen secuencias conservadas de los ARNm y son fundamentales para su transporte hasta el sitio donde serán traducidos (Hörnberg and Holt, 2013; Ravanidis *et al.*, 2018; Sahoo *et al.*, 2018; Thelen and Kye, 2019). Se ha descrito que la unión de las *RBP*s no solo es dependiente de la secuencia nucleotídica del mensajero, sino también de motivos secundarios del ARN que aumentan la afinidad de la unión ARN-proteína (Hörnberg and Holt, 2013; Ravanidis *et al.*, 2018; Sahoo *et al.*, 2018; Thelen and Kye, 2019). La unión ARN-*RBP* es un proceso que se inicia co-transcripcionalmente o muy poco después de la transcripción del ARNm en el núcleo y desde ese momento ya queda definido gran parte del destino del mensajero. Un ejemplo muy bien estudiado es el caso del ARNm de la beta actina. Este último presenta una secuencia específica en su extremo 3' *UTR* la cual es reconocida por la proteína ZBP-1, una *RBP* muy bien caracterizada en la bibliografía (Sotelo-Silveira *et al.*, 2008; Nalavadi *et al.*, 2012; Sahoo *et al.*, 2018). Dicha interacción es esencial para el transporte del ARNm de beta actina hacia las zonas distales del axón (Sotelo-Silveira *et al.*, 2008; Donnelly *et al.*, 2011; Welshhans and Bassell, 2011). Otro ejemplo respecto al rol de las *RBP*s es en los casos de ARNm que solo se encuentran en axones de ciertas neuronas y no en otros, por ejemplo el ARNm de la gama-actina, el cual se encuentra únicamente en axones motores y somas de neuronas sensoriales y corticales, pero no en los cuerpos neuronales motores (Moradi *et al.*, 2017). Otro caso es el ARNm de CREB, el cual se encuentra presente en axones de neuronas sensoriales, pero no en las simpáticas (Cox *et al.*, 2008; Gumy *et al.*, 2011). También es esperable que exista un control durante las etapas del desarrollo embrionario ya que estudios de transcriptómica en neuronas muestran que no son los mismos mensajeros en cada etapa del desarrollo analizando los mismos tipos neuronales (Farias *et al.*, 2019).

**Regulación del transporte axonal mediada por motores moleculares.** Existen motores moleculares que aseguran el transporte activo de ARNm cargo a lo largo de los microtúbulos (kinesinas y dineinas) y/o los filamentos de actina (miosinas) axonales. Estas moléculas de transporte se unen a las *RBP*s y se ha propuesto que podrían ser un sistema más de control para asegurar el correcto transporte de ARNm específicos en los axones (Hirokawa *et al.*, 2010; Maday *et al.*, 2014). Para el caso de las dineínas (motores moleculares para el transporte activo y retrógrado hacia el soma) se han detectado algunas *RBP* unidas a ellas, pero no se sabe con certeza si llevan o no unidos un ARNm. En la mayoría de los casos se desconoce aún cómo es la interacción *RBP*-motor molecular, existiendo reportes en donde se ha detectado una interacción directa (Dictenberg *et al.*, 2008), otros donde se piensa deben de participar proteínas adaptadoras (Mofatteh and Bullock, 2017) y también estudios donde se sugiere un rol del propio ARNm en dicha interacción (McClintock *et al.*, 2018). Estudios realizados por nuestro grupo han demostrado la importancia de la miosina Va a través de los filamentos de actina (Sotelo *et al.*, 2013) y de las kinesinas KIF1B y KIF5B a través de los microtúbulos (Canclini *et al.*, 2020) para la transferencia de ARN entre las células de Schwann y el dominio axonal.

**Participación de Ribonucleopartículas.** Se ha descrito que las *RBP* se mueven a lo largo del axón no solo interactuando con su ARNm cargo sino también a componentes de la maquinaria traduccional y a otras proteínas de interacción directa con motores moleculares, conformando lo que se conoce como gránulos de transporte de ARN o ribonucleopartículas (RNPs). Éstas constituyen un nivel más de regulación de la localización de los ARNm en axones (Khalil *et al.*, 2018; Pushpalatha and Besse, 2019). Análisis recientes mediante imágenes en tiempo real de molécula única revelaron que cada RNP contendría un solo tipo de ARNm, ya sea en una o en múltiples copias (Batish *et al.*, 2012; Buxbaum *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2019), lo que supondría un mecanismo de especificidad para el transporte de los mismos. Si bien se han detectado por métodos sensibles de purificación cientos de ARNm presentes en diferentes RNPs, hasta el momento son números mucho menores que los miles de ARNm detectados en muestras axonales totales (Ravanidis *et al.*, 2018; Farias *et al.*, 2019). Por tanto, las RNPs no podrían ser el único medio de transporte de ARNs en axones. Cabe destacar que varios estudios concuerdan en que mientras los ARNm se encuentran asociados



a las *RBP* dentro de RNPs, estos mensajeros están inactivados y por tanto es un mecanismo extra de regulación para que sean traducidos únicamente en el sitio en que la proteína es necesaria, aumentando así su vida media (Krichevsky and Kosik, 2001). Se han descrito diferentes estrategias para mantener esa inhibición traduccional. Un ejemplo es a través del reclutamiento de las proteínas 4EBPs, las cuales evitan la formación del complejo de iniciación de la traducción (Schenck *et al.*, 2001; Zahr *et al.*, 2018). Otra forma es la unión directa de las *RBP*s a los ribosomas impidiendo su actividad (Darnell *et al.*, 2011). También se ha reportado el reclutamiento de adenilasas, quienes "acortan" la cola poli A del ARNm evitando así la unión de las proteínas PABPs, esenciales para aumentar la eficiencia en la formación del complejo de iniciación de la traducción (Kim and Richter, 2006). Cuando se alcanza el sitio en el axón en donde el mensajero debe ser traducido, las *RBP*s asociadas sufren modificaciones post-traduccionales tales como fosforilaciones, desfosforilaciones o metilaciones (según sea el caso) que dejan expuesto el ARNm a la maquinaria traduccional, favoreciendo su traducción local (Jobert *et al.*, 2009; Urbanska *et al.*, 2017). La relevancia de estos mecanismos de regulación queda en evidencia cuando se analizan las causas de algunas patologías periféricas, como por ejemplo la Esclerosis Lateral Amiotrófica. En ella, se ven mutados genes relacionados con motores moleculares o *RBP*s, lo que produce un incorrecto transporte de ciertos ARNm en los axones (Yasuda and Mili, 2016; Kapeli *et al.*, 2017). A modo de ejemplo, en algunos fenotipos de dicha patología donde las neuronas motoras presentan mutado el gen TDP-43, se ha reportado una disminución en la tasa de transporte de RNPs en los axones y con ello una disminución significativa de los ARNm y microARNs axonales en regiones distales. Estos cambios podrían corresponderse con el inicio de la enfermedad a nivel axonal, previo a la aparición de la sintomatología más grave (Alami *et al.*, 2014; Baskaran *et al.*, 2018; Sleight *et al.*, 2020). Ensayos omicos desarrollados a partir de material axonal han aportado al entendimiento de esta enfermedad, como puede consultarse en la revisión del Anexo 1 (página 196).

**Niveles de expresión del ARNm y las *RBP*s.** Los niveles de regulación antes descritos toman en cuenta las interacciones ARN-proteína y proteína-proteína, pero también es importante considerar las tasas de transcripción de cada ARNm y la disponibilidad de las *RBP*s para cada uno de ellos, ya que en muchos casos un mismo ARNm es transportado por la

misma *RBP*. Un ejemplo de ellos son los ARNm de la beta actina y de GAP-43 ya que ambos son transportados por la misma *RBP*, la proteína ZBP1 (Donnelly *et al.*, 2011, 2013). Un aumento o disminución en los niveles de transcripción de cada mensajero involucrado o en los niveles de traducción de la *RBP* asociada pueden variar completamente un escenario axonal. Otro ejemplo son los mensajeros de GAP-43 y Nrn1 los cuales compiten por la unión a la proteína *RBP* HuD para transportarse a lo largo de los axones en neuronas sensoriales periféricas. Sin embargo, esta competencia no sucede en neuronas del sistema nervioso central, ya que los niveles de expresión de HuD están en exceso y pueden transportar a ambos mensajeros sin existir interferencias entre ellos (Gomes *et al.*, 2017).

**Regulación mediante microARNs.** Los microARNs son pequeños ARNs de uno 25-30 nucleótidos de extensión que interaccionan principalmente con los extremos 3' *UTR* de los ARNm reprimiendo su traducción (Gebert and MacRae, 2019). A nivel axonal, se han detectado un gran número de estas moléculas mediante estudios de transcriptómica y otras técnicas moleculares (Natera-Naranjo *et al.*, 2010; Wang and Bao, 2017; Epple *et al.*, 2021), se ha demostrado su importancia en la neurogénesis, desarrollo axonal, conectividad neuronal (Dajas-Bailador *et al.*, 2012; Cremisi, 2013; Bellon *et al.*, 2017; Lucci *et al.*, 2020) y se han reportado casos de microRNAs cuya localización en el compartimento axonal influye directamente en el metabolismo neuronal (Wang and Bao, 2017). A modo de ejemplos se puede mencionar el caso de miR-21, para el cual se ha validado su efecto promotor del crecimiento axonal al regular la traducción local en modelos de injuria en regiones distales de los axones periféricos (Strickland *et al.*, 2011) y más recientemente se ha reportado su efecto promotor de la síntesis proteica intra-axonal mediando la activación de la vía mTOR/PTEN en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (*DRGs*, por sus siglas en inglés) (Kar *et al.*, 2021). El efecto opuesto se observa para miR 199a-3p, quien se une directamente al ARNm de mTOR inhibiendo su traducción (Kar *et al.*, 2021). También se ha reportado el rol del microRNA-338 como controlador del crecimiento axonal en neuronas corticales (Kos *et al.*, 2017b) y en la polaridad neuronal *in vivo* (Kos *et al.*, 2017a), el rol de microRNA-140 en la definición de la polaridad axón-dendrita en el desarrollo de neuronas corticales (Ambrozkiwicz *et al.*, 2018), de los microRNAs let-7 y miR-9 como represores de las proteínas Ntn1 y Dcc durante los procesos de regeneración axonal (Wang *et al.*, 2019) y de miR-26a como regulador de la

traducción de GSK3 $\beta$  durante el desarrollo de axones en neuronas corticales de ratón (Lucci *et al.*, 2020).

**Regulación por factores extrínsecos al axón.** Cambios en el medio externo al axón pueden inducir a cambios en la localización y/o traducción local de los ARNm. Un ejemplo es la respuesta axonal frente a una axotomía, en donde el ingreso de Ca<sup>2+</sup> en forma masiva al axón desde el medio extracelular desencadena cascadas de señalización que culminan en la traducción local de ciertos ARNm como STAT3 (Ben-Yaakov *et al.*, 2012), Vimentina (Perlson *et al.*, 2005), Kpnb1 (Twiss *et al.*, 2016) y RanBP1 (Yudin *et al.*, 2008). Por qué efectos como el de la entrada de Ca<sup>2+</sup> solo afecta a un grupo de ARNm y no otros es aún una pregunta sin respuesta clara, pero se piensa que la metilación reversible del ARN puede ser un posible mecanismo asociado ya que dicho proceso es importante en la regulación de la SPL axonal en procesos de regeneración (Barker and Tsai, 2017; Shin and Cho, 2017). Además del Ca<sup>2+</sup>, otro agente externo regulador de la SPL axonal es la molécula de ATP. Se ha visto que la generación en el axón de grandes cantidades de ATP a través de la respiración oxidativa de las mitocondrias axonales activadas por respuesta a neurotrofinas, promueve la SPL axonal necesaria para la ramificación axonal en neuronas sensoriales (Spillane *et al.*, 2013) y es importante durante la respuesta axonal a la injuria (Patrón and Zinsmaier, 2016; Bo, 2018; Wu *et al.*, 2018). Además del ATP, factores de crecimiento como el NTF3 (Lindwall and Kanje, 2005), NGF (Spillane *et al.*, 2012) o neurotrofinas (Willis *et al.*, 2005) promueven o reprimen la traducción de ciertos mensajeros, así como el transporte hacia regiones distales del axón de otros tantos, regulando así la futura localización de las proteínas en respuesta a un cierto estímulo.

Por último, también es importante mencionar que si bien la mayor parte de los ARNs presentes en axones periféricos proviene de los cuerpos neuronales, una fracción todavía no determinada es transferida desde las células de Schwann. Dicha transferencia se ve aumentada tras un evento de injuria y es regulado por diferentes motores moleculares y elementos del citoesqueleto axonal como ya ha sido demostrado en diversos trabajos de nuestro grupo (Sotelo *et al.*, 2013, 2014; Canclini *et al.*, 2014, 2020). Por otra parte también se ha reportado la transferencia desde la célula de Schwann al axón de ribosomas (Court *et al.*, 2008, 2011) y vesículas con diversos contenidos (Lopez-Verrilli and Court, 2012) las cuales

también aumentan su transferencia frente a eventos de injuria, pudiendo entonces corresponderse con mecanismos de reparación como respuesta al daño axonal en nervios periféricos.

La Figura 1 resume la participación de los principales mecanismos que pueden regular la localización de los ARN y su traducción local en axones.

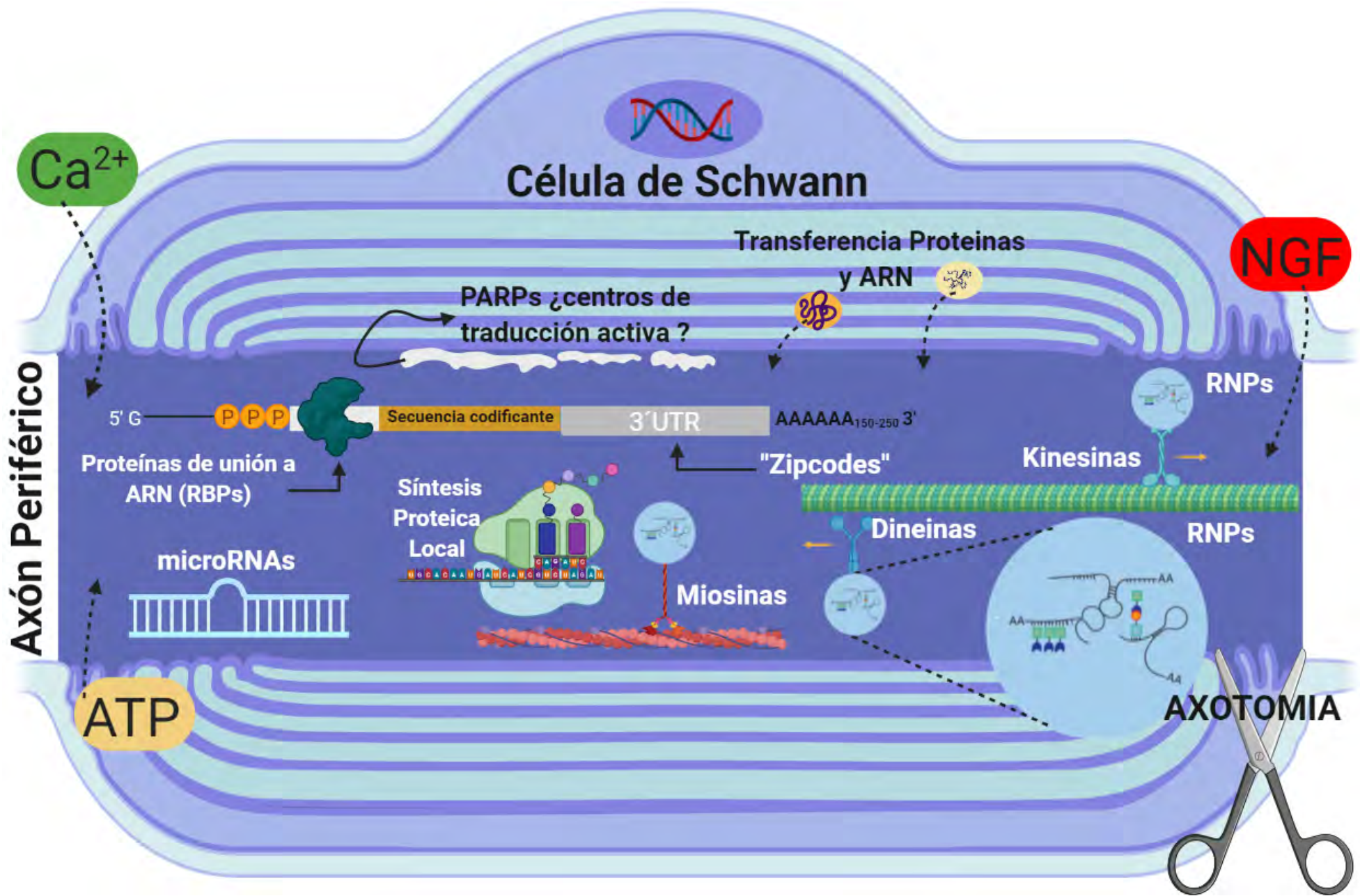


Figura 1. Esquema del dominio axonal en una fibra miélnica indicando los principales factores que pueden regular la localización de ARNs.

Todos los sistemas de regulación mencionados anteriormente aseguran la localización de los ARNm en los axones para eventualmente ser traducidos localmente, ya sea en las condiciones fisiológicas normales del axón o como respuesta a una injuria. Los avances tecnológicos en relación con el estudio del transporte y localización de los ARNm y en cómo éstos son regulados han sido importantes, sin embargo aún quedan muchas preguntas por responder, principalmente en modelos *in vivo*. Una de ellas se centra en la identificación de cuáles cascadas de señalización están asociadas a la regulación de la SPL axonal y qué rol juegan cada uno de los componentes presentes en las mismas. Hasta el momento, una de las mejor caracterizadas es la vía asociada a mTOR (Verma *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2010; Obara *et al.*, 2012; Terenzio *et al.*, 2018; Biever *et al.*, 2019).

### **2.3. Participación de la vía mTOR en la regulación de la síntesis proteica local axonal.**

Se ha reportado que la SPL axonal aumenta durante los procesos de regeneración producidos como respuesta a una injuria (Zheng *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2005; Willis *et al.*, 2005; Gummy *et al.*, 2010; Obara *et al.*, 2012; Twiss *et al.*, 2016; Terenzio *et al.*, 2018). En este apartado es que surge el interés por conocer cuáles cascadas de señalización regulan la misma, siendo una de las mejor caracterizadas hasta el momento la vía mTOR (Verma *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2010; Obara *et al.*, 2012; Terenzio *et al.*, 2018; Biever *et al.*, 2019). Respecto a su localización, el complejo proteico mTOR se ha identificado por inmunohistoquímica en fibras sensoriales mielínicas de tipo A (Laplante and Sabatini, 2012) y más recientemente se ha demostrado distribución y síntesis local en axones mielínicos de mamíferos (Terenzio *et al.*, 2018).

A nivel celular general, mTOR es una proteína kinasa capaz de formar 2 complejos proteicos llamados mTORC1 y mTORC2 (Ver Figura 2A, panel de la izquierda en la página 26). El primero contiene la proteína raptor la cual es sensible a la droga rapamicina y el segundo se une a la proteína rictor que es parcialmente insensible a dicha droga (Laplante and Sabatini, 2012). En lo que respecta al conocimiento fino de las interacciones de ambos complejos, muy poco se conoce de mTORC2 y muchas veces no es considerado en los estudios de mTOR reportados en la bibliografía. Ambos son reguladores centrales de la

síntesis proteica que integra señales río arriba, incluyendo las de Akt y del complejo TSC1-TSC2 (Laplante and Sabatini, 2012), las cuales a su vez son capaces de censar los niveles de factores tróficos y de ATP celular (Wang and Proud, 2006). Tras el procesamiento de estas señales, mTORC1 es capaz de inducir respuestas que controlan el crecimiento y la proliferación (Cho *et al.*, 2014) a través de la activación por fosforilación de componentes río abajo del complejo incluyendo las proteínas p70S6K y 4EBP1. Éstos últimos son los que finalmente regulan los niveles de traducción celular (Wang and Proud, 2006) y junto a mTORC1 han sido identificados en los receptores sensoriales de las fibras sensoriales de tipo A (Jiménez-Díaz *et al.*, 2008) y en axones periféricos en regeneración (Gong *et al.*, 2015). En el caso de axones de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (*DRG*) cultivadas *in vitro* y pre-condicionados por una axotomía, se ha comprobado que la inhibición de la vía de mTORC1 mediante la droga rapamicina disminuye la incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente en el dominio axonal (Verma *et al.* 2005). Este efecto se analizó en regiones de los axones alejados del soma neuronal y en tiempos de incubación que no permitían el transporte de proteínas desde el cuerpo neuronal hasta la región axonal estudiada, sugiriendo que la vía mTORC1 regularía la SPL axonal. Sumado a estos resultados, se obtuvo el mismo efecto en axones pre-condicionados por una lesión y separados de sus somas *in vitro*, lo que asegura que la señal observada corresponda a SPL axonal (Verma *et al.* 2005). Además, la inhibición del complejo mTORC1 tanto en presencia como en ausencia del soma, disminuye la capacidad de generación de un cono de crecimiento funcional y por tanto afecta la capacidad de regeneración en el axón *in vitro* (Verma *et al.* 2005). Estudios posteriores *in vitro* identificaron que la vía de mTORC1 está activa (mediante la fosforilación de sus componentes) en los somas de neuronas cultivadas 1-4 días posteriores a la lesión de nervios ciáticos de rata (Abe *et al.*, 2010; Donnelly *et al.*, 2013) y demostraron que la aplicación de rapamicina produce una disminución en la capacidad de crecimiento de estos axones injuriados. Por tanto, la activación de mTORC1 influye en el crecimiento axonal (Abe *et al.* 2010). Este mismo estudio muestra que en ratones *knockout* para TSC2, una proteína río arriba e inhibidor de mTORC1, produce un aumento en los niveles basales del complejo y un mayor crecimiento de los axones, comparable a lo observado en situaciones de injuria (Abe *et al.* 2010). Esto sugiere que la activación de mTORC1 ya es suficiente para alcanzar fenotipos similares a los observados en una situación de lesión axonal y por ende mTORC1 es importante en la

respuesta a la injuria. Apoyando a esta hipótesis, se ha reportado que la activación de mTORC1 durante la regeneración axonal produce un aumento de la proteína GAP-43 en los axones lesionados tanto *in vitro* como *in vivo* (Abe *et al.* 2010) siendo esta proteína un reconocido factor de regulación del crecimiento axonal (Abe *et al.*, 2010; Donnelly *et al.*, 2013). Además, la eliminación de PTEN, que es un regulador negativo indirecto de la vía mTORC1, tiene un efecto promotor en la regeneración (Park *et al.*, 2008, 2010; Ohtake *et al.*, 2015). Recientemente se ha reportado que la proteína mTOR es sintetizada localmente en axones lesionados, que su ARNm es transportado por la *RBP* nucleolina y se ha demostrado su capacidad de controlar la SPL axonal regulando sus propios niveles de traducción y también los de moléculas de transporte retrógrado como STAT3 y beta importina 1 en axones periféricos (Terenzio *et al.*, 2018), factores de transcripción para las cuales ya se ha reportado su importancia para desencadenar una respuesta a la injuria (Hanz *et al.*, 2003; Bareyre *et al.*, 2011; Di Liberto and Cavalli, 2012; Perry *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2016; Mehta *et al.*, 2016). Terenzio y colaboradores también demostraron que eliminar la secuencia 3' *UTR* del ARNm de mTOR repercute negativamente en la supervivencia neuronal, revelando la importancia de la localización y transporte de mTOR en el axón (Terenzio *et al.*, 2018). Paralelamente a estos resultados, experimentos desarrollados en mi tesis de maestría muestran un aumento en los niveles de p70S6K fosforilada en la treonina 389 (regulado por la activación de mTORC1) junto con un aumento de la neo-síntesis de proteínas en axones del nervio ciático injuriados *in vivo* (tesis de maestría de Di Paolo., 2016). Es importante mencionar que, si bien la mayoría de los trabajos que relacionan mTOR con procesos de regeneración y SPL axonal son analizando el complejo mTORC1, también se ha reportado que el complejo mTORC2 es activado en situaciones de injuria axonal (Obara *et al.*, 2012; Terenzio *et al.*, 2018).

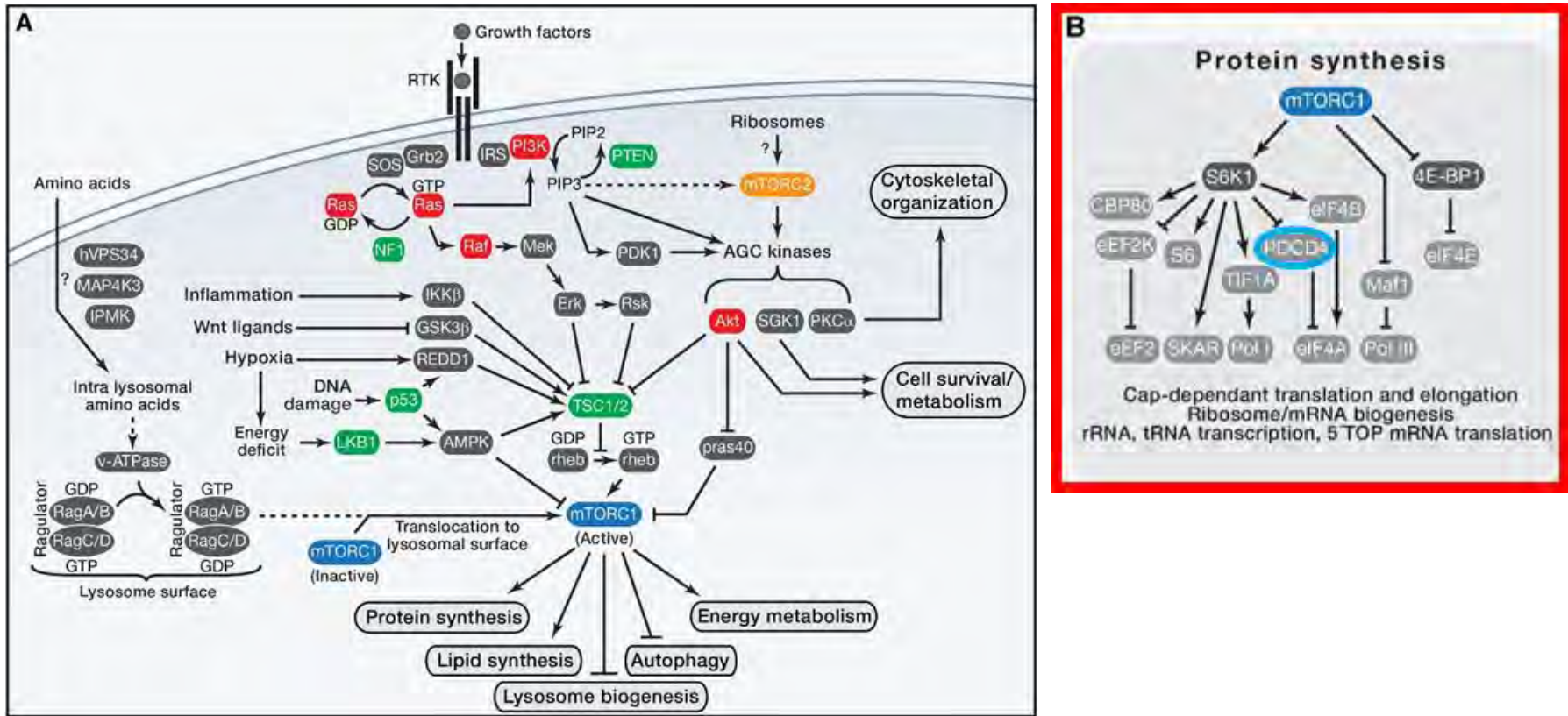
Los experimentos anteriores demuestran que el complejo mTORC1 es capaz de regular la síntesis de proteínas en los axones, siendo por lo tanto importante en la modulación de los mecanismos de regeneración axonal. Sin embargo, el conocimiento fino de qué componentes río abajo de mTORC1 son activados durante dichos procesos no es aún claro.



## 2.4. Papel de los componentes río abajo de mTORC1 en regeneración axonal.

Cuando la vía mTORC1 está activada, desencadena una cascada de fosforilaciones que culmina en un aumento de la síntesis de proteínas (ver Figura 2B, página recuadro en rojo en la página 26). En lo que respecta a los modelos neuronales, se ha reportado en axones sensoriales sometidos a injuria tanto *in vitro* como *in vivo* que la proteína S6 ribosomal es activada mediante esta vía a través de la proteína p70S6K (Verma *et al.* 2005). Dicha activación es inhibible por rapamicina, lo que indica que esta proteína está siendo regulada específicamente por mTORC1 (Verma *et al.* 2005). También se demostró el aumento en la expresión de syntaxina-13 cuando la vía mTORC1 está activa y que en ausencia de dicha proteína disminuye la capacidad de crecimiento y regeneración axonal (Cho *et al.* 2014).

A pesar de que el conocimiento que se tiene sobre la participación de la vía mTORC1 en la SPL y regeneración axonal es cada vez mayor, aún existen puntos que no están claros, especialmente estudiando los axones *in vivo*. Así como se estudió el efecto de la syntaxina-13 en la regeneración axonal, es importante identificar el papel de otros componentes regulados por mTORC1 que puedan participar en la regulación tanto de la SPL como de la regeneración axonal. Identificando la función de estos blancos, podrá entenderse mejor cómo es la regulación de la SPL axonal, ya que mTOR es un regulador central y por tanto modifica muchas proteínas al mismo tiempo, lo que dificulta identificar qué componentes están participando en la modulación fina de estos procesos. Continuando con esta línea de pensamiento es que nos interesa introducir a un represor traduccional río abajo de la vía mTORC1 llamado "*Programmed Cell Death 4*" (PDCD4) (Lankat-Buttgereit and Göke, 2009; Matsushashi *et al.*, 2019).



**Figura 2. Esquema mostrando los componentes principales de las vías de mTORC1 y mTORC2.** En el panel 2A se resumen los principales componentes que interactúan con mTORC1 y mTORC2. En el panel 2B y resaltado en rojo se muestra en detalle la vía de mTORC1 asociada directamente con la activación de la síntesis proteica. En celeste se indica la proteína Pdc4. (Adaptado de Laplante and Sabatini, 2012 Cell Press).

## **2.5. Posible participación de la proteína Pdc4 en la regulación de la síntesis proteica local y regeneración axonal.**

La proteína Pdc4 es un represor de la traducción y supresor tumoral descrito por primera vez en 1995 asociado a su rol inductor de la apoptosis en un modelo celular de ratón inicialmente bajo el nombre “DUC” (ShibAHara *et al.*, 1995). Esta proteína interacciona con uno de los factores de iniciación de la traducción llamado eIF4A, inhibiendo su actividad helicasa y bloqueando su unión con el factor eIF4G, dificultando entonces la formación del complejo de preiniciación de la traducción 43S (Göke *et al.*, 2002). Pdc4 presenta dos dominios de unión a eIF4A y un tercer dominio de unión al ARN (Loh *et al.*, 2009). Se ha postulado que este dominio definiría la especificidad de Pdc4 para el reconocimiento de ciertos ARNm con determinadas estructuras secundarias, bloqueando específicamente la traducción de los mismos (Biyanee *et al.*, 2015). No se han identificado un gran número de ARNm que sean blanco directo de regulación de esta proteína, pero dentro de los ya reportados se incluyen c-myc (Singh *et al.*, 2011), p53 (Wedeken *et al.*, 2011), sin1 (Wang *et al.*, 2017) y BDNF (Li *et al.*, 2020). Pdc4 está ampliamente descrito por su rol como supresor de tumores y sus niveles de expresión se encuentran desregulados en diversos tipos de cáncer (Lankat-Buttgereit and Göke, 2009; Matsushashi *et al.*, 2019). Esta proteína es regulada por la vía de mTORC1, siendo uno de los blancos de fosforilación río abajo de p70S6K (ver Figura 2B). Cuando p70S6K está activa (y por lo tanto la vía mTORC1 está activada), se produce la fosforilación de Pdc4, siendo una señal para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (Dorrello *et al.*, 2006), lo que desencadenaría la activación de la traducción de los mensajeros regulados por Pdc4.

Dado que las vías moleculares de regulación afectadas en cáncer suelen ser compartidas con las de regulación reportadas en el sistema nervioso (Chédotal *et al.*, 2005; Heine *et al.*, 2015; Batista and Hengst, 2016) - incluyendo la vía mTORC1 - es posible que Pdc4 sea una proteína descrita como reguladora en procesos asociados al cáncer, que posteriormente se encuentran sus roles compartidos con el sistema nervioso, por ejemplo con los procesos de crecimiento y regeneración axonal. Sin embargo, no hay una gran cantidad de trabajos que hayan reportado funciones regulatorias de Pdc4 en el sistema nervioso. Hasta el momento PDC4 ha sido identificado como regulador del efecto inhibitorio en la síntesis general de

proteínas en neuronas corticales embrionarias en presencia de etanol en la patología conocida como “síndrome alcohólico fetal” (Narasimhan *et al.*, 2013). El aumento en las concentraciones de etanol en este modelo produce un aumento en la concentración de Pdc4 junto a una inhibición general de la síntesis proteica neuronal. El silenciamiento de PDCD4 por ARNs interferentes bloquea dicho efecto inhibitorio en la traducción (Narasimhan *et al.*, 2013). En la misma línea de investigación se reportó en neuroblastos corticales *in vitro*, que el etanol aumenta la expresión de PDCD4 mediante la activación de la vía Wnt-3a/GSK-3 $\beta$  (Riar *et al.*, 2014). En otro análisis independiente, se demostró que el aumento del micro-ARN miR-21 en la médula espinal sometida a injuria produce una disminución en los niveles de PDCD4 en el tejido (Jiang *et al.*, 2017). Por último se reportó muy recientemente en neuronas de hipocampo que la proteína Pdc4 es capaz de regular la traducción del factor trófico BDNF, lo cual tiene efectos sobre procesos plásticos del SNC donde la síntesis de proteínas es clave (Li *et al.*, 2020). Por tanto, no hay datos en la literatura que relacionen el rol de esta proteína con la regulación traduccional en axones centrales o periféricos tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

Datos preliminares de nuestro grupo muestran la distribución de Pdc4 en diferentes regiones del sistema nervioso *in vivo* identificando una disminución en los niveles de expresión de dicha proteína cuando se inducen procesos de plasticidad tanto en sistema nervioso periférico como central (tesis de grado y tesis de maestría Di Paolo, 2013 y 2016). Estos efectos irían acompañados de una activación de la vía mTORC1 y un aumento de las tasas de traducción general a nivel axonal. Los datos antes presentados, sumado al hecho de que Pdc4 es un represor traduccional, sugieren que esta proteína podría estar modulando al menos parte del crecimiento axonal y que sus niveles de expresión en axón podrían estar regulados tanto por su transporte desde el cuerpo celular como por su degradación y/o posible síntesis local axonal.

Es esperable que eventos de regulación traduccional axonal se desarrollen en espacios confinados donde se concentrarían los componentes reguladores de la traducción axonal, por ejemplo los relacionados a la vía mTORC1, conformando posibles centros de traducción local. En este contexto se han propuesto unas estructuras llamadas Placas Periaxoplásmicas

Ribosomales como posibles dominios de SPL axonal (Koenig and Martin, 1996; Koenig *et al.*, 2000; Sotelo-Silveira *et al.*, 2004, 2006, 2008; Calliari *et al.*, 2014).

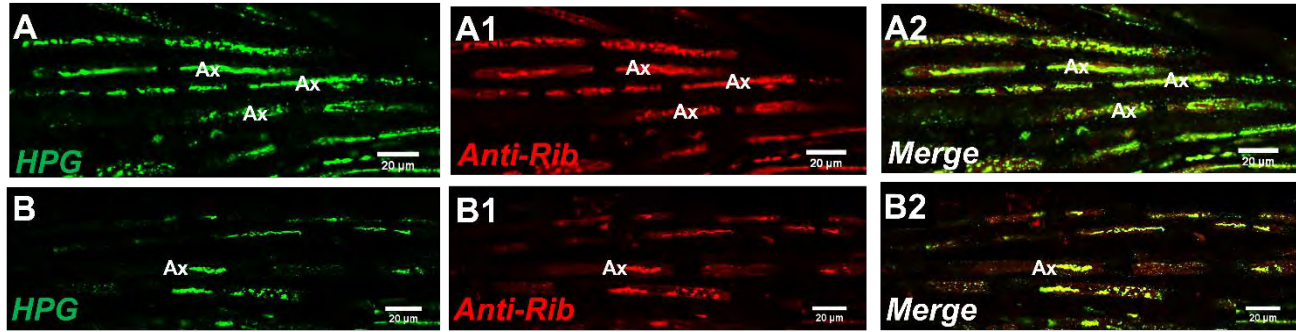
## **2.6. Las Placas Periaxoplásmicas Ribosomales o “*PARPs*” como potenciales dominios axonales donde puede ocurrir la síntesis proteica local axonal.**

Hasta el momento hemos presentado diversos artículos científicos que revelan la importancia de la localización de los ARNm para la SPL axonal, así como también de las vías reguladoras de dichos procesos, destacando la participación de la vía mTORC1 especialmente en procesos de regeneración axonal e injuria. En este contexto propusimos a un represor traduccional río abajo de esta vía llamado PDCD4 como un posible regulador del crecimiento axonal. Corresponde ahora mencionar cuáles podrían ser los dominios axonales donde pueda ocurrir la SPL. Estudios de transcriptómica y proteómica realizados en axones aislados *in vitro* mostraron que al menos la mitad de las proteínas enriquecidas en los axones respecto al soma coinciden con la identidad de los ARNm detectados por transcriptómica en el dominio axonal, sugiriendo que la SPL de los mismos podría tener un rol importante (Zappulo *et al.*, 2017). Es posible que existan dominios en los cuales se concentran muchos de los elementos necesarios para la SPL, permitiendo responder a las necesidades metabólicas del axón en forma eficiente (Sotelo-Silveira *et al.*, 2006). Actualmente una de las propuestas entorno a esta hipótesis es que estructuras ricas en ARN y proteínas ribosomales llamadas Placas Periaxoplásmicas Ribosomales o “*PARPs*”, (por las siglas en inglés de “*Periaxoplasmic Ribosomal Plaques*”) podrían corresponder a estos centros activos (Sotelo-Silveira *et al.*, 2006).

Las *PARPs* fueron descritas por primera vez en 1996 por Koenig y colaboradores mediante protocolos de microdissección de axoplasmas *in vivo* en el axón de Mauthner de pez dorado (Koenig and Rainer, 1996) y posteriormente en axones “whole mounts” mielínicos de mamíferos (Koenig *et al.* 2000; Sotelo-Silveira *et al.* 2004, 2006, 2008; Calliari *et al.* 2014). Mediante este protocolo, la mielina que rodea el axón es descartada en un muy alto porcentaje, obteniéndose un enriquecimiento muy alto en el material axoplásmico (Farias *et al.*, 2020). Además, la estructura axonal se conserva de modo tal que es compatible con técnicas de microscopía óptica, de fluorescencia (Sotelo-Silveira *et al.*, 2004, 2008) e incluso en análisis

de transcriptómica axonal *in vivo* realizando ciertas modificaciones al protocolo original (Farias *et al.*, 2020). Las *PARPs* han sido descritas como estructuras ubicadas en la región periaxoplásmica del axón con alta concentración de moléculas de ARN (identificadas mediante la sonda YOYO-1), ribosomas y polisomas en axón gigante de pez dorado (Koenig and Reiner, 1996). Posteriormente fueron descritas en axones mielínicos de rata y conejo, donde también se identificó que presentan las proteínas motoras kinesina II, miosina Va (Sotelo-Silveira *et al.* 2004), el ARNm de la beta actina (Sotelo-Silveira *et al.* 2008) y más recientemente se sugirió la presencia de ribonucleopartículas (Calliari *et al.* 2014). Por tanto, presentan varios de los componentes necesarios para que la SPL esté activa, pero aún no se ha demostrado.

En línea con la hipótesis de que las *PARPs* pueden ser centros traduccionales activos, en mi tesis de maestría identificamos dominios con características de *PARPs* en axones completamente delipidados (tesis de Maestría Di Paolo., 2016). Los mismos fueron obtenidos a partir de nervios periféricos enteros mediante protocolos de transparentado adaptados del sistema CLARITY (Chung *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2018) combinados con el sistema de *Click iT* (para evidenciar neosíntesis de proteínas) y observados por microscopía confocal. Ejemplos de las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 3A y 3B, donde la Homopropargilglicina (*HPG*) es un aminoácido ortólogo de la metionina que fue incorporado a las proteínas neosintetizadas de los nervios ciático *ex vivo* y el Anti-Rib un anticuerpo diseñado por la Dra. Alejandra Kun para el reconocimiento de partes de la subunidad mayor y menor del ribosoma, para el cual ya se ha detectado señal positiva en las *PARPs*. Para detalles de cómo puede aplicarse el sistema de *Click iT* para evaluar la síntesis proteica en axones *in vivo* mediante microscopía confocal, consultar el Anexo 2 (página 206).



**Figura 3. Las PARPs como posibles centros de traducción local en axones.** A-A2 y B-B2 muestran regiones completamente delipidadas de axones obtenidos de raíces ventrales de rata sometidas al protocolo de transparentación “CLARITY” que presentan características de PARPs. El aminoácido HPG, ortólogo de la metionina, evidencia proteínas neo-sintetizadas y co-localiza con la señal del anticuerpo Anti-Rib (el cual detecta componentes de las subunidades mayor y menor del ribosoma), sugiriendo que estas regiones similares a PARPs se corresponden con centros traduccionales activos en el axón (barra de escala 20 µm).

Estos resultados preliminares muestran a las PARPs como posibles dominios axonales donde ocurriría la SPL. La capacidad de localizar los dominios axonales donde exista SPL activa e identificar cuáles proteínas son neo-sintetizadas en axones periféricos *in vivo*, por ejemplo en condiciones basales y de injuria, sería un paso importante para comprender el rol de la SPL en estos procesos. En esta línea, la utilización de ensayos de ligación por proximidad con puromicina (del inglés “Puromycin Proximity Ligation Assay” o PURO-PLA) pueden ser utilizados para localizar los sitios de neosíntesis de proteínas de interés mediante microscopía confocal de alta resolución (tom Dieck *et al.*, 2015). En la sección 5.3 de los materiales y métodos en la página 38 describimos en detalle en qué consiste este protocolo.

Los sistemas de detección mencionados anteriormente analizan proteínas específicas e identifican si son sintetizadas localmente. Sin embargo y gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación masiva y de proteómica de los últimos diez años, así como en los sistemas de extracción y purificación del material axonal, se han reportado transcriptomas y proteomas axonales que ayudan a dilucidar la composición de diversos axones en distintos escenarios metabólicos. La revisión del Anexo 1 incluye una extensa discusión respecto a dichos avances (ver páginas 183-189, Tablas 1 y 2 y Figuras 1 y 2 del Artículo III). A continuación, resumimos algunos de estos hallazgos.

## 2.7. Estudios transcriptómicos y proteómicos en axones.

Los estudios con enfoque ómico en axones son muy recientes y todos ellos presentan la misma limitante: la escasa cantidad de material axonal que puede obtenerse por cualquier método de extracción. Por ello se requiere de técnicas moleculares muy finas para detectar las biomoléculas allí presentes. Los avances en las técnicas de secuenciación masiva desarrollados en los últimos años permitieron obtener alrededor de 20 transcriptomas axonales en diferentes escenarios metabólicos y tipos neuronales, aunque su amplia mayoría a partir de modelos axonales *in vitro* (Willis *et al.*, 2007; Andreassi *et al.*, 2010; Zivraj *et al.*, 2010; Gumy *et al.*, 2011; Cajigas *et al.*, 2012a; Deglincerti and Jaffrey, 2012; Baleriola *et al.*, 2014; Minis *et al.*, 2014; Saal *et al.*, 2014; Sasaki *et al.*, 2014; Briese *et al.*, 2016; Taliaferro *et al.*, 2016; Bigler *et al.*, 2017; Rotem *et al.*, 2017; Zappulo *et al.*, 2017; Mathur *et al.*, 2018; Tóth *et al.*, 2018). Muy recientemente se ha publicado por parte de nuestro grupo el transcriptoma axonal *in vivo* de raíces ventrales de ratas adultas obtenido mediante extruido de axoplasmas utilizando el método de Koenig y colaboradores con algunas modificaciones que permiten alcanzar mayores niveles de pureza en las muestras obtenidas (Farias *et al.*, 2020). Este ensayo significa un avance destacado en la comprensión de que mensajeros se encuentran en axones maduros de mamíferos, revelando un menor número de transcritos detectados que en ensayos de transcriptómica axonal *in vitro*. Esto podría significar que existen grandes diferencias entre los mensajeros que se expresan *in vivo* respecto a los presentes en axones en cultivo. En las páginas 197 y 198 dentro de la revisión del Anexo 1 se discute en mayor profundidad los avances obtenidos a partir de los estudios de transcriptómica axonal.

Los ensayos de transcriptómica aportan información muy valiosa en torno a los ARNm presentes en los axones, pero no necesariamente reflejan cuáles proteínas están allí presentes. Para responder esta pregunta recientemente se han diseñado protocolos basados en secuenciación masiva que permiten estudiar el transcriptoma axonal a partir de un protocolo llamado *Axon TRAP* por las siglas en inglés de “*Axon Translating Ribosome Affinity Purification*” (Shigeoka *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Ouwenga *et al.*, 2017; Ostroff *et al.*, 2019). Este sistema se basa en constructos de ribosomas fluorescentes que solo se expresan en un tipo neuronal seleccionado. Luego por un ensayo de purificación por afinidad son extraídos junto con el mensajero que estarían traduciendo y secuenciados por protocolos de



RiboSeq. Sin embargo, es dificultoso asegurar que todos los ribosomas extraídos están activos y además con este sistema no es posible detectar aquellos ribosomas que provengan de las células gliales, los cuales se han reportado pueden ser transferidos desde estas células al axón (Court *et al.*, 2008, 2011; Müller *et al.*, 2018). En referencia a este último punto, ya ha sido demostrada la transferencia de ARN y ribosomas desde la célula de Schwann al axón (Court *et al.*, 2008, 2011; Sotelo *et al.*, 2013; Canclini *et al.*, 2014, 2020; Müller *et al.*, 2018).

Dada las limitantes de la translatómica, un paso importante para identificar qué proteínas están presentes en los axones en diversos estadios metabólicos es realizar ensayos de proteómica en material axoplásmico. En esta línea, en los últimos 5 años se han hecho importantes avances en caracterizar el proteoma de axones principalmente en modelos *in vitro*. Una publicación interesante es la reportada por el grupo de Chekulaeva y colaboradores quienes analizaron el proteoma total y neo sintetizado en neuritas de células madre embrionarias de ratón diferenciadas a neuronas conocidas como “*iNeurons*” (Zappulo *et al.*, 2017). Un año después, el grupo de Holt analizó el proteoma axonal de neuronas del ganglio de la retina (*RGC*, por sus siglas en inglés) en *Xenopus Laevis* (Cagnetta *et al.*, 2018) y ese mismo año se estudió el proteoma de axones obtenidos de neuronas corticales de rata (Chuang *et al.*, 2018). En cada caso se emplearon sistemas diferentes de aislamiento y purificación del material axoplásmico que describimos en detalle en la revisión del Anexo 1. Sin embargo, estas metodologías no distinguen entre las proteínas axonales transportadas desde el soma de aquellas que son neo-sintetizadas localmente. En este apartado se diseñaron protocolos que combinados con espectrometría de masas permiten identificar parte del proteoma neo-sintetizado axonal. Hasta el momento las tecnologías diseñadas para este fin incluyen el sistema *pulse Stable Isotope Labeling with Amino Acids* o “*pSILAC*” en axones de *RGC* (Cagnetta *et al.*, 2018) y neuritas de *iNeurons* (Zappulo *et al.*, 2017); *Stable Isotope Labeling of Mammals* o “*SILAM*” en cerebro de ratón (Heo *et al.*, 2018) y *Quantitative Noncanonical Amino acid Tagging* o “*QuanCAT*” también en “*iNeurons*” (Zappulo *et al.*, 2017). Brevemente, los protocolos de *pSILAC* utilizan aminoácidos elaborados con isótopos pesados que posteriormente son incorporados a los péptidos de las proteínas neo-sintetizadas, lo que permite diferenciarlas por espectrometría de masas de los aminoácidos “livianos” correspondientes a las proteínas que ya estaban presentes previo al pulso (Chen *et al.*, 2015).

El SILAM es una variante del protocolo *pSILAC*, solo que en este caso se alimenta al animal con aminoácidos pesados para evaluar neo-síntesis en tejidos enteros (Rauniyar *et al.*, 2013). Por último, el *QuanCAT* combina el marcado de *pSILAC* con la incorporación de aminoácidos no canónicos análogos de metionina (usualmente azidohomoalanina o “AHA” u homopropargilglicina o “HPG”). El sistema que utiliza estos aminoácidos pero sin incorporar el protocolo de *pSILAC* se conoce como “*Bio-Orthogonal Non-Canonical Amino acid Tagging*” o *BONCAT* (Landgraf *et al.*, 2015).

En resumen, ha habido importantes avances en proteómica axonal tanto para identificar proteínas totales como neo-sintetizadas, pero fueron desarrollados casi únicamente en modelos axonales *in vitro*. Se ha reportado que los axones cultivados presentan características de axones regenerantes y no cuentan con la interacción de las células vecinas, por lo cual no reflejan completamente el estado nativo de los axones *in vivo* de animales adultos (Sotelo *et al.*, 2014; Al-Ali *et al.*, 2017). Por tanto, los ensayos de proteómica axonal *in vivo* podrían aportar información importante para comprender el metabolismo de axones maduros en su contexto nativo. Los primeros estudios de proteómica reportados en axones *in vivo* de mamíferos fueron desarrollados a partir de material axoplásmico obtenidos de nervios ciáticos incubados en buffer isotónico desarrollados por el grupo de Fainzilber y colaboradores (Hanz *et al.*, 2003; Perlson *et al.*, 2005; Yudin *et al.*, 2008). Sin embargo, este protocolo mostraba en los análisis de proteómica una proporción importante de proteínas no axonales o “contaminantes”, especialmente provenientes de proteínas del suero. El mismo grupo realizó mejoras al protocolo (Rishal *et al.*, 2010) utilizando una incubación previa en buffer hipotónico (para detalles del protocolo, consultar la sección 5.8 de Materiales y Métodos en la página 48). De esta forma, lograron detectar mediante espectrometría de masas combinado con el sistema *iTRAQ* de proteómica cuantitativa un total de 942 proteínas en el material axoplásmico aislado de nervios ciáticos de ratas adultas con un menor número de contaminantes que en ensayos anteriores con buffer isotónicos de extracción (Michaevlevski *et al.*, 2010a). Sin embargo, la variabilidad entre las réplicas biológicas fue muy elevada, en parte por el gran número de animales utilizados para cada réplica (100 animales), la poca cantidad de material axoplásmico que se puede extraer por animal y la baja capacidad de detección del sistema *iTRAQ*, especialmente en muestras con bajo concentración de proteínas como son los axones

(Dowle *et al.*, 2016). Esto dificulta el análisis de qué procesos celulares o funciones moleculares están sobrerrepresentadas en los axones analizados en condiciones basales y de injuria (Michaevlevski *et al.*, 2010a). Sería de gran interés poder obtener un proteoma axonal de material *in vivo* más robusto, con menor variabilidad entre réplicas, utilizando un menor número de animales y que aproveche herramientas de proteómica cuantitativa modernas con una mayor capacidad de detección como los protocolos de marcado libre cuantitativo (del inglés “*Label Free Quantitative Proteomics*” o *LFQ*). Por otra parte, también se podría combinar estos sistemas de gran sensibilidad de detección con protocolos de marcado de proteínas neo-sintetizadas (por ejemplo, *BONCAT*) para obtener una lista de qué proteínas son traducidas localmente en axones maduros *in vivo*.

## **2.8. Aportes de esta tesis al tópico de la síntesis proteica local axonal.**

Considerando que la localización de los ARNm es un factor esencial para definir su síntesis local en el axón y que ésta última es importante en eventos de crecimiento y regeneración axonal donde aún se desconocen el papel regulatorio de componentes río abajo de la vía mTOR (como es el caso de *Pdcd4*) es que planteamos estudiar:

- \* La SPL de proteínas que son esenciales para el mantenimiento estructural del axón como lo son los neurofilamentos, en específico de la subunidad menor o NefL, dada su discusión actual respecto a su neosíntesis local en axones.
- \* Si *Pdcd4* es un regulador del crecimiento axonal, si cambia su expresión en axones sometidos a injuria (donde mTOR está activo) y si es sintetizado localmente en axones.
- \* El proteoma de axones periféricos de animales adultos *in vivo* mediante protocolos de proteómica cuantitativa, tanto en condiciones basales como de injuria, poniendo a punto un protocolo para identificar qué proteínas son neo-sintetizadas en los mismos mediante ensayos por espectrometría de masas.

### **3) HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

*Existen dominios axonales donde ocurre la síntesis local de proteínas, siendo un proceso relevante para el mantenimiento de proteínas estructurales tales como los neurofilamentos y regulado por cascadas de señalización como la vía de mTOR-PDCD4. Dicha modulación regula la traducción de al menos parte del proteoma axonal impactando en procesos tales como el crecimiento y la regeneración axonal.*

### **4) OBJETIVOS.**

#### **4.1. Objetivo General.**

Contribuir al entendimiento de los procesos de regulación de la síntesis proteica local y el proteoma axonal.

#### **4.2. Objetivos Específicos.**

- 1) Estudiar la localización axonal de proteínas neo-sintetizadas en el axón, analizando si el Neurofilamento Liviano (NefL) es sintetizado localmente mediante el protocolo de “PURO-PLA” y analizando la señal fluorescente con alta resolución óptica mediante microscopía confocal.
- 2) Estudiar el rol de la proteína Pdc4 en el crecimiento axonal *in vitro* mediante su silenciamiento y sobreexpresión en cultivos primarios de neuronas corticales (como modelo de sistema nervioso central) y de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (como modelo de sistema nervioso periférico).
- 3) Identificación de las proteínas totales y las neo-sintetizadas en axones *in vivo*, en estado basal y regenerante, mediante espectrometría de masas combinado al sistema “BONCAT”.

## **5) MATERIALES Y MÉTODOS.**

En esta sección se enumeran todos los protocolos realizados para el desarrollo de esta tesis. Para aquellos que están detallados dentro de las publicaciones científicas, mencionaremos el número del artículo y la página de la tesis donde pueden consultarse los mismos. Así mismo, las metodologías que no estén dentro de los artículos, serán descritas en detalle en esta sección.

### **5.1. Procedimientos quirúrgicos (Capítulos. I, II y III).**

El mismo protocolo de lesión de nervio ciático en ratas adultas fue realizado en los tres capítulos de esta tesis. Consistió en una incisión completa del mismo analizando únicamente el cabo proximal 18 horas post injuria. Este protocolo fue aprobado por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) código 005/01/2014. Los detalles del protocolo están en los materiales y métodos suplementarios del Artículo I, Anexo 3 de esta tesis página 209.

### **5.2. Protocolos de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica (Capítulos I y II).**

- Para los experimentos del Capítulo I se realizaron los mismos pasos que en los protocolos de inmunohistoquímica descritos para el Capítulo II, pero combinados con el protocolo de Puro-PLA. Los mismos se detallan en los materiales y métodos suplementarios del Artículo 1, Anexo 3 de esta tesis páginas 212-213 para cada tejido y tipo celular.

### **5.3. Protocolo de Puro-PLA (Capítulos I y II).**

Se extraen las piezas de nervio ciático (en Capítulo I) o raíces ventrales (en Capítulo II) en estado basal o lesionado y en el caso de los primeros se retiran sus epineuros en medio DMEM o RPMI bajo lupa. Luego se incuban con puromicina 300 uM en el mismo medio durante 30 minutos. En el caso del control con anisomicina, se hace una preincubación con dicha droga a una concentración 400 uM durante 40 minutos seguido de una co-incubación puromicina-anisomicina (300 uM / 400uM) por 30 minutos y se pasan los tejidos a DMEM/RPMI por 1 minuto. Todas estas incubaciones son a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Luego se incuban los nervios en colagenasa 0.225 mg/mL + 5 mM CaCl<sub>2</sub> en buffer PHM (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 2 mM

MgCl<sub>2</sub>) 20 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> para favorecer la entrada de los anticuerpos al tejido en los pasos posteriores. Luego se procede a la fijación en PFA 4% en buffer PHM, TA, lavados 3x5 min, incubaciones en Sacarosa 15% y 30% en buffer PHEM (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) y cortes al criostato de 20 uM. Sobre los cortes se realiza el protocolo de PLA *in situ* siguiendo los pasos del fabricante del kit “DuoLink” el cual consiste en un ensayo de ligación por proximidad combinado con un PCR *in situ* (ver Figura 4). Inicialmente se realiza la incubación con los anticuerpos primarios, en este caso anti-puromicina de ratón (1/2000) y anti-NefL de conejo (1/200) (Capítulo I) o anti-PDCD4 de conejo (1/200) (Capítulo II) ON, 4°C. Luego se incubaba con los anticuerpos secundarios del kit (llamados “*plus*” y “*minus*”) que reconocen la región conservada de los anticuerpos primarios de ratón y conejo a una concentración de 1/5 en buffer de bloqueo (2% glicina, 3% BSA en buffer PHEM) los cuales están conjugados a oligos de ADN complementarios. En caso de estar a menos de 40 nm de distancia, estas moléculas son capaces de hibridar formando un producto doble hebra de ADN circular. Posteriormente se realiza una incubación en presencia de una enzima ligasa 30 minutos, 37°C (para “cerrar” el producto de ADN recién formado) seguido por una reacción de PCR llamada “*Rolling Circle Amplification*” para amplificar el producto de ADN durante 100 minutos a 37°C. Este último paso se realiza en un buffer de amplificación que contiene una enzima ADN Polimerasa modificada para presentar actividad enzimática a dicha temperatura y sondas fluorescentes que presentan complementariedad con la secuencia de ADN que se está amplificando. Como resultado se generan spots fluorescentes en los sitios donde se encuentren los péptidos truchos de puromicina correspondientes a las moléculas de NefL (Capítulo I) o Pcd4 (Capítulo II) neo sintetizados.



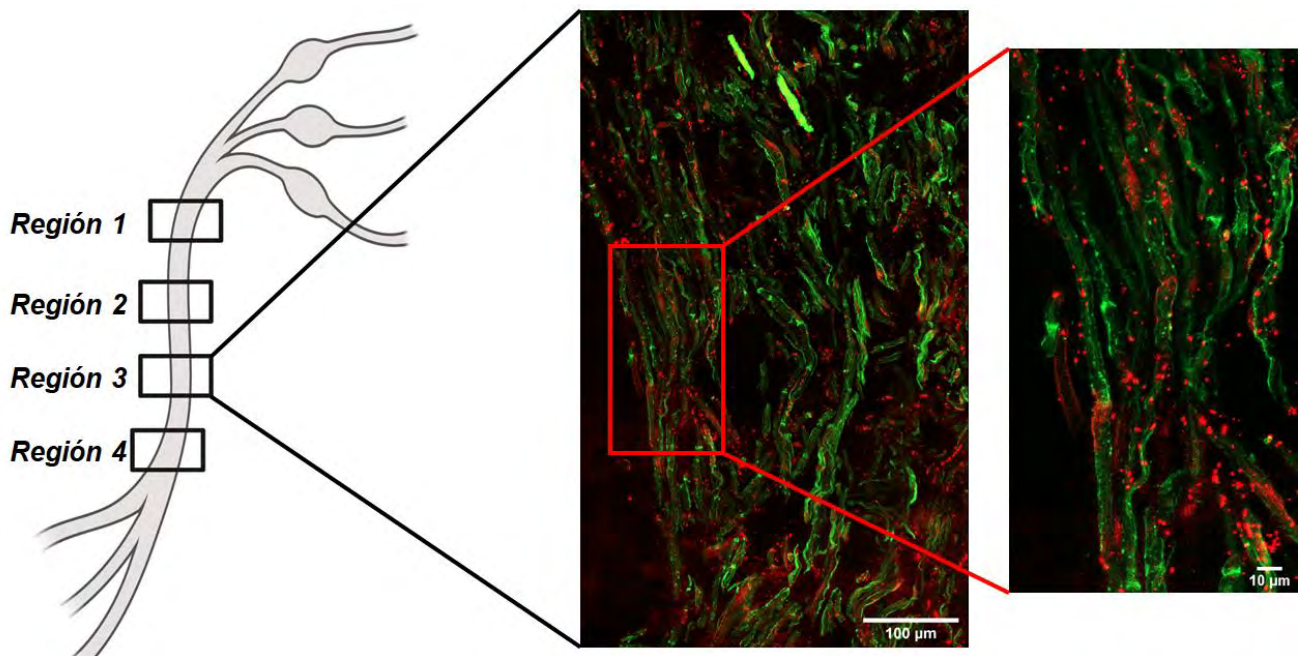
**Figura 4.** Pasos básicos del PLA. Etapas del protocolo de ligación por proximidad entre dos anticuerpos que permite reconocer las proteínas de interés que en el caso del PLA son la puromicina del péptido naciente y la proteína de interés.

## 5.4. Cuantificación y Análisis de Imágenes (Capítulos I y II).

### 5.4.1 Cuantificación de señal de fluorescencia para PURO-PLA.

Para los experimentos de PURO-PLA de los Capítulos I y II (para analizar la neosíntesis de NefL y Pdc4, respectivamente) se diseñaron protocolos tanto para la adquisición de las imágenes (para ser representativos de la señal distribuida en toda la extensión longitudinal de los cortes de nervio ciático) como para cuantificar en forma semi-automatizada los spots fluorescentes de PURO-PLA en cada imagen.

5.4.1.1. Selección de las áreas de interés (ROIs). Dada la gran extensión (del orden los los 3-4 mm) de cada crío-corte de nervio ciático en sentido longitudinal seleccionamos 4 ROIs diferentes distribuidas a lo largo del nervio de tamaño 670 x 540  $\mu\text{m}$ , donde cada una de ellas es un mosaico o “stitching” de imágenes de confocal tomadas con una magnificación de 20x (Ver esquema adjunto Figura 5). De esta forma se adquiere imágenes representativas de todas las zonas del tejido desde proximal a distal. Por cada imagen se obtienen 3 señales de forma secuencial: Faloidina conjugada con Alexa Fluor 488 (contratinción para ubicar los filamentos de actina), DAPI y la señal del PLA cuyas sondas presentan fluorocromos de CY5.



**Figura 5. Esquema del protocolo de selección de ROIs representativos de las distintas regiones del nervio ciático.** A la izquierda se muestra un esquema de un nervio ciático mostrando las 4 regiones seleccionadas. Al centro se indica una imagen en *stitching* o mosaico de magnificación 20x incluyendo únicamente la Región 3. A la derecha se muestra una imagen aumentada de la Región 3 para mostrar cómo pueden identificarse fácilmente los spots de PLA. La señal verde corresponde a la faloidina y la roja al PLA.

5.4.1.2. Cuantificación de la señal de PURO-PLA. Se utilizaron 2 estrategias para la cuantificación de la señal de PURO-PLA, ambas utilizando el software de procesamiento de imágenes *FIJI*.

- La estrategia “A” fue diseñada junto con el licenciado Joaquin Garat del Departamento de Genómica del IIBCE y tiene como objetivo “contar” los spots de PLA por unidad de área tanto del tejido completo como del dominio axonal (Figura 6, página 42). El protocolo consiste en los siguientes pasos:

a. Realizamos una proyección máxima con el comando *Maximum Intensity Projection* seleccionado 10 um del stack en todos los casos. De esta forma se obtiene una imagen única que contiene todos los planos adquiridos en el stack (ver Figura 6A).

b. Convertimos las imágenes al formato 8 bits y en el canal de la Faloidina ajustamos el *threshold* de modo tal que queden marcadas todas las regiones del tejido como se muestra en la Figura 6B. Del mismo modo ajustamos el *threshold* de la señal de PLA de modo que claramente se distinguen los spots de PLA respecto al *background* (Figura 6C). Una vez fijado los valores de *threshold* de PLA, mantuvimos el mismo valor de forma tal que los resultados entre normal y lesión sean comparables. El ajuste del *threshold* convierte a ambos canales en imágenes binarias.

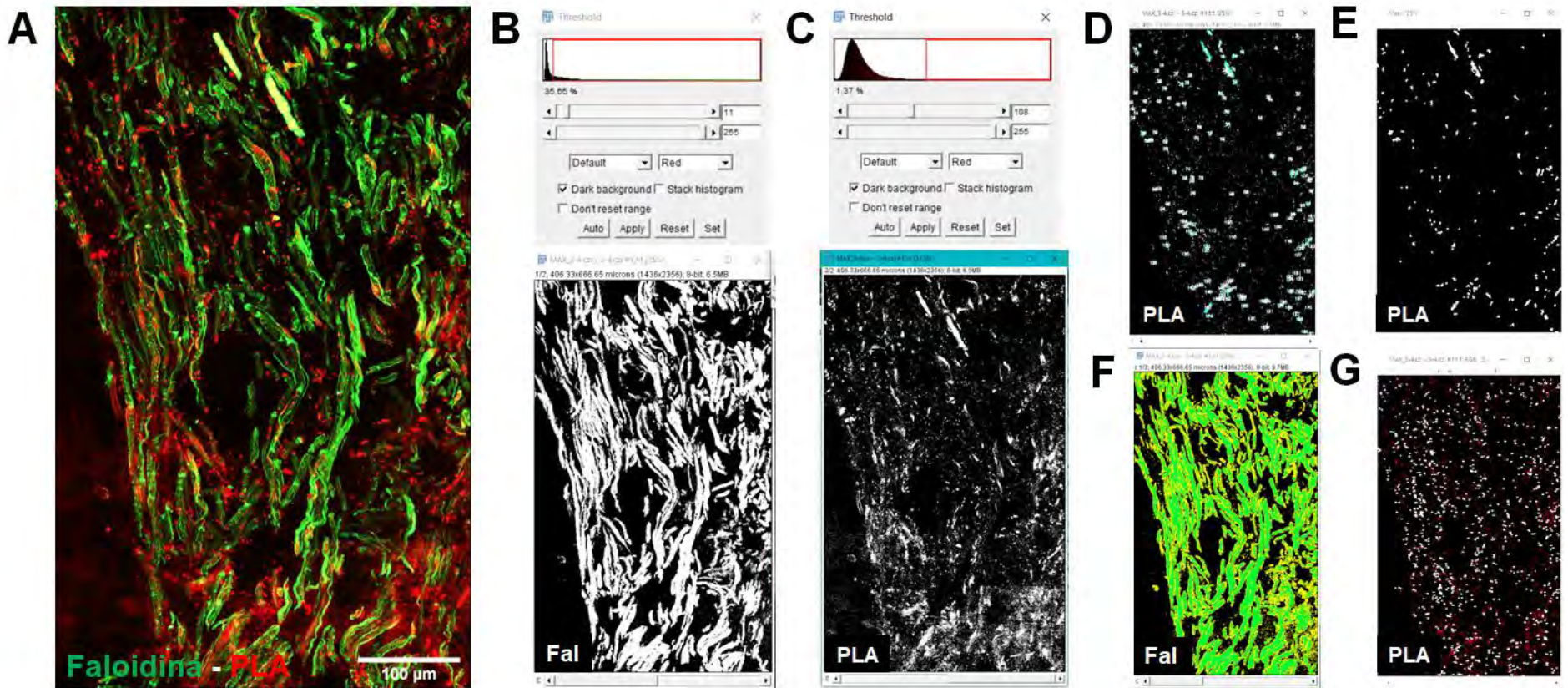
c. Luego seleccionando el canal del PLA aplicamos el comando *Analyze Particles* del software con los parámetros “*circularity*” en 0-1, el *size-particle*<sup>2</sup> en pixel units con valores entre 6-30 y en la pestaña “*show*” seleccionamos la opción “*Mask*”. De este modo se obtiene una nueva imagen que corresponde a una “máscara” de la señal del PLA que seleccionará únicamente los spots de PLA (Figura 6D) dejando afuera posibles partículas más pequeñas del *background*, agregados de sonda fluorescente o productos con muy alta amplificación de



señal de tamaños mayores a los spots de PLA. El resultado de los spots seleccionados se muestra en la Figura 6E.

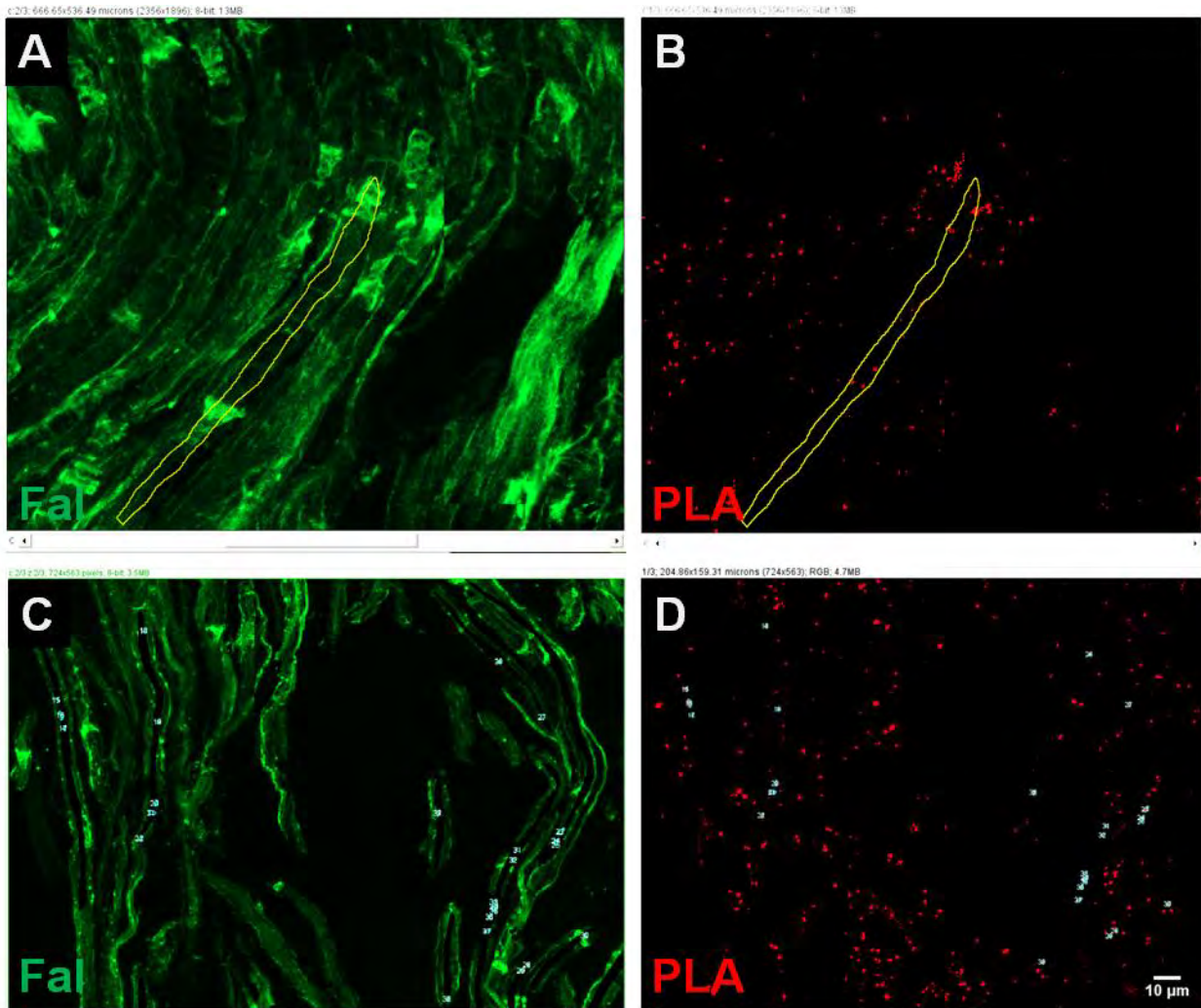
d. Separamos los canales de faloidina, y la señal de PLA original con el comando *split channels* y luego realizamos un *merge* entre los mismos y la máscara del PLA con los spots seleccionados.

e. Utilizamos el comando selección en el canal de la faloidina para seleccionar solo las zonas del tejido, evitando aquellas que no corresponden a las fibras (Figura 6F), pasamos al canal de la máscara del PLA y repetimos el comando *Analyze Particles*, pero en este caso en la pestaña show seleccionamos “*Overlay*” y en los *Measurements* seleccionamos las opciones *Summarize* y *Display Results*. De esta forma obtenemos una tabla donde están cuantificados el número de spots de PLA, el área total seleccionada y una imagen donde se muestra los spots contados “encima” de la imagen original del PLA (Figura 6G).



**Figura 6. Estrategia “A” de cuantificación de los spots de PLA en el nervio entero. (A)** Proyección máxima de una región del nervio ciático mostrando el merge de las señales de Faloidina y PLA (en este caso del NefL). **(B) Arriba:** selección del *threshold* del canal de faloidina. **Abajo:** imagen en binario del canal de faloidina. **(C) Arriba:** selección del *threshold* del canal de PLA. **Abajo:** imagen binaria del canal de PLA. **(D)** Máscara del PLA mostrando los spots seleccionados en función del tamaño y circularidad. **(E)** Spots de PLA seleccionados tras aplicar la máscara. **(F)** Selección del área en el canal de la Faloidina. **(G)** Spots de PLA cuantificados (en blanco) respecto al total de señal de PLA original de la imagen (rojos).

Para cuantificar únicamente los spots de PLA en el dominio axonal, una vez fijado el *threshold* en el canal del PLA, se seleccionaron manualmente regiones axonales en el canal de la faloidina (Figura 7A) para luego pasar al canal del PLA y correr el comando *Analyze Particles*, cuantificando los spots de PLA presentes en cada axón (Figura 7B) y considerando también el área del mismo para la normalización. Se identificaron 50 axones por imagen. En las Figuras 7C-D se muestra un ejemplo en una región de la imagen original.



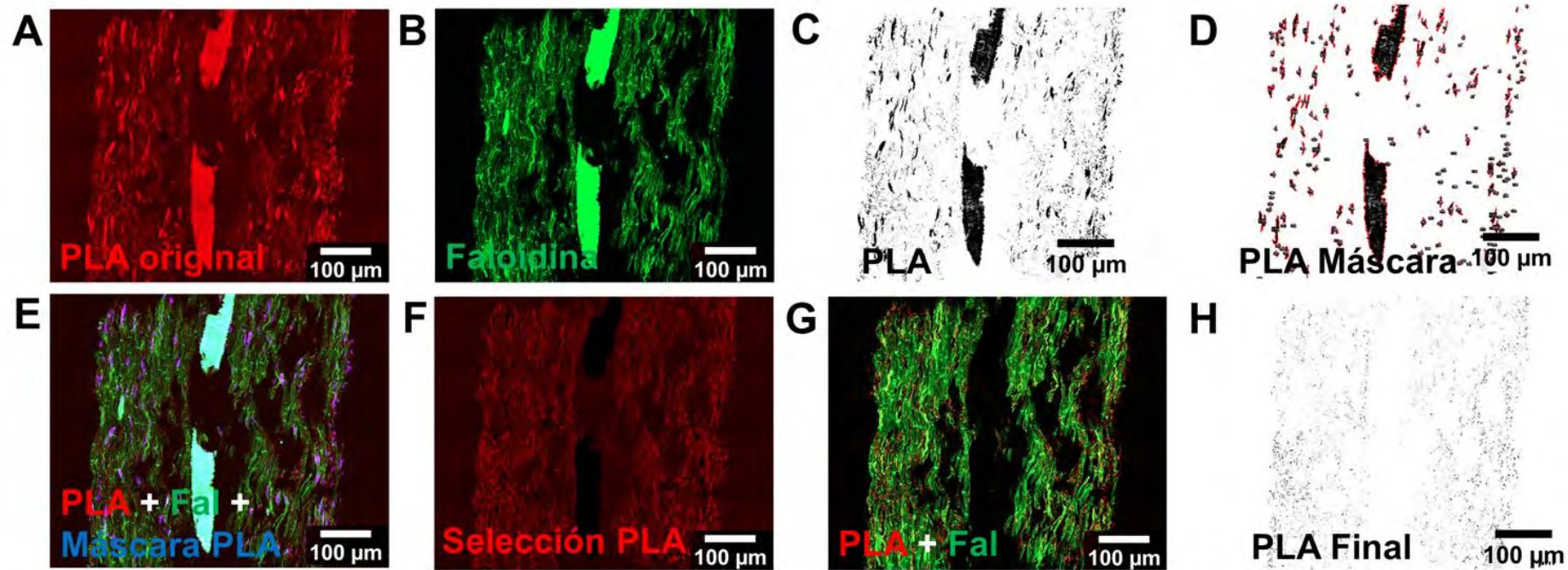
**Figura 7. Cuantificación de spots de PLA en el dominio axonal mediante Estrategia “A” de cuantificación. (A)** Ejemplo de selección de una región axonal utilizando el canal de la Faloidina. **(B)** Spots de PLA contenidos en la región seleccionada en (A). **(C)** y **(D)** Máscara de los spots de PLA axonales en el canal de la Faloidina y del PLA, respectivamente.

- La estrategia “B” fue diseñada por el laboratorio de Schuman y colaboradores, quienes son expertos en el estudio de síntesis de proteínas mediante experimentos de PURO-PLA principalmente en dendritas utilizando modelos *in vitro* (tom Dieck *et al.*, 2015; Hafner *et al.*, 2019; Biever *et al.*, 2020; Glock *et al.*, 2020). Este protocolo consiste en un *macro* diseñado para *FIJI* (Figura 8). El input del macro es una imagen de proyección máxima que contenga 2 canales, uno con la contratinción, faloidina en este caso (Figura 8A), y otro con la señal del PLA (Figura 8B). Dado que esta última en general presenta marca inespecífica nuclear (que en nuestra estrategia de cuantificación se elimina seleccionando un rango de tamaños en el paso “c”, página 40) la misma es en este caso removida previamente a aplicar el macro mediante los siguientes comandos: *split channels*, duplicación del canal del PLA, al duplicado le aplicamos un *threshold* donde se evidencien claramente los núcleos (Figura 8C) y corremos el comando *Analyze Particles* pero en este caso con un “*size*” mayor a 130 pixel units para que solo queden seleccionados los núcleos marcados y otros elementos de mayor tamaño (Figura 8D). Luego se hace un *merge* entre esta máscara (ahora en azul), la señal del PLA original y la faloidina (Figura 8E) se hace una selección de los ROIs de la máscara y se borra la señal en los otros 2 canales. El resultado para el canal del PLA se ve en la Figura 8F. Finalmente se corren los comandos *split channels*, se borra la máscara y se hace un *merge* entre los canales de faloidina y PLA con los ROIs de los núcleos eliminados (Figura 8G). Esta imagen será el input del macro de Schuman y colaboradores que describimos a continuación.

**a.** Previo a ejecutar el macro, seleccionar el *threshold* para el canal del PLA que mejor se ajuste al batch de imágenes adquiridas ya que para obtener resultados comparables se utiliza el mismo valor de *threshold* en todos los casos.

**b.** Dentro del macro seleccionamos el número de dilataciones de la máscara correspondiente a la contratinción, en este caso de la faloidina (es decir, el número de veces que se va a expandir los límites del *threshold* fijado para la imagen). En este caso este valor de dilatación fue fijado en 1. Luego el macro solicita si en los pasos siguientes deseamos borrar regiones no deseadas de la señal del PLA y de la faloidina, las cuales serán clickeadas. También pregunta si queremos autocompletar la señal correspondiente al soma lo cual no es válido para nuestro análisis y por tanto esta opción permanecerá desclikeada.

- c. Posteriormente nos pregunta si deseamos guardar los ROIs que obtengamos a lo cual le diremos que sí y le marcaremos en que canal se encuentra el PLA y en cual la faloidina.
- d. Luego solicita le indiquemos el valor del *threshold* para el canal del PLA (que será usado en todas las imágenes) el cual ya definimos en el paso “1”. En este momento le indicaremos el directorio donde tenemos todas nuestras imágenes listas para correr el análisis.
- e. Para cada imagen nos pedirá que definamos el *threshold* de la contratinción y le indiquemos si deseamos borrar ROIs manualmente en las imágenes de la faloidina y/o del PLA. Por último, nos preguntará si queremos conservar el número de spots de PLA que fueron eliminados en este paso.
- f. Finalmente en la carpeta *batch process* el macro nos muestra en una Tabla Excel llamada *Result\_Summary* una serie de datos en columnas. La que nosotros utilizamos para las cuantificaciones es la columna de “*PLA-AREA normalized*” que incluye el total de área cubierta por PLA normalizado por el total del área de la máscara seleccionada en cada imagen. Además, dentro de los resultados el macro tiene como output una imagen de los spots de PLA cuantificados en cada caso (Figura 8H).



**Figura 8. Estrategia “B” de cuantificación de la señal de PLA en el nervio entero.** (A) Proyección máxima de una región del nervio ciático mostrando la señal del PLA. (B) Lo mismo que en (A) pero para la faloidina en la misma región. (C) *Threshold* aplicado al canal del PLA para evidenciar los spots de PLA y señales inespecíficas. (D) Máscara aplicada a la imagen de la Figura (C) pero solo seleccionando señales inespecíficas del PLA (núcleos celulares y otras). (E) Merge entre la señal del PLA original (rojo), la faloidina (verde) y la máscara de la Figura (D) (en azul). (F) Canal del PLA sustrayendo las señales inespecíficas (incluyendo los núcleos). (G) Merge entre la selección de PLA (F) y la faloidina (B), que será la imagen input para correr el macro de *FIJI* diseñado por Schuman y colaboradores. (H) Máscara de la señal de PLA cuantificada tras aplicar el macro de Schuman y colaboradores.

#### 5.4.2. Cuantificación de señales de fluorescencia de proteína total.

Las estrategias de análisis de imágenes utilizadas en el Capítulo II (con excepción de las asociadas al PURO-PLA para *pdcd4*) se detallan en los materiales y métodos suplementarios del Artículo 1, Anexo 3 de esta tesis en la página 215.

#### 5.5. Cultivos celulares (Capítulo. II).

En el Capítulo II se cultivaron neuronas corticales primarias de ratón E16, explantes de neuronas *DRG* primarias de rata E18 para los experimentos de sobreexpresión y silenciamiento de *PDCD4* y una línea celular de neuroblastoma (Neuro2a) para testear la especificidad del plásmido y siRNA de *PDCD4* mediante western blot. Los protocolos de cultivo están detallados en los materiales y métodos suplementarios del Artículo I, Anexo 3 de esta tesis en las páginas 209-211.

#### 5.6. Protocolos de transfección (Capítulo. II).

- En neuronas corticales de ratón E16 se utilizó para los protocolos de sobreexpresión de *PDCD4* un plásmido portador de la secuencia de cDNA de *PDCD4* de ratón donado por el Dr. Yang Hsin-Sheng de la Universidad de Kentucky seleccionable utilizando neomicina y el mismo plásmido sin la secuencia del gen como control. Para los experimentos de silenciamiento de *PDCD4* se empleó un pool de siRNAs para *PDCD4* y un pool control donde el primero contiene 3 secuencias que reconocen regiones diferentes del ARN de *PDCD4* y el segundo tres secuencias no presentes en el genoma de ratón. Los números de catálogo y detalles de las concentraciones y tiempos de incubación utilizados se encuentran en los materiales y métodos suplementarios del Artículo I, Anexo 3 de esta tesis en la página 211.

- En neuronas *DRG* de ratas E18 utilizamos un pool de siRNAs permeable de reconocimiento específico para *PDCD4* de rata y un pool de siRNA control con las mismas características de permeabilidad los cuales ingresan por sí solo a las células sin necesidad de protocolos complejos de transfección (lo cual es ideal para este tipo de neuronas no disociadas presentes en las *DRGs*). Los detalles del procedimiento también se encuentran en los materiales y métodos suplementarios del Artículo 1, Anexo 3 de esta tesis en la página 211.

## **5.7. PCR en tiempo real (Capítulo II).**

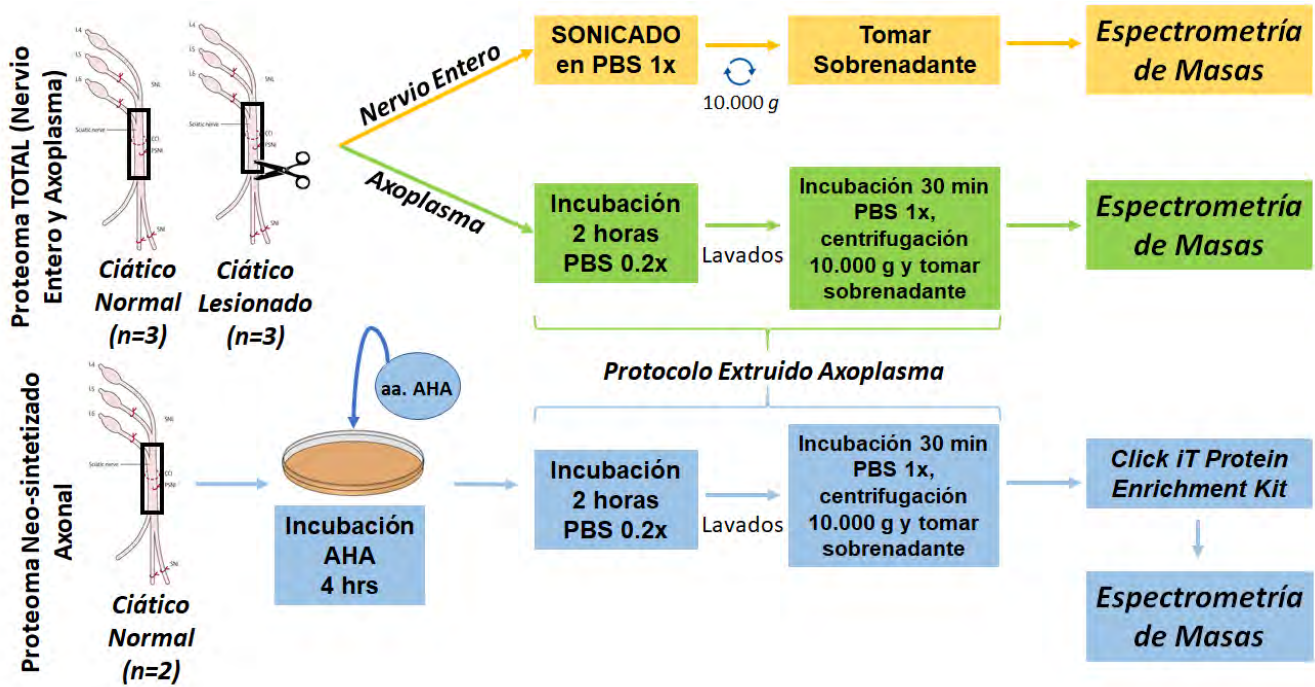
Los detalles del protocolo de PCR realizado a partir del material extraído del compartimento de los somas y de los axones en explantes de neuronas *DRG* de ratas E18 cultivadas en cámaras compartimentalizadas de 2 canales se detalla en los materiales y métodos suplementarios del Artículo 1, Anexo 3 de esta tesis en las páginas 211-212.

## **5.8. Protocolo de extracción de proteínas del material axoplásmico obtenido mediante el método de Fainzilber y colaboradores (Capítulo III).**

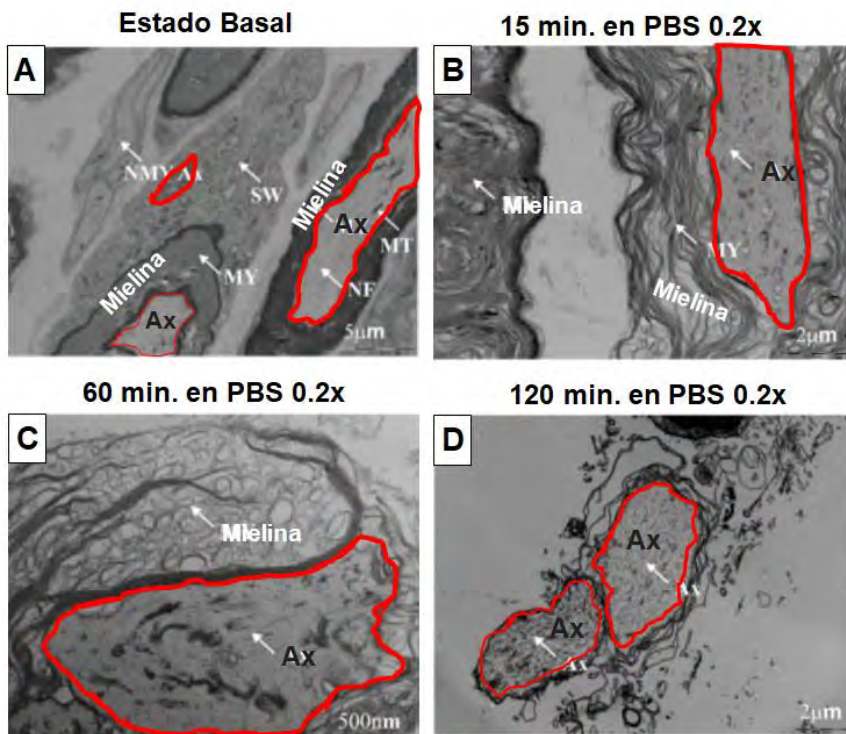
La estrategia utilizada fue la desarrollada por el grupo de Fainzilber y colaboradores (Rishal *et al.*, 2010) con pequeñas modificaciones. Un resumen de los pasos del protocolo se muestra en la Figura 9 (recorrido en verde del esquema).

Se extraen los nervios ciáticos (normal y lesionado), raíces ventrales y dorsales de ratas adultas. En el caso de los ciáticos, se retira el epineuro y se abren los fascículos con pinzas de disección N°5 en PBS 0.2x. Posteriormente se pasan a tubos eppendorf con PBS 0.2x y se incuban 2 horas a TA (250 uL por nervio). Este shock hipotónico produce una lisis a nivel de la mielina no así de los axones, como se muestra en las imágenes de microscopía electrónica de la Figura 10 (adaptada de Rishal *et al.*, 2010). Luego se realizan lavados en PBS 0.2x 3x5 minutos con rotación y luego se incuba en PBS 1x por 30 minutos, TA (150 uL por nervio). Finalmente, las muestras son centrifugadas 10.000 g por 10 minutos, 4°C y el sobrenadante (el cual contiene las proteínas extraídas) se transfiere a un tubo de "*low bind protein*". Se chequeó el estado de cada muestra mediante electroforesis desnaturalizante y tinción con nitrato de plata. Ejemplos del patrón de bandas se observa en la Figura 11A para el caso del material axoplásmico de raíces ventrales y dorsales y en la Figura 11B para los axoplasmas normal y lesionado de nervio ciático.

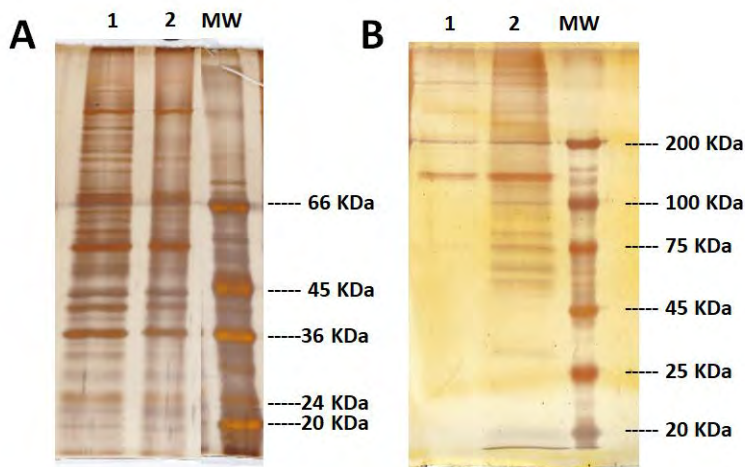




**Figura 9.** Resumen de los pasos para la extracción de proteínas totales y por el protocolo de *BONCAT* en tejido entero y axoplasma de nervio ciático.



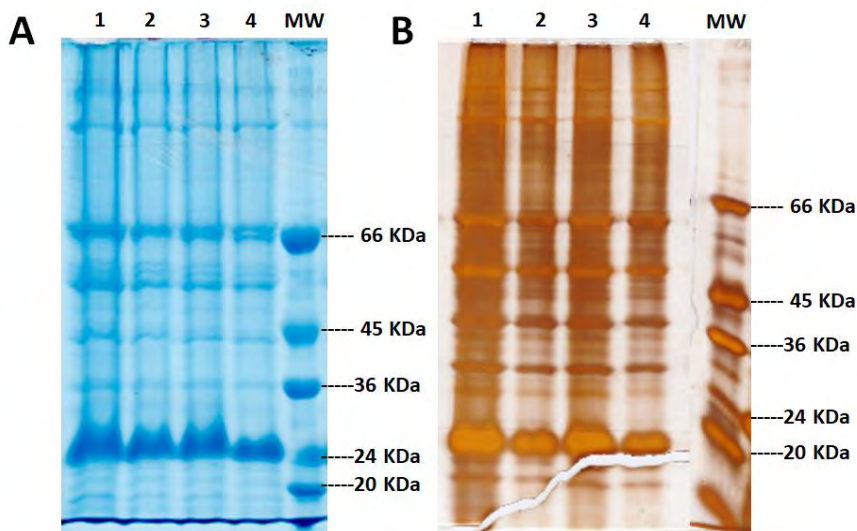
**Figura 10.** Efecto del shock hipotónico de incubar los fascículos de nervios ciáticos en PBS 0.2x a diferentes tiempos evidenciado por microscopía electrónica de transmisión. (A) Estado basal donde el axón está intacto y la mielina bien compacta (electrón-densa). (B) A los 15 min la mielina comienza a descompactar. (C) Se “vacuoliza” a los 60 min. (D) Desaparece casi por completo a los 120 min de incubación. Sin embargo, en ningún caso se lisa el dominio axonal (Ax: Axón) Adaptado de Rishal *et al.*, 2010.



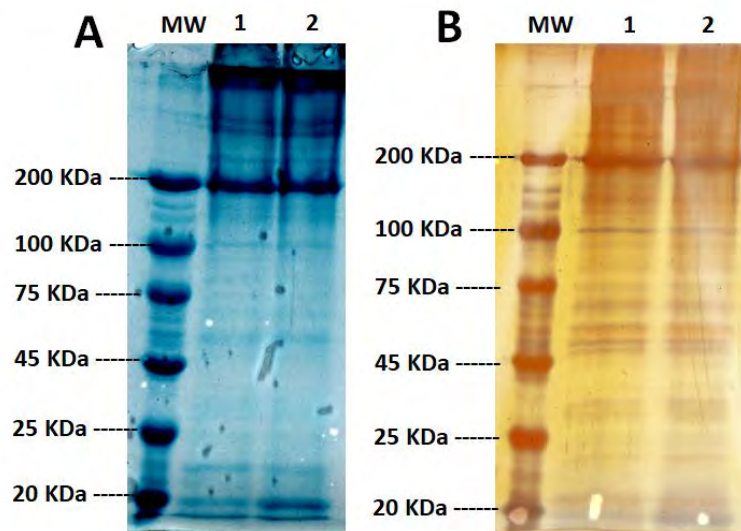
**Figura 11. Geles desnaturalizantes teñidos con nitrato de plata.** Se muestra el patrón de bandas de proteínas extraídas a partir del material axoplásmico de raíces ventrales-dorsales y nervio ciático. **(A)** Los carriles 1 y 2 son réplicas biológicas de un mix de raíces ventrales y dorsales. **(B)** Los carriles 1 y 2 indican el patrón de bandas correspondiente a las proteínas presentes en el axoplasma de nervio ciático normal y lesionado, respectivamente.

### 5.9. Protocolo de extracción de proteínas totales en nervios enteros (Capítulo III).

Una vez extraídas las piezas de nervio de los animales, las mismas fueron transferidas a PBS 1x frío y sonicadas en ciclos de 8 sonicaciones bajo las condiciones estándar del sistema. Luego se realizó una centrifugación a 10.000 g y se tomó el sobrenadante, evitando el pipeteo de la fracción lipídica. Un esquema del protocolo realizado se detalla en la Figura 8, recorrido amarillo (página 49). Posteriormente se analizó el estado general de las proteínas extraídas mediante geles desnaturalizantes en SDS para raíces ventrales-dorsales (Figuras 12A y 12B) y nervio ciático (Figura 13A y 13B) mediante tinción por coomassie o nitrato de plata.



**Figura 12. Geles desnaturalizantes teñidos con Coomassie o nitrato de plata mostrando el patrón de bandas obtenido del sonicado de raíces ventrales-dorsales enteras.** **(A)** Tinción por Coomassie de proteínas extraídas de raíces ventrales-dorsales donde cada carril es una réplica biológica. **(B)** Lo mismo que en (A) pero teñido con nitrato de plata.



**Figura 13. Geles desnaturalizantes teñidos con Coomassie o nitrato de plata mostrando el patrón de bandas obtenido por sonicado de nervio ciático enteros, normal o lesionado. (A) Tinción por Coomassie de proteínas extraídas de nervio ciático normal (carril 1) o lesionado (carril 2). (B) Lo mismo que en (A) pero teñido con nitrato de plata.**

### 5.10. Protocolo de extracción de proteínas neo-sintetizadas en el axón mediante *BONCAT* (Capítulo III).

Se incuban las piezas de nervio en medio DMEM para experimentos de *SILAC* en ausencia del aminoácido de metionina durante 1 hora, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. El objetivo de este paso es depletar parcialmente las reservas de metionina del tejido. Luego se incuba en medio completo (con todos los aminoácidos) pero en presencia también de un aminoácido ortólogo de la Metionina llamado *AHA* a una concentración de 1 mM durante 4 horas, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. De esta forma se mantiene un ratio de 5/1 entre *AHA*/Met, lo cual permite favorecer la incorporación del *AHA*, pero sin detener la síntesis de proteínas por falta de Met. Posteriormente se extrajeron los axoplasmas de acuerdo a los pasos del protocolo (sección 5.8. página 48). Los pasos del *BONCAT* para MS/MS se resumen en la Figura 9, recorrido azul (página 49) y la base química del proceso se resume esquemáticamente en la Figura 14.

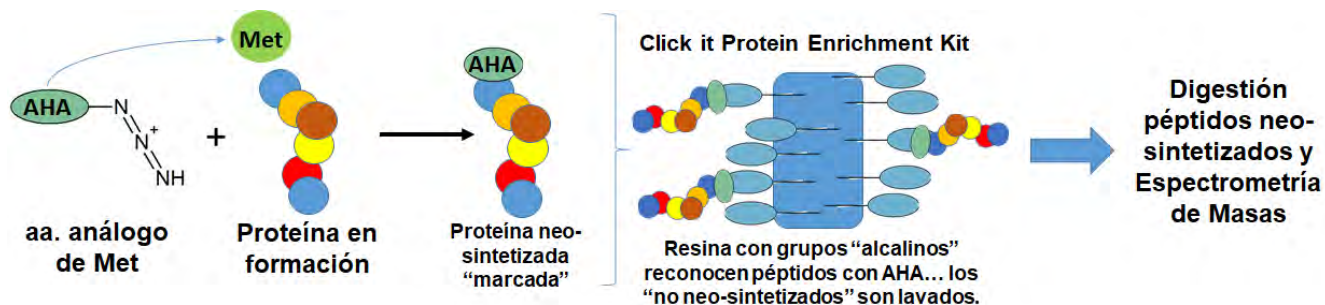


Figura 14. Esquema del proceso químico del protocolo de *BONCAT* para marcado de proteínas neo-sintetizadas incorporando el aminoácido ortólogo de Metionina "AHA" en péptidos nacientes. Esta molécula presenta un grupo azida que es reconocido por grupos alquilo presentes en una resina. Tras los lavados se mantienen unidos a la resina solo los péptidos con AHA que luego son digeridos y analizados por MS/MS.

### 5.11. Protocolos de extracción de péptidos, MS/MS para obtener los proteomas de axón y nervio entero y los análisis estadísticos asociados (Capítulo III).

Los pasos de estos protocolos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Thomas Kislinger en el Princess Margaret Cancer Research Center en Toronto, Canadá y se describen en detalle en la sección xx de los Materiales y Métodos del Artículo II, en las páginas 125-127 de la tesis.

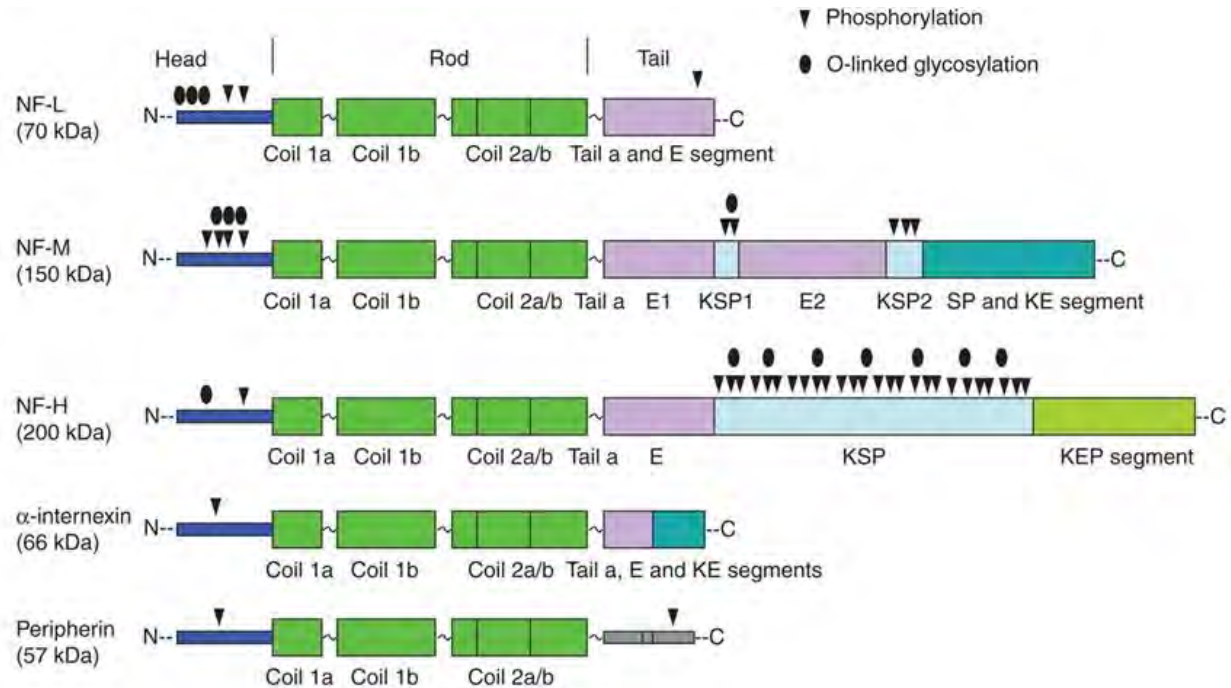
## **6) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **6.1) Capítulo I. Localización *in situ* de los sitios de neosíntesis del Neurofilamento Liviano en axones de nervio ciático *in vivo* mediante el sistema de PURO-PLA.**

#### **6.1.1) Introducción Capítulo I.**

Los neurofilamentos son una clase de filamento intermedio presente exclusivamente en las neuronas del SNC y SNP. Los mismos conforman a partir de heterodímeros de sus subunidades filamentos de unos 10 nm de diámetro, lo que corresponde a un tamaño “intermedio” entre los filamentos de actina (15 nm) y los de miosina de las fibras musculares (15 nm) (Yuan *et al.*, 2017). Los neurofilamentos constituyen polímeros compuestos por heterodímeros de proteínas conocidas como Neurofilamento Liviano (NEFL), Mediano (NEFM) y Pesado (NEFH) y son considerados filamentos intermedios de clase IV denominados así por su peso molecular aparente en geles de SDS-poliacrilamida. Así mismo estas proteínas se asocian con la proteína alfa-internexina (también categorizada como filamento intermedio del tipo IV) en SNC y con la periferina (filamento intermedio de clase III) en el SNP (Herrmann and Aebi, 2016). Para detalles respecto a la estructura de cada subunidad, consultar la Figura 15 en la página siguiente. Si bien estos polímeros pueden encontrarse formando filamentos funcionales en dendritas y el pericarion neuronal, alcanzan sus tamaños máximos y se distribuyen en gran número en los axones, especialmente en los mielínicos, pudiendo formar filamentos con un largo promedio de 118  $\mu$ m que tienden a agruparse en filamentos más grandes y presentando distancias muy pequeñas entre cada unidad individual (Burton and Wentz, 1992). Durante el proceso de maduración y una vez los axones han establecido sus contactos sinápticos, el número de neurofilamentos aumentan en forma exponencial lo cual está directamente asociado con un aumento del diámetro axonal y también va acompañado con un aumento, aunque menor, en el número de microtúbulos axonales (Sánchez *et al.*, 2000). Además, los neurofilamentos no se distribuyen uniformemente a lo largo del axón, sino que puede haber grandes diferencias en la

concentración de estas estructuras en diferentes regiones. A modo de ejemplo, se ha descrito que los neurofilamentos en axones del nervio óptico aumentan tres veces su cantidad hacia las regiones distales (Nixon and Logvinenko, 1986), mientras que se da el efecto opuesto en axones periféricos (Schlaepfer and Bruce, 1990) aunque con variaciones entre los nodos de Ranvier y los internodos, detectándose menor cantidad pero mayor empaquetamiento en los nodos dentro de un mismo axón (Hsieh *et al.*, 1994).



Aidong Yuan *et al.* Cold Spring Harb Perspect Biol  
2017;9:a018309

©2017 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

**Figura 15. Esquema general de los componentes de cada subunidad de los neurofilamentos y sus principales sitios de fosforilación** (Referencias: NF-L: Neurofilamento Liviano, NF-M: Neurofilamento mediano, NF-H: Neurofilamento Pesado, Head: Cabeza, Rod: Vara, Tail: Cola, N: Extremo N terminal, C: Extremo C terminal, KSP: repetidos de lisina-serina-prolina, E1 y E2: segmento enriquecido en residuos de ácido glutámico 1 y 2, KE: residuos de lisina y ácido glutámico, KEP: residuos de lisina-ácido glutámico-prolina, SP: residuos de serina-prolina, KSP: residuos de lisina-serina-prolina (Tomado de Yuan *et al.*, 2017).

En axones maduros, la proporción de NEFH aumenta en conjunto con la fosforilación de los brazos de esta subunidad y también del NEFM. Este fenómeno promueve la formación del

citoesqueleto de neurofilamentos, el cual se encuentra en estrecho contacto con otros elementos del citoesqueleto axonal aportando una estructura de soporte y sitios de anclaje para motores moleculares. Sin embargo, se discute aún cómo son dichas interacciones. El ensamblado de las diferentes subunidades no requiere de reacciones de hidrólisis pero si es muy dependiente de la fuerza iónica, el pH y la temperatura (Angelides *et al.*, 1989) y se da en una serie de etapas bien definidas, donde cada subunidad juega un papel importante para la formación de los filamentos. La revisión de Nixon y colaboradores del 2017 resume entre otras cosas como son los pasos del ensamblaje de las subunidades de neurofilamentos en detalle (Yuan *et al.*, 2017) y en lo que respecta a los tiempos de ensamblado, un trabajo de Sobel y colaboradores de 1986 reporta que el polímero base se forma entre los 15 y 30 minutos posteriores a la síntesis de cada subunidad (Black *et al.*, 1986). Este dato será importante a la hora de evaluar las señales de neosíntesis de NEFL que presentamos en los resultados de esta sección.

#### **6.1.1.1. Fosforilación de los neurofilamentos.**

Un elemento crucial para definir la función de los neurofilamentos y su conformación espacial en el axón son las modificaciones postraduccionales, siendo la más destacada y analizada la fosforilación ya que estas moléculas se encuentran entre las más altamente fosforiladas del cerebro. Para la regulación de este proceso se requiere un fino equilibrio entre el accionar de kinasas y fosfatasa y ello juega un rol central en el transporte de estos polímeros a lo largo del axón y en el tamaño que pueden alcanzar los mismos. Todas las subunidades presentan una cabeza (“head”, color azul en Figura 15) amino terminal con sitios de fosforilación pero solo el NEFM y el NEFH presentan múltiples sitios de fosforilación en las colas (“tails”, color rosa en Figura 15) carboxi-terminales (Nixon and Sihag, 1991). La dinámica de fosforilación es diferente para cada región siendo que la aminoterminal sucede mayoritariamente en el cuerpo neuronal y tiende a desfosforilarse al ingresar al axón (Nixon and Sihag, 1991). Lo opuesto sucede con las colas de los NEFM y NEFH, que solo se fosforilan cuando ya los filamentos se han ensamblado en grandes polímeros, han ingresado al axón y presentan una muy lenta desfosforilación (Nixon *et al.*, 1994a, 1994b). La fosforilación de las colas se piensa es importante para la expansión radial axonal la cual se da junto a la acumulación de los neurofilamentos (Sherman *et al.*, 2012) y se cree que puede

mediar en la concreción de las conexiones sinápticas y la mielinización axonal aunque se desconoce los detalles del mecanismo de acción (de Waegh *et al.*, 1992). Además, se ha descrito que la fosforilación es importante para prevenir el clivaje y degradación de los neurofilamentos, los cuales una vez alcanzan tamaños grandes y con altos niveles de fosforilación, alcanzando tiempos de vida media extremadamente largos. Se han reportado tiempos de vida media que van desde unos pocos días en neuronas corticales *in vitro* (Cohen *et al.*, 2013; Dörrbaum *et al.*, 2018; Mathieson *et al.*, 2018), 55 días por estudios de marcado radiactivo *in vivo* (Nixon and Logvinenko, 1986) - donde los autores discuten que podrían incluso estar subestimando dicho tiempo debido a pérdidas de señal de los aminoácidos radiactivos - 90 días en sinaptosomas aislados de neuronas de hipocampo *in vivo* (Heo *et al.*, 2018) e incluso hasta 8 meses en un estudio donde se expresó el NEFI en ratones *knockout* para dicha proteína (Millecamps *et al.*, 2007). En este último estudio también evidenciaron extraordinariamente bajos niveles de reposición de los filamentos y largos períodos de tiempo sin movimientos de dichas estructuras. En línea con esta hipótesis de la relación al menos indirecta entre la fosforilación de las colas de los NEFM y NEFH y la estabilidad de los filamentos, se ha descrito que la eliminación selectiva de las colas carboxi-terminales de dichas subunidades produce inestabilidad del citoesqueleto axonal y la degradación tanto del NEFL como de las otras subunidades truncas (Rao *et al.*, 2012).

#### **6.1.1.2. Transporte de los neurofilamentos en el axón.**

Si bien existe un número importante de trabajos donde se analiza este tema y a pesar de que se han desarrollado varias técnicas moleculares que permiten incluso visualizar los neurofilamentos moviéndose en tiempo real, aún existen controversias al respecto de cómo es el transporte de dichas moléculas. Una de las interrogantes es si estas estructuras son translocadas al axón como polímeros, como oligómeros y/o como subunidades individuales. En este contexto un interesante trabajo del grupo de Nixon y colaboradores, donde deletearon selectivamente cada una de las subunidades de los neurofilamentos mediante ratones *knockout* para cada una, demuestra que los heterodímeros de NEFM y alfa-internexina son la mínima unidad que puede transportarse a lo largo del axón sin NEFH ni NEFL. Por tanto el NEFL sólo no se transporta eficientemente (Yuan *et al.*, 2003). Vale notar que no se pudo comprobar si el NEFH puede transportarse solo ya que el doble *knockout* de NEFL y NEFM



es deletéreo. Estudios utilizando NEFL conjugado a GFP mostraron que existen filamentos cortos con gran capacidad de movimiento, preferentemente ubicados en los extremos proximales del axón y otros filamentos de mucho mayor tamaño y grado de polimerización con un transporte más lento y etapas estacionarias (Yuan *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que los heterodímeros son ensamblados en filamentos a medida que son transportados y en las etapas de maduración completa prácticamente todos los neurofilamentos axonales han sido integrados en una red de citoesqueleto estacionario (Nixon and Logvinenko, 1986). Por tanto, la teoría más apoyada en la actualidad describe el movimiento de los neurofilamentos como transporte lento de filamentos cortos con largos períodos de escaso o nulo movimiento de polímeros más grandes, preferentemente distales, altamente fosforilados y abundantes en axones maduros. Sin embargo, es importante mencionar que existen algunos grupos como el de Brown y colaboradores que cuestionan estas evidencias de transporte lento y acumulación distal, sugiriendo por modelos matemáticos que el transporte de los neurofilamentos tiene diferentes tasas de velocidad dictadas por su movimiento al azar donde los mismos estarían en un movimiento prácticamente continuo. Además objetan que ese “estancamiento” observado en los polímeros más grandes es generado por otras proteínas presentes en el tejido, que son confundidas con neurofilamentos en los estudios de Nixon y colaboradores (Li *et al.*, 2012). Estos autores proponen un movimiento bidireccional con pausas del orden de horas, pero no de días o semanas. La controversia continúa hasta la actualidad donde el grupo de Nixon y colaboradores sostiene que el modelo de “stop and go” de Brown no explica muchas de las observaciones del transporte de los neurofilamentos, sus excepcionales tiempos de vida media, su asociación con motores moleculares y los requerimientos energéticos excepcionales que serían precisos para movilizar agregados tan grandes a lo largo de los microtúbulos (Yuan *et al.*, 2013). Los últimos resultados del grupo de Brown admiten la existencia de polímeros con escaso movimiento en axones maduros, aunque manejan tiempos diferentes en dicho estancamiento (del orden de decenas de minutos). Estos autores realizaron un trabajo muy detallado observando el movimiento de los neurofilamentos en neuronas corticales *in vitro* de ratas neonatas transfectadas con NEFL conjugado a Green Fluorescent Protein (GFP) mediante microscopía de fluorescencia y sofisticadas herramientas de adquisición y análisis de imágenes, concluyendo que los neurofilamentos son transportados por ciclos dinámicos de “recorte y unión” donde la fosforilación cumple un rol

central (Uchida and Brown, 2021). Cuando se llega al balance entre ambos fenómenos, entonces se formarían los polímeros no móviles.

Por tanto, y a pesar de las discrepancias en cuanto a los tiempos de estancamiento de los agregados de neurofilamentos más grandes y a los mecanismos en torno a su transporte, existe un consenso en torno al escaso movimiento de los polímeros de neurofilamentos de gran tamaño y estabilidad. En este contexto es posible que las subunidades de neurofilamentos neo-sintetizados sean escasas y podrían cumplir un rol como precursores que “reponen y mantienen” el citoesqueleto de neurofilamentos. La idea mayormente aceptada es que estos nuevos neurofilamentos provienen del soma, pero se han aportado evidencias de que las subunidades de los neurofilamentos pueden también ser neo-sintetizados *in situ* en el axón. Las mismas provienen de trabajos pioneros realizados tanto en axón gigante de calamar por parte del grupo de Giuditta y colaboradores (Crispino *et al.*, 1993) como por nuestro grupo en nervio ciático de ratas adultas sometidas a injuria y separadas del soma neuronal (Sotelo *et al.*, 1992; Sotelo-Silveira *et al.*, 2000). Es importante mencionar que estos últimos estudios, si bien describen por hibridación *in situ* la localización periaxonal de los ARNm de los neurofilamentos, no pueden confirmar su neosíntesis axonal debido a las limitaciones de los protocolos de marcado por radiactividad combinados con electroforesis bidimensional y fluorografía, en donde es difícil de distinguir el componente mielínico del axonal. A pesar de estas evidencias entorno a la síntesis local de los neurofilamentos en el axón, existen grupos como el de Gainer y Lasek que durante mucho tiempo defendieron la idea de que estas señales de neosíntesis, en particular para el axón gigante de calamar, son en realidad contaminación de las células gliales aledañas o de proteínas transportadas desde éstas últimas al axón (Lasek *et al.*, 1977). Incluso, para el caso de los neurofilamentos, esta disputa continúa hasta fechas recientes donde se han analizando nuevamente datos publicados hace más de dos décadas (Gainer *et al.*, 2017; Crispino *et al.*, 2018). Por tanto, la elaboración de protocolos que permitan identificar a alta resolución la localización de las señales de neosíntesis de estas proteínas dentro del dominio axonal en modelos *in vivo* es de gran importancia ya que no existen aún trabajos que hayan evidenciado y localizado la neosíntesis axonal de estas proteínas. De hecho, se mantiene aún la disputa sobre si los

neurofilamentos pueden o no ser traducidos localmente en el dominio axonal o si corresponden a neo-síntesis en las células de Schwann.

El escenario actual de los neurofilamentos en axones de animales adultos muestra un citoesqueleto compacto, mayormente estacionario, de gran estabilidad y con una proporción mínima pero importante de subunidades libres o filamentos cortos que servirán de reposición para los más antiguos. Nosotros proponemos que la neosíntesis de estos neurofilamentos en axones adultos podría tener un rol preponderante sobre todo para reponer subunidades de filamentos que están en regiones distales, tanto en estado basal como de regeneración. Por ello planteamos diseñar un protocolo que permita visualizar la formación de nuevas subunidades de neurofilamento (en este caso de NEFL) en axones maduros *in vivo* en condiciones basales y de injuria con alta resolución óptica. Para ello adaptamos el protocolo de *Puromycin Proximity Ligation Assay* o “Puro-PLA” para axones maduros *in vivo* combinado con microscopía confocal (ver materiales y métodos, sección 5.3. página 37).

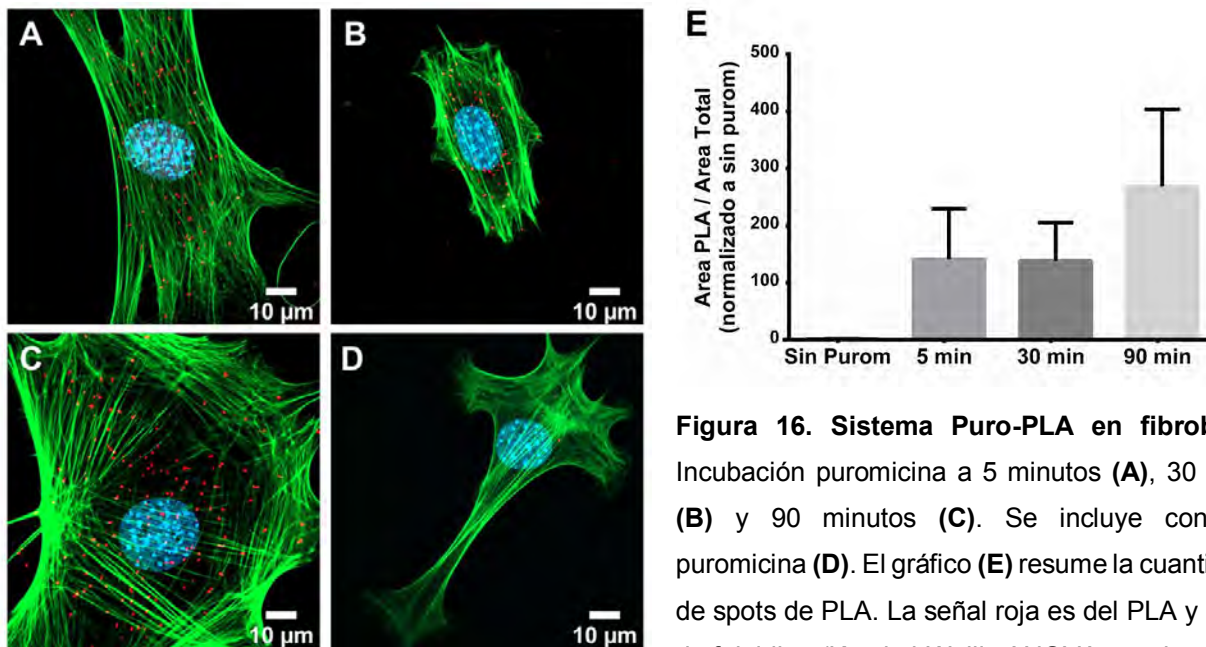
## **6.1.2) Resultados Capítulo I.**

### **6.1.2.1. La puesta a punto del protocolo de Puro-PLA en nervios periféricos *in vivo* muestra que el mejor tiempo de incubación de puromicina es de 30 minutos a 300 uM de concentración.**

El sistema de Puro-PLA permite visualizar mediante microscopía de fluorescencia el sitio donde una proteína de interés está siendo neosintetizada con gran resolución óptica y con un protocolo compatible con ensayos de inmunohistoquímica (ver materiales y métodos sección 5.3. página 37). Sin embargo, es un sistema mayormente utilizado en modelos *in vitro*, por lo cual se requieren realizar ajustes para poner el protocolo a punto en sistemas *in vivo*, en este caso en nervio ciático, donde variables como la penetración de la puromicina deben ser consideradas.

En primer término, se puso a punto el protocolo en cultivos de células de fibroblasto a una concentración de puromicina similar a la sugerida por el fabricante (3 uM) a diferentes tiempos. Dado que estas células son muy aplanadas una vez adheridas, es esperable que la

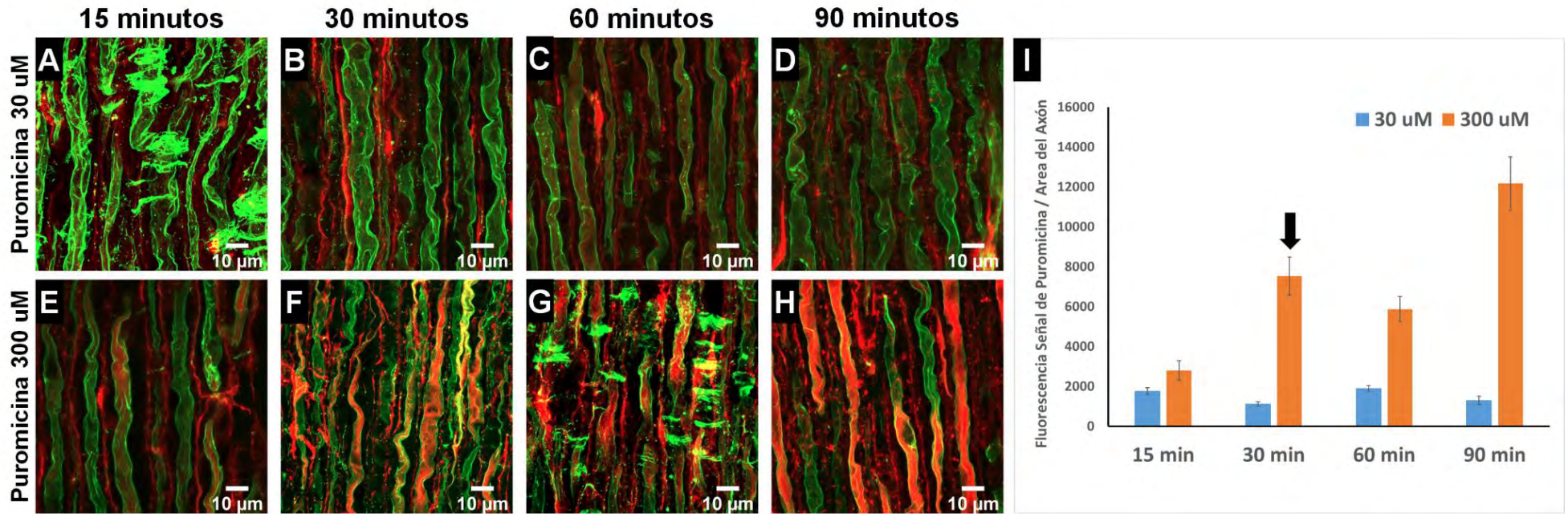
incorporación de la puromicina sea rápida. Efectivamente se obtuvo señal significativa de PLA con solo 5 minutos de incubación (Figura 16A, spots rojos), tiempo utilizado en artículos científicos donde se ha aplicado el protocolo de PLA en neuronas en cultivo (tom Dieck *et al.*, 2015; Hafner *et al.*, 2019; Glock *et al.*, 2020). Dado que es esperable se requieran de mayores tiempos de incubación con puromicina en los tejidos enteros dado el grosor de los mismos (que es varias veces mayor que el de las células en cultivo), evaluamos los niveles de PLA con otros tiempos de incubación de puromicina en el mismo modelo celular (Figura 16B-C) no detectando diferencias entre los 5 minutos de incubación con los 30 y 90 minutos, aunque si existe una tendencia al aumento de señal en el tiempo mayor. Cabe destacar que en ausencia de puromicina la señal inespecífica de PLA detectada es prácticamente nula (Figura 16D). La Figura 16E resume la cuantificación de los datos obtenidos de los cuales se puede concluir que en estas condiciones experimentales no hay inhibición de la síntesis proteica con mayores tiempos de incubación. Esto nos permitiría testear tiempos mayores de incubación en el nervio entero.



**Figura 16. Sistema Puro-PLA en fibroblastos.** Incubación puromicina a 5 minutos (A), 30 minutos (B) y 90 minutos (C). Se incluye control sin puromicina (D). El gráfico (E) resume la cuantificación de spots de PLA. La señal roja es del PLA y la verde de faloidina (Kruskal-Wallis ANOVA, p valor < 0.01).

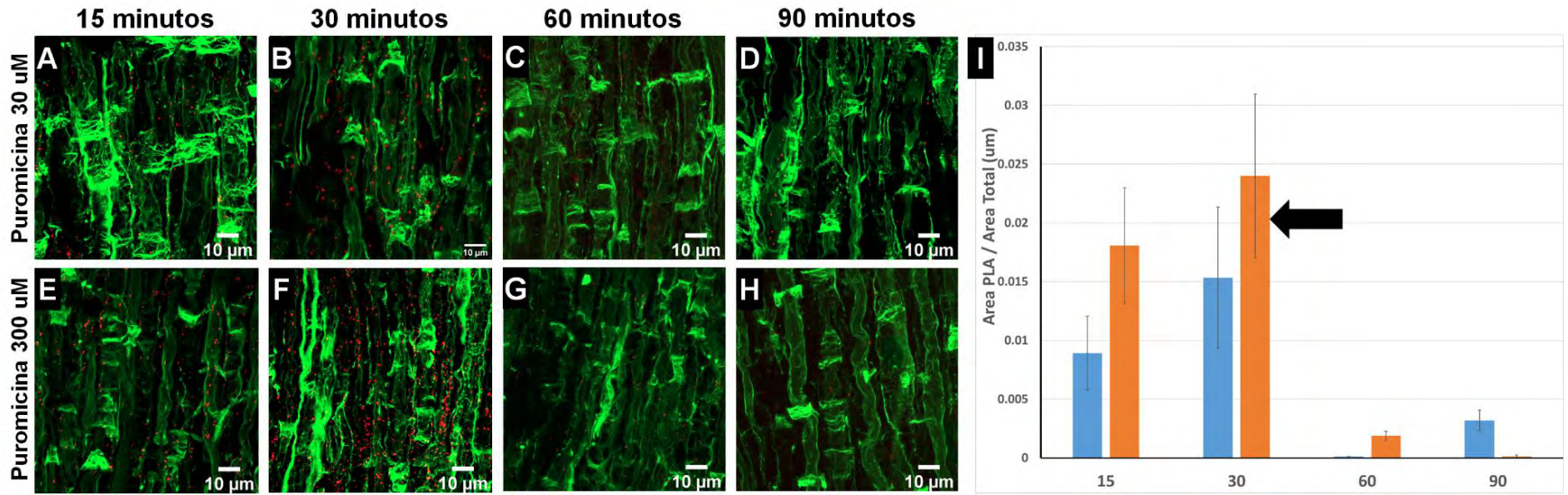
Posteriormente decidimos evaluar cuáles son los tiempos de incubación y de concentración de puromicina que permitan obtener una mayor eficiencia en la detección de la señal fluorescente de puromicina total, tanto en intensidad como en penetración a lo largo del tejido como paso previo a realizar protocolo de Puro-PLA. Consideramos que este es un paso crítico

del protocolo, ya que en este punto aún contamos con todo el nervio (previo a los criocortes) y por tanto es donde hay mayores chances de problemas de penetración de la puromicina. Ya en los pasos posteriores del protocolo de Puro-PLA se realizan incubaciones sobre criocortes de 20  $\mu\text{m}$ , por lo cual estimamos que en el caso que la puromicina penetre en todas las zonas del tejido, no tendremos mayores problemas en los pasos de incubación con anticuerpos, de ligación y de reacción de amplificación. Para ello utilizamos 5 tiempos de incubación (5, 15, 30, 60 y 90 minutos) y 2 concentraciones (30  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$ ) de puromicina (Figura 17A-H). El tiempo de 5 minutos fue descartado ya que gran parte de la señal de puromicina se distribuye únicamente en los primeros micrómetros de los preparados, evidenciando baja penetración de la puromicina. Como puede observarse en el gráfico de la Figura 17I, la condición que combina una concentración de 300  $\mu\text{M}$  de puromicina y 30 minutos de incubación es la que presenta una mayor señal fluorescente en el axón con un tiempo corto de incubación. Es importante que este último sea corto para disminuir la posibilidad de movimiento de las proteínas truncas neo-sintetizadas que incorporaron la puromicina (ver discusión al respecto en la página 70).



**Figura 17. Distribución axonal de la puromicina a 2 concentraciones y 4 tiempos de incubación diferentes.** (A-D) Distribución de la señal fluorescente para la puromicina a una concentración de 30 uM a los 15, 30, 60 y 90 minutos de incubación, respectivamente. (E-H) Distribución de la señal fluorescente para la puromicina a una concentración de 300 uM a los 15, 30, 60 y 90 minutos de incubación, respectivamente. (I) Cuantificación de la señal fluorescente de puromicina a nivel axonal a los 4 tiempos de incubación y 2 concentraciones diferentes (30 uM, azul y 300 uM, naranja). La flecha negra indica el tiempo y concentración seleccionada. (Escala: 10  $\mu$ m, señal verde faloidina, señal roja puromicina, Test estadístico: One Way ANOVA con p valor < 0.0001 para la condición 300 uM y p valor < 0.001 para la condición 30 uM).

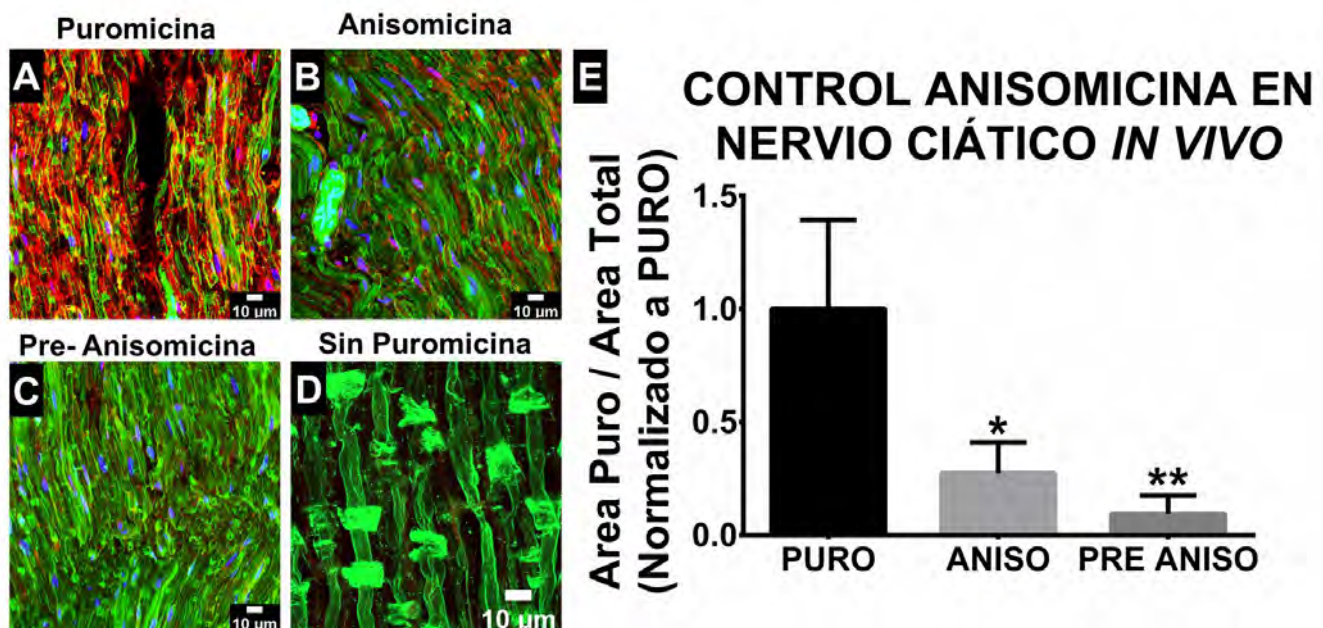
La cuantificación anterior evidencia una acumulación de la puromicina en el tejido a mayores tiempos de incubación. Sin embargo, y dada las altas concentraciones de puromicina utilizadas en estos ensayos, es necesario analizar si existe una inhibición de la síntesis proteica general que podría tener un efecto negativo en la detección de la neosíntesis de nuestras proteínas candidatas (PDCD4, analizado en el Capítulo II, y el NEFI en este Capítulo). Por ello realizamos un experimento de PURO-PLA en los tiempos de incubación y concentraciones anteriores cuyos resultados se resumen en la Figura 18. Los datos muestran que la concentración 300 uM a tiempos cortos permite alcanzar un mayor número de spots de PLA que a 30 uM, siendo el mejor tiempo a los 30 minutos de incubación (ver Figura 18F). Sin embargo, en tiempos de incubación largos (60 y 90 minutos), la puromicina a ambas concentraciones produce una inhibición de la síntesis proteica y por tanto no pueden ser utilizados en nuestros experimentos.



**Figura 18. Señal de Puro-PLA utilizando 2 concentraciones y 4 tiempos de incubación diferentes. (A-D)** Distribución de los spots de PLA a una concentración 30 uM de puromicina a los 15, 30, 60 y 90 minutos de incubación, respectivamente. **(E-H)** Distribución de los spots de PLA a una concentración de 300 uM de puromicina a los 15, 30, 60 y 90 minutos de incubación, respectivamente. **(I)** Cuantificación del área cubierta por los spots de PLA respecto al área de tejido analizada a los 4 tiempos de incubación y las concentraciones de 30 uM (barras azules) y 300 uM (barras naranjas) de puromicina. La flecha negra indica el tiempo de incubación y concentración de puromicina seleccionada. (Escala 10 um, señal verde: faloidina, señal roja: spots de PLA).



Además realizamos controles de especificidad de la señal detectada utilizando anisomicina, un inhibidor de la elongación de la traducción que compite con la puromicina no permitiendo que esta reaccione con el péptido nascente y por tanto no puede incorporarse a los mismos (Grollman, 1967). Los resultados muestran que con una pre-incubación con anisomicina seguida de una co-incubación puromicina-anisomicina durante 30 minutos (Figura 19C) se obtiene una mayor inhibición de la síntesis proteica que con solamente una co-incubación anisomicina-puromicina (Figura 19B). Cabe destacar que el protocolo de PLA en ausencia de puromicina presenta prácticamente nula señal (Figura 19D). Las incubaciones con estas drogas constituyen los controles de especificidad utilizados en los protocolos de PLA en neuronas en cultivo reportados en la literatura (tom Dieck *et al.*, 2015; Hafner *et al.*, 2019; Glock *et al.*, 2020).

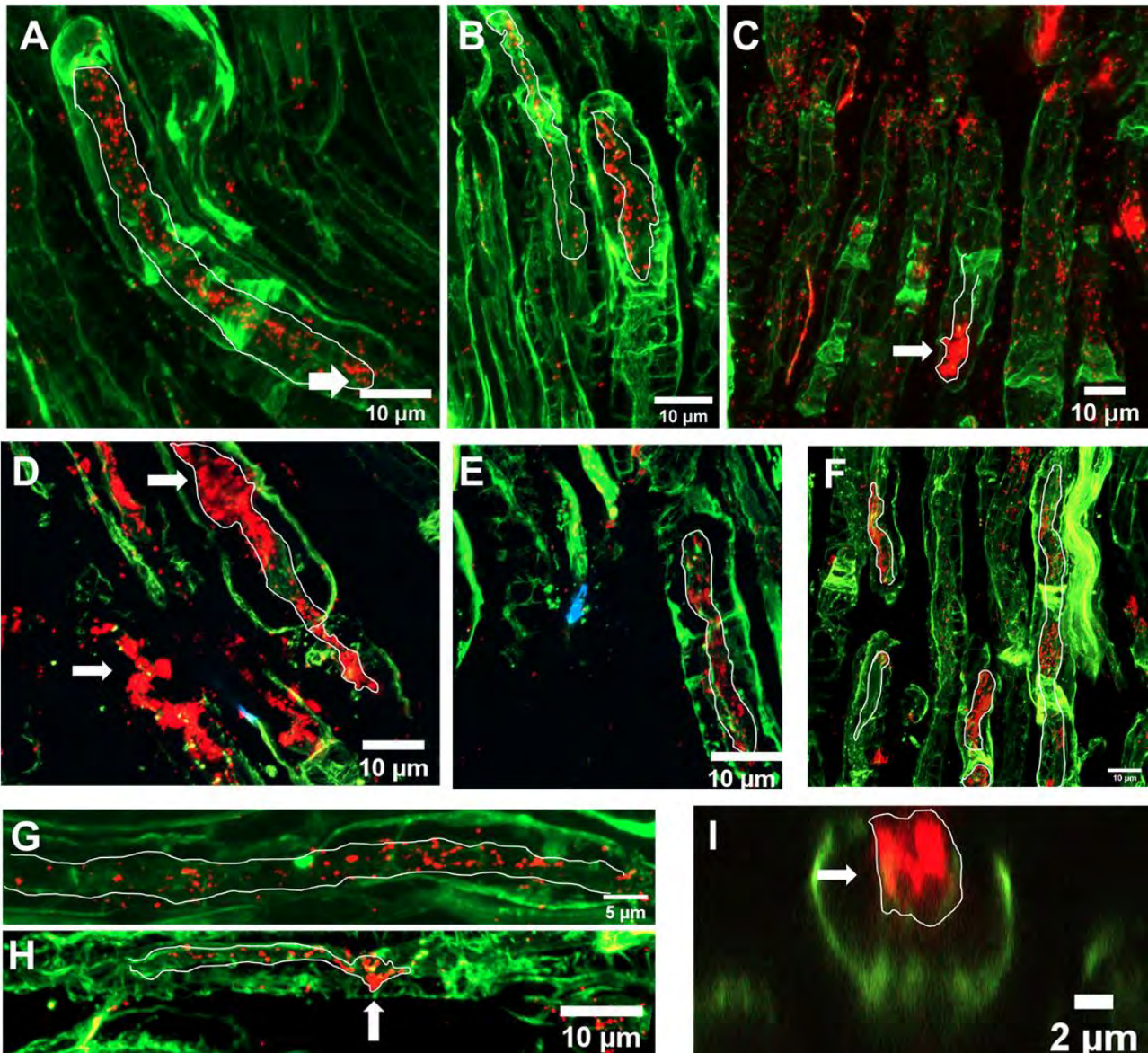


**Figura 19. Controles con anisomicina.** (A) Incubación con puromicina 300 uM. (B) Co-incubación puromicina 300 uM - anisomicina 400 uM. (C) Pre-incubación con anisomicina 400 uM + Co-incubación puromicina 300 uM y anisomicina 400 uM. (D) Incubación en ausencia de puromicina. (E) Cuantificación de la señal de puromicina (los datos están normalizados a la incubación solo con puromicina 300 uM. Test estadístico Mann-Whitney, p valores: \*  $\leq 0.05$ , \*\*  $\leq 0.001$ ). En rojo esta la señal de puromicina total y en verde la contratinción con faloidina.

Estos resultados definieron la elección del tiempo (30 minutos) y concentración (300 uM) de puromicina que utilizamos en los experimentos de Puro-PLA en nervio ciático.

**6.1.2.2. La proteína NefL es neo sintetizada en axones del nervio ciático de ratas adultas, no detectandose cambios significativos en el número de centros activos de traducción en las primeras horas post injuria.**

Una vez definido el tiempo y concentración de puromicina, realizamos los experimentos de Puro-PLA para el NefL. Detectamos spots de fluorescencia en el dominio axonal con una distribución marcadamente superior a los spots detectados en el citoplasma externo o interno de células de Schwann. La Figura 20 resume algunos ejemplos de la señal detectada, donde también evidenciamos agregados de spots fluorescentes (flechas) que sugieren la presencia de sitios en donde esta proteína está siendo intensamente traducida.



**Figura 20. Spots de PLA para Nefl en el dominio axonal. (A-H)** Proyecciones máximas de planos confocales únicos mostrando ejemplos de la distribución de señal del PLA en el dominio axonal. **(I)** Reconstrucción tridimensional y proyección ortogonal en XY para mostrar la señal del PLA dentro del axón. Las flechas en blanco muestran sitios donde existe una acumulación de spots de PLA cercano a la región de los nodos o incisuras. El dominio axonal está indicado con la silueta en blanco (la señal roja corresponde a los spots de PLA y la verde la contratinción con faloidina).

El análisis cuantitativo de los spots de fluorescencia en la condición basal y 18 horas post injuria muestra en ambos casos un gran número de centros traduccionales. A modo de ejemplo los mismos son al menos dos veces más que para el caso de Pdc4 (ver Capítulo II, Figura 27, página 112) tanto analizando el tejido entero o únicamente el dominio axonal. Sin embargo, para el NefL no se detectaron diferencias significativas en el número de spots de PLA en el nervio ciático en estado basal y en estado de regeneración. Las Figuras 21 y 22 resumen estos resultados, cuantificados mediante las estrategias “A” y “B” respectivamente. La primera forma de cuantificación ha sido diseñada por nuestro laboratorio y cuenta el número de spots de PLA por unidad de área. La segunda es la utilizada por el grupo de Schuman y colaboradores del Instituto Max Planck en Alemania (especialistas en la cuantificación *in vitro* de experimentos de PURO-PLA en neuronas) donde se cuantifica el área cubierta por la señal del PLA respecto al área total de tejido. Los detalles de ambas estrategias de cuantificación están descritos en detall en los materiales y métodos (Sección 5.4.1.2. páginas 40-46).

## Estrategia "A" de Cuantificación (NefL)

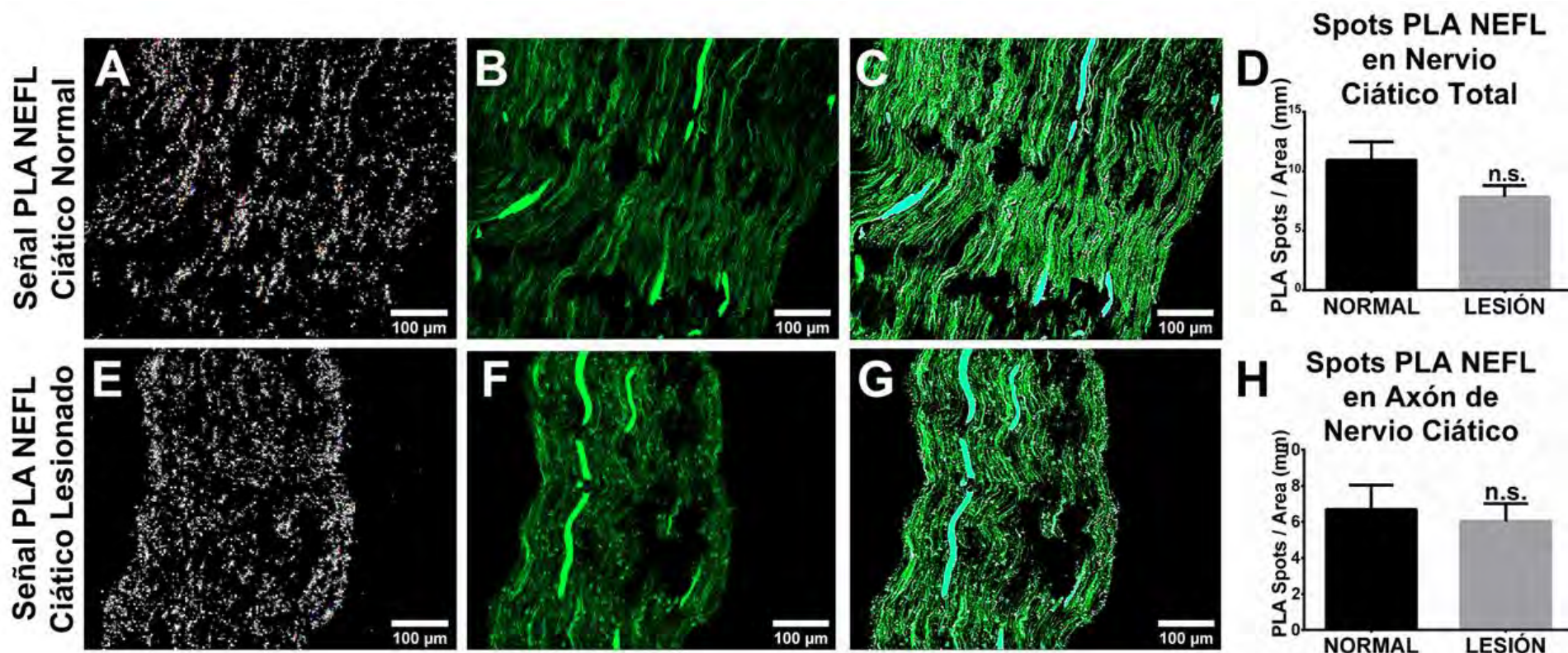


Figura 21. Cuantificación de los spots de fluorescencia para NefL en nervio ciático en estado basal y de lesión mediante la estrategia "A". (A) Señal de PLA para el NefL en una sección del nervio ciático en estado basal (B) Lo mismo que en (A) pero para la contratinción con faloidina. (C) Merge entre la señal del PLA y la faloidina en el nervio ciático en estado basal. (D) Cuantificación de los spots de PLA en las fibras del nervio ciático en estado basal y lesionado. (E) Señal de PLA para el NefL en una sección del nervio ciático lesionado. (F) Lo mismo que en (E) pero para la contratinción con faloidina. (G) Merge entre la señal del PLA y la faloidina en el nervio ciático lesionado. (H) Cuantificación de los spots de PLA en dominios axonales del nervio ciático en estado basal y lesionado por el método "A" de cuantificación. (Test estadístico: Unpaired t test p valor < 0.10 para ciático total y p valor < 0.69 para axón).

## Estrategia “B” de Cuantificación (NefL)

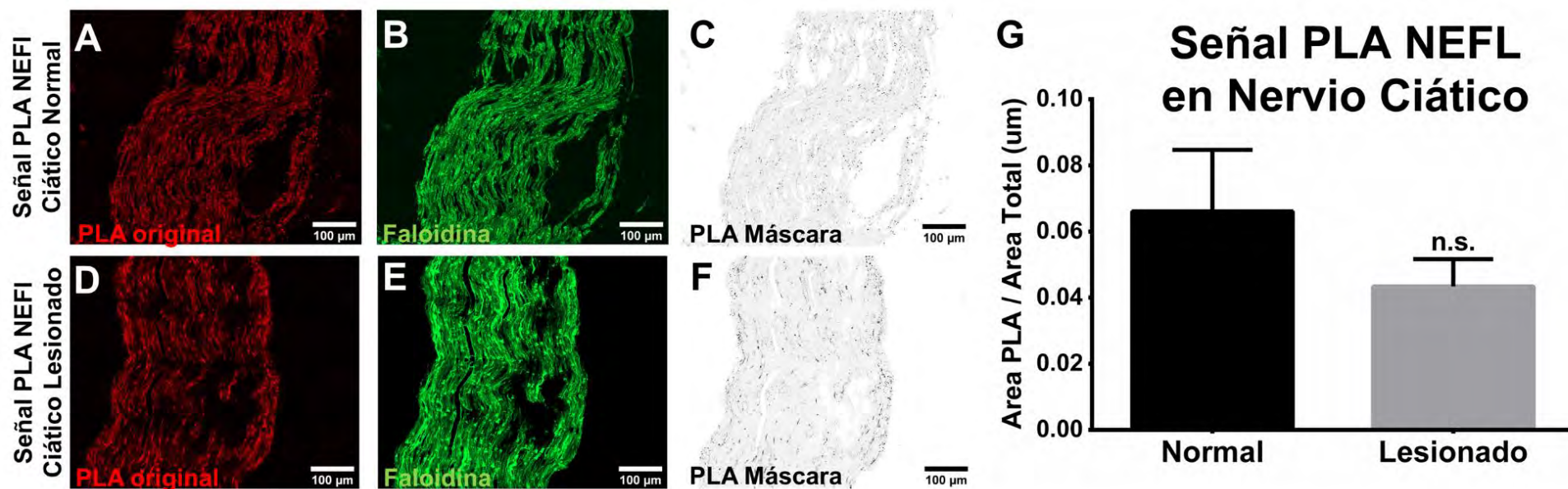
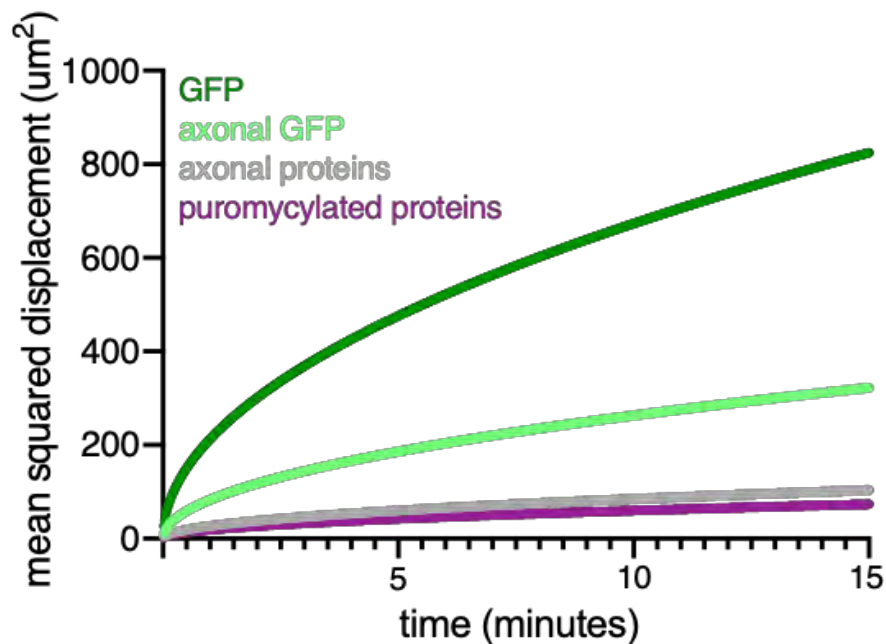


Figura 22. Cuantificación de los spots de fluorescencia para NefL en nervio ciático en estado basal y de lesión mediante la estrategia “B”. (A) Señal original de PLA en una sección del nervio ciático en estado basal. (B) Lo mismo que en (A) pero para la contratinción con faloidina. (C) Máscara aplicada sobre el canal de PLA mostrando los spots seleccionados por el método de cuantificación “B” en el ciático normal. (D) Señal original de PLA en una sección del nervio ciático lesionado. (E) Lo mismo que en (D) pero para la contratinción con faloidina. (F) Máscara aplicada sobre el canal de PLA mostrando los spots seleccionados por el método de cuantificación “B” en el ciático lesionado. (G) Cuantificación de los spots de PLA en el nervio ciático en estado basal y lesionado por el método “B” de cuantificación. (Test estadístico: Unpaired t test p valor < 0.27).

### 6.1.3) Discusión Capítulo I.

La puesta a punto del protocolo de Puro-PLA en nervios ciático *in vivo* permitió evidenciar que el NefL es neo sintetizado en el dominio axonal tanto en condiciones basales como 18 horas post injuria. Cabe destacar que en nuestro modelo las piezas de tejido incubadas con puromicina carecen de los cuerpos celulares, por lo cual la señal de PLA axonal que detectamos podría potencialmente provenir de la célula de Schwann, ser transportada al axón y por tanto no corresponder con neosíntesis axonal. Sin embargo, hay al menos tres factores que van en contra de esta posibilidad. El primero es que se ha reportado que la subunidad de NefL por sí misma carece de transporte axonal y solo presenta movimiento cuando forma el polímero junto con las otras subunidades (Yuan *et al.*, 2003), por tanto una vez neo-sintetizado no podría por sí mismo moverse. El segundo factor es que el polímero base de neurofilamento demora entre 15 y 30 minutos en ensamblarse (Black *et al.*, 1986), por tanto los tiempos de incubación con puromicina de este trabajo serían apenas suficientes para que el complejo se ensamble y el movimiento del NEFI comience. El tercer factor involucra una discusión al respecto de un artículo recientemente publicado donde se critica el uso del Puro-PLA para el análisis de la localización subcelular de la traducción de proteínas (Enam *et al.*, 2020). En este trabajo se demuestra que en presencia de emetina (una droga que bloquea la fase de elongación traduccional) no se evita la salida del péptido truncado que ha incorporado la puromicina del ribosoma, por lo cual los autores sugieren que esto podría significar que los péptidos neo-sintetizados analizados por Puro-PLA si bien son traducidos, no podría asegurarse la localización. En efecto, los autores analizan los tiempos de difusión de GFP en células en cultivo (que serían 100  $\mu\text{m}$  en 1 minuto), extrapolando este escenario a lo que sucedería en neuronas con los péptidos del Puro-PLA, lo cual invalidaría los resultados de este trabajo donde utilizamos tiempos de incubación con puromicina de 30 minutos, así como las publicaciones previas donde se estudia la localización de proteínas en dendritas de neuronas por esta metodología (tom Dieck *et al.*, 2015; Biever *et al.*, 2020). Sin embargo el grupo de Schuman y colaboradores en respuesta a este artículo muestra que extrapolar el coeficiente de difusión de GFP en células en cultivo al escenario neuronal no es correcto ya que trabajos previos han demostrado que la difusión de esta proteína en axones es mucho menor (Reshetniak *et al.*, 2020) y además también se ha demostrado que la velocidad de

difusión de péptidos truncos portadores de puromicina en modelos de cultivo derivados de neuronas es al menos 10 veces menor que los de GFP reportados en Enam y colaboradores (Ge *et al.*, 2016). En línea con estas observaciones, también se ha reportado que las velocidades de difusión de al menos 45 proteínas sinápticas en axones maduros son muy similares a las de péptidos truncos en células en cultivo (Reshetniak *et al.*, 2020), posiblemente producto del hacinamiento molecular de estos compartimentos y las interacciones proteína-proteína que allí ocurren. Incluimos en la Figura 23 el gráfico usado por Schuman y colaboradores para defender estos puntos.



**Figura 23. Gráfico del coeficiente de desplazamiento de la GFP, proteínas sinápticas y péptidos truncos con puromicina en la línea celular CHO o en axones de neuronas.** Curva Verde Oscura: Desplazamiento cuadrático medio de la GFP en células CHO. Curva Verde Claro: Desplazamiento cuadrático medio de la GFP en axón. Curva Gris: promedio del desplazamiento cuadrático medio para 45 proteínas sinápticas en axones reportadas por Reshetniak *et al.*, 2020. Curva Magenta: desplazamiento cuadrático medio para péptidos truncos con puromicina incorporada en un modelo tipo neuronal en cultivo. Nótese que en las curvas gris y magenta los valores de difusión se mantienen prácticamente constantes pasados los 5 minutos aproximadamente (Tomado de respuestas al artículo de Enam *et al.*, 2020 doi: 10.7554/eLife.60303).

Al observar el coeficiente de difusión de los péptidos truncos (línea magenta de la Figura 23) puede verse un “achatamiento” en la curva de difusión pasados los 5 minutos de incubación

que se mantiene a los tiempos allí analizados, por lo cual es esperable se sostenga también a los 30 minutos que nosotros empleamos en nuestros estudios.

En resumen, si consideramos que el neurofilamento liviano carece de movimiento como subunidad individual; que tarda entre 15-30 minutos para formar el polímero de neurofilamento móvil; que la tasa de movimiento de los péptidos truncos es extremadamente baja en axones; que los tiempos de difusión de la puromicina en un nervio entero deben ser elevados y que posiblemente la transferencia de péptidos truncos desde la célula de Schwann sea un evento poco probable, es que podemos aseverar que es muy factible que la mayoría de los spots de PLA axonales detectados sean sitios próximos donde el NefL fue neo-sintetizado.

En relación a la señal de PLA para la condición normal o de injuria, no detectamos diferencias significativas bajo ninguno de los dos métodos de cuantificación, por lo cual al menos en las etapas iniciales estudiadas 18 horas post-injuria no habría un aumento en los niveles de NefL como si se ha visto por otras metodologías en nervios ciáticos a mayores tiempos (48 hrs) post injuria (Sotelo Silveira *et al.*, 2000). Sin embargo este resultado es novedoso y muestra de una forma diferente a las extracciones de material axoplásmico y autoradiografías de trabajos previos (Crispino *et al.*, 1992; Sotelo Silveira *et al.*, 2000) que los axones maduros *in vivo* son capaces de neo sintetizar neurofilamentos, apoyando la idea de que estos mecanismos ayudarían a la reposición de subunidades en los aglomerados de polímeros de neurofilamento en zonas distales del axón maduro, con una estabilidad extrema a lo largo del tiempo. Para mantener dicha estabilidad, es posible que exista un recambio de subunidades a través de la neosíntesis local de las mismas que asegure el correcto estado del citoesqueleto axonal, fundamental para evitar el desarrollo de axonopatías. Estudios futuros donde se marquen péptidos neo-sintetizados (por ejemplo, mediante *FUNCAT*) analizando diferentes tiempos de pulso con aminoácidos marcados y donde se evalúe su incorporación a los aglomerados de neurofilamentos en el axón distal por microscopía confocal podrían comenzar a responder estas interrogantes.



## Conclusiones Capítulo I.

El sistema de PURO-PLA es posible de ser utilizado para evaluar la síntesis proteica local axonal en modelos *in vivo* con alta resolución óptica, lo cual permite visualizar *in situ* los sitios de neosíntesis en el dominio axonal. En lo que respecta a la subunidad del Neurofilamento Liviano, demostramos que la misma puede neo-sintetizarse en el axón, tanto en estado basal como en condiciones post injuria, aunque sin diferencias significativas en los niveles de traducción local, al menos en las primeras horas posteriores a la lesión.

## **6.2) CAPÍTULO II. La proteína PDCD4 es capaz de regular el crecimiento axonal, es modulada durante procesos de regeneración *in vivo* y se sintetiza localmente en axones periféricos.**

### **6.2.1) Introducción Capítulo II.**

PDCD4 ha sido reportado como un represor traduccional con efecto supresor de tumores regulado por la vía mTORC1 (Dorrello *et al.*, 2006; Dennis *et al.*, 2012) que actúa como inhibidor de la actividad helicasa del factor eIF4a inhibiendo así la formación del complejo de preiniciación de la traducción 43S (Yang *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2008; Matsushashi *et al.*, 2019). PDCD4 cuenta con un motivo de unión al ARN el cual definiría su especificidad de unión a los ARNm para los cuales su traducción sería regulada (Loh *et al.*, 2009; Wedeken *et al.*, 2011; Biyanee *et al.*, 2015). Si bien la lista de mensajeros regulados traduccionalmente por PDCD4 ha ido en aumento incluyendo *c-myb* (Singh *et al.*, 2011), *p53* (Wedeken *et al.*, 2011), *sin1* (Wang *et al.*, 2017) y *BDNF* (Li *et al.*, 2020), los mismos siguen siendo pocos y además no han habido grandes avances respecto al rol potencial de PDCD4 en otros sistemas celulares, donde la regulación del crecimiento juega un rol preponderante al igual que en el desarrollo del cáncer. En relación a este último punto es de destacar que muchas de las vías moleculares que se encuentran afectadas en diversos tipos de cáncer son compartidas con aquellas que regulan el crecimiento y regeneración axonal, muy especialmente en el contexto de la regulación de la síntesis proteica (Chédotal *et al.*, 2005; Heine *et al.*, 2015). Como mencionamos en la introducción general, la regulación de la síntesis proteica en los diferentes compartimentos neuronales (soma, dendritas y axón) es muy importante en diversos escenarios metabólicos (por ejemplo durante el desarrollo embrionario o en la regeneración axonal en modelos adultos) y en el funcionamiento de las neuronas, incluyendo los fenómenos de plasticidad sináptica (Verma *et al.*, 2005; Jiménez-Díaz *et al.*, 2008; Sotelo-Silveira and Holt, 2014; Terenzio *et al.*, 2018). La vía mTORC1 se ha reportado como un elemento central en la regulación de la síntesis proteica local en axones, jugando un rol importante durante los procesos de regeneración axonal periférica (Verma *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2008, 2010) e

incluso se ha demostrado la síntesis local de mTOR en axones lesionados (Terenzio *et al.*, 2018). La vía de señalización mediada por mTOR también es afectada en el desarrollo del cáncer (Murray and Tee, 2018). Considerando este solapamiento entre los sistemas que controlan el crecimiento axonal y la proliferación celular en cáncer es que nos propusimos estudiar el posible rol de Pdc4, una proteína río abajo de la vía mTORC1, en el crecimiento y regeneración axonal.

Hasta el momento muy pocos estudios relacionaron PDCD4 con funciones en el sistema nervioso. Se ha reportado el rol de PDCD4 como inhibidor de la traducción durante el síndrome alcohólico fetal en neuronas corticales (Narasimhan *et al.*, 2013; Riar *et al.*, 2014), su papel en modelos de depresión al regular los niveles de BDNF en SNC (Li *et al.*, 2020) y la represión en su traducción por miR-21 en procesos de lesión en médula espinal (Jiang *et al.*, 2017). Por tanto, no existen trabajos que vinculen a PDCD4 como regulador de procesos que involucren directamente al compartimento axonal u otros elementos del SNP. Dado su rol como supresor tumoral, es posible que la proteína Pdc4 pueda también regular la traducción de ARNm relacionados con el crecimiento, regeneración y/o síntesis proteica axonal. En base a esta hipótesis surgió la publicación que a continuación presentamos, en donde comparto la primera autoría con el PhD. Guillermo Eastman. En la misma las Figuras 1, 2, 5 y la Suplementaria N°1 corresponden a mi trabajo experimental. A continuación de dicho artículo, realizo un resumen de los resultados obtenidos producto de mi parte del trabajo y una discusión relativa a los mismos.

**6.2.2) ARTÍCULO I. PDCD4 regulates axonal growth by translational repression of neurite growth-related genes and is modulated during nerve injury responses.**

*Contribuciones específicas. En este artículo compartimos la primera autoría con el PhD. Guillermo Eastman, contribuyendo equitativamente en el diseño y ejecución del trabajo experimental, así como también en la escritura del mismo junto a los PhD. Federico Dajas Bailador y José Sotelo Silveira. En lo que respecta a la realización y planificación de los experimentos aquí presentados, las Figuras 1, 2, 5 y la Figura Suplementaria N°1 son de mi autoría.*

# PDCD4 regulates axonal growth by translational repression of neurite growth-related genes and is modulated during nerve injury responses

ANDRÉS DI PAOLO,<sup>1,9</sup> GUILLERMO EASTMAN,<sup>2,9</sup> RAQUEL MESQUITA-RIBEIRO,<sup>3</sup> JOAQUINA FARIAS,<sup>2</sup> ANDREW MACKLIN,<sup>4</sup> THOMAS KISLINGER,<sup>4,5</sup> NANCY COLBURN,<sup>6,10</sup> DAVID MUNROE,<sup>7,10</sup> JOSÉ R. SOTELO SOSA,<sup>1</sup> FEDERICO DAJAS-BAILADOR,<sup>3</sup> and JOSÉ R. SOTELO-SILVEIRA<sup>2,8</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo 11600, Uruguay

<sup>2</sup>Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo 11600, Uruguay

<sup>3</sup>School of Life Sciences, University of Nottingham, Nottingham NG7 2UH, United Kingdom

<sup>4</sup>Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network, Toronto M5G 1L7, Canada

<sup>5</sup>University of Toronto, Department of Medical Biophysics, Toronto M5S 1A1, Canada

<sup>6</sup>Former Chief of Laboratory of Cancer Prevention at the National Cancer Institute-NIH at Frederick, Maryland 21702, USA

<sup>7</sup>Former Laboratory of Molecular Technologies, LEIDOS at Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, Maryland 21702, USA

<sup>8</sup>Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias UdelaR, Montevideo 11400, Uruguay

## ABSTRACT

Programmed cell death 4 (PDCD4) protein is a tumor suppressor that inhibits translation through the mTOR-dependent initiation factor EIF4A, but its functional role and mRNA targets in neurons remain largely unknown. Our work identified that PDCD4 is highly expressed in axons and dendrites of CNS and PNS neurons. Using loss- and gain-of-function experiments in cortical and dorsal root ganglia primary neurons, we demonstrated the capacity of PDCD4 to negatively control axonal growth. To explore PDCD4 transcriptome and translational targets, we used Ribo-seq and uncovered a list of potential targets with known functions as axon/neurite outgrowth regulators. In addition, we observed that PDCD4 can be locally synthesized in adult axons *in vivo*, and its levels decrease at the site of peripheral nerve injury and before nerve regeneration. Overall, our findings demonstrate that PDCD4 can act as a new regulator of axonal growth via the selective control of translation, providing a target mechanism for axon regeneration and neuronal plasticity processes in neurons.

**Keywords:** programmed cell death 4 (PDCD4); axonal growth; axonal regeneration; translation; ribosome profiling

## INTRODUCTION

The tumor suppressor programmed cell death 4 (PDCD4) protein was first described in cancer studies and has been shown to regulate protein synthesis by inhibition of EIF4A helicase activity (Yang et al. 2003; Suzuki et al. 2008; Matsuhashi et al. 2019) and via interaction with specific RNA motives present in a particular subset of target mRNAs (Loh et al. 2009; Wedeken et al. 2011; Biyane et al. 2015). In mitogen stimulated cells, the degradation of PDCD4 is necessary for efficient protein translation, which is a prerequisite for cell growth and proliferation (Dorrello et al. 2006; Schmid et al. 2008). At present, while

numerous molecules have been shown to regulate PDCD4, including *p21* (Göke et al. 2004), *Cdk4* (Jansen et al. 2005), and *JNK/c-Jun/AP-1* (Yang et al. 2003, 2006; Bitomsky et al. 2004), there is also a growing list of PDCD4 translational targets, including C-MYB, P53, SIN1, and BDNF (Singh et al. 2011; Wedeken et al. 2011; Wang et al. 2017; Li et al. 2020), together with internal ribosome entry site-regulated apoptosis inhibitors (Liwak et al. 2012). Although misregulation of PDCD4 in a variety of tumors (Zhang et al. 2006; Gao et al. 2007; Mudduluru et al. 2007; Zhen et al. 2016) suggests an important role in cancer development (Zhang et al. 2006; Gao et al. 2007; Mudduluru et al. 2007; Zhen et al. 2016), the full scope of PDCD4 translational targets and its potential role in other growth-dependent cellular

<sup>9</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>10</sup>Deceased.

Corresponding authors: f.dajas-bailador@nottingham.ac.uk, jsotelosilveira@iibce.edu.uy or sotelosojos@gmail.com

Article is online at <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.075424.120>. Freely available online through the RNA Open Access option.

© 2020 Di Paolo et al. This article, published in *RNA*, is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Di Paolo et al.

systems has only recently started to be elucidated (Haas et al. 2020). In this regard, the molecular pathways involved in the development of tumor cells share a significant overlap with axonal growth and regeneration processes in the nervous system, particularly in the context of protein synthesis regulation (Chédotal et al. 2005; Heine et al. 2015).

The highly polarized nature that defines the morphology of a neuron makes local protein synthesis in the different cellular compartments (soma, dendrites and axons) an essential need for their development and function, being also important for plasticity and regenerative processes in the adult (Verma et al. 2005; Jiménez-Díaz et al. 2008; Huebner and Strittmatter 2009; Gumy et al. 2010; Park et al. 2010; Jung et al. 2011; Deglincerti and Jaffrey 2012; Kar et al. 2013; Obara and Hunt 2014; Sotelo-Silveira and Holt 2014; Ohtake et al. 2015; Terenzio et al. 2018). The acceptance of local protein translation as a key molecular mechanism in neuronal function has prompted the development of a variety of experimental models and omics approaches to investigate the specific axonal transcriptomes and proteomes (for review, see Farias et al. 2020). In this context, the elucidation of the regulatory pathways that can control the selective translation of axonal mRNAs has become an essential step in the understanding of neuronal development, growth and activity (Swanger and Bassell 2011; Jung et al. 2012). Among the various molecular mechanisms reported so far (Lin and Holt 2008; Holt et al. 2019), the mammalian target of rapamycin (mTOR) complex is described as a master regulator of local axonal translation and an important signaling process in axonal regeneration (Verma et al. 2005; Park et al. 2008; Terenzio et al. 2018), while also being affected in many different tumor types (Murray and Tee 2018). Interestingly, although PDCD4 protein has been described as an important downstream component of the mTOR pathway, it has not been directly associated with axonal processes. So far, the function of PDCD4 in the CNS has been linked to fetal alcohol syndrome, where it regulates general protein synthesis in cortical neurons (Narasimhan et al. 2013; Riar et al. 2014) and depression-like behaviors via BDNF regulation (Li et al. 2020). In spinal cord injury, PDCD4 has been shown to be down-regulated by microRNA-21 (Jiang et al. 2017) reinforcing the view of its potential role in neuronal mechanisms.

Considering the reported overlap in the molecular processes that promote both tumor and axon growth (Chédotal et al. 2005; Duman-Scheel 2009; Frank and Tsai 2009; Heine et al. 2015), we decided to investigate the potential role of PDCD4 in axonal function and regeneration. We hypothesized that as a repressor of translation, PDCD4 could be regulating mRNAs involved in axonal growth, regeneration and/or local protein synthesis and that its expression would be tightly regulated during these processes. Our study demonstrates how the manipulation

of PDCD4 levels in central and peripheral nervous system neurons can control axonal growth, suggesting a potentially key role in axon regeneration *in vivo*. As a way to identify putative mRNAs regulated by PDCD4, we used ribosome profiling (Ribo-seq) to explore the translational effects of PDCD4 at a genome-wide level. We detected more than 250 possible mRNA candidates whose translational efficiency (TE) levels increase in the absence of PDCD4. Among them, we have identified a specific group of genes reported to be relevant in neurite/axonal development and regeneration. Overall, our findings demonstrate that PDCD4 can act as a new regulator of axonal growth via the selective control of translational targets, providing a specific mechanism for axon regeneration and neuronal plasticity processes in neurons.

## RESULTS

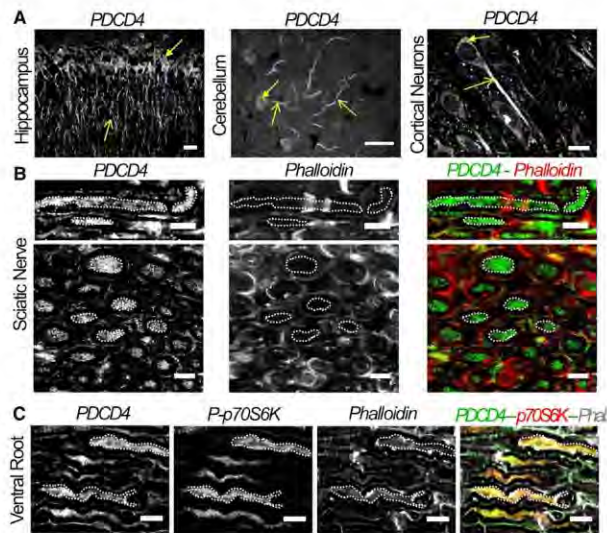
### Localization of PDCD4 in the nervous system

To address the role of PDCD4 in neuronal cells, we first investigated its localization across different neuronal types. As shown in Figure 1A, we could detect PDCD4 protein in the central nervous system (CNS) of adult rats, both in cell bodies and neurites of CA1 hippocampal, Purkinje and cortical neurons. PDCD4 is also present in adult axons of the peripheral nervous system (PNS), as demonstrated following the analysis of its distribution in rat sciatic nerves, where specific axon detection can be more easily assessed. Crucially, this experimental approach allowed us to precisely detect high levels of PDCD4 inside the axoplasmic region of both longitudinal and transversal nerve cryosections (Fig. 1B).

Previous work in cancer cells demonstrated that both the translation and activity of PDCD4 can be regulated via the mTOR-p70S6K pathway (Dorrello et al. 2006), prompting us to investigate the potential link between PDCD4 and its upstream regulator p70S6K. As shown in Figure 1C, both PDCD4 and phosphorylated (active) p70S6K-Thr389 are present in longitudinal sections of ventral root axons, evidence that the activated mTOR pathway colocalizes with PDCD4 in the axoplasm of peripheral neurons.

### Regulation of PDCD4 levels in primary neurons can control axonal growth

Following the demonstration of PDCD4 expression in CNS and PNS neurons, we decided to explore its functional role using neuronal *in vitro* models. First, we used primary cortical neurons isolated from embryonic mice. These cells can fully differentiate in culture to develop a morphologically intricate and functionally connected neuronal network after 10–12 d *in vitro* (Cotterill et al. 2016; Banker 2018). Following this period, axonal growth is decreased to allow the synaptic maturation that leads to the establishment of a



**FIGURE 1.** PDCD4 is expressed in dendrites and axons of the central and peripheral nervous system. (A) Immunohistochemistry assays show the distribution of PDCD4 protein at different types of neurons including CA1 hippocampal neurons, Purkinje of cerebellum and cortical neurons of prefrontal cortex of adult rats. Cell bodies are indicated by filled arrows and axons (or dendrite for Purkinje neurons) by unfilled arrows (scale bar, 20  $\mu$ m). (B) PDCD4 protein is also detected in peripheral axons, like sciatic nerves, by immunohistochemistry. The images above correspond to longitudinal sections and the images below to transversal sections. Examples of axonal regions are highlighted in white dotted ROIs (scale bar, 10  $\mu$ m). (C) Longitudinal sections of ventral roots. Examples of axonal regions are highlighted with white dotted ROIs. A partial colocalization between PDCD4 and p70-S6K signals is detected (scale bar, 5  $\mu$ m).

functional network of connected neurons, which is observed after  $\sim$ 2 wk in culture (Chiappalone et al. 2006).

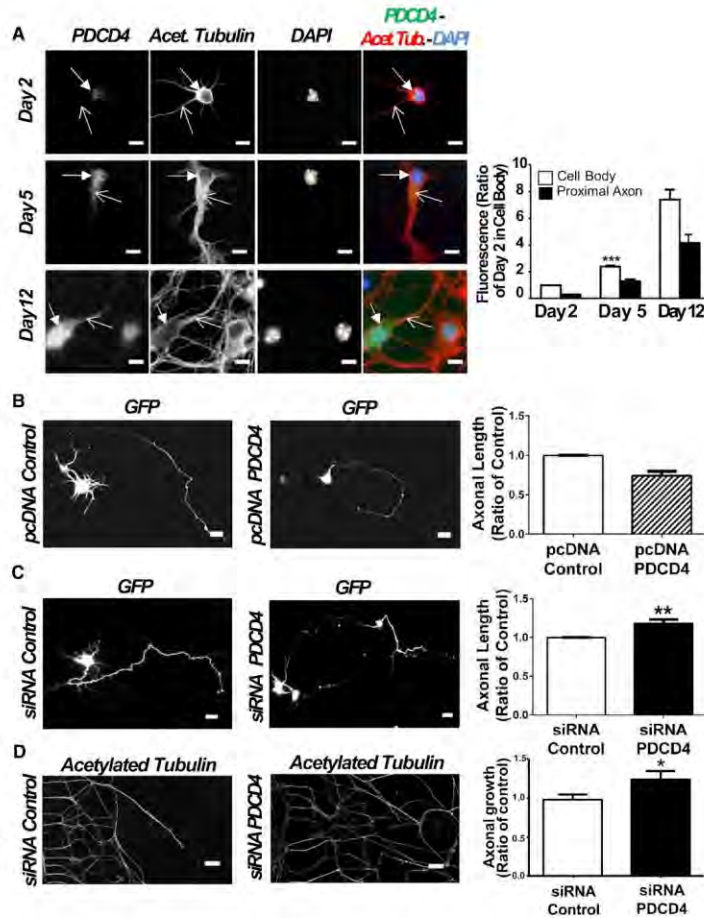
PDCD4 protein was detected in primary cortical neurons throughout their development in culture, with levels significantly increasing in cell body and axons between days 2 and day 5, and a major increase also detected after 12 d in vitro (Fig. 2A). The observation that PDCD4 levels increase in the late stages of neuronal network development and synaptic maturation (day 5–12) supports the hypothesis that increasing levels of PDCD4 could repress axon and/or neurite growth. To test this, we investigated the effect of PDCD4 overexpression on axonal growth following transfection with a PDCD4 plasmid at day 2 (24 h after seeding), with analysis of axonal length carried out 72 h later (day 5 of cell culture). Before the functional evaluation, we confirmed that neurons transfected with PDCD4 plasmid have a significant increase in PDCD4 levels detected by immunocytochemistry (Supplemental Fig. S1A). Increased PDCD4 levels during this period of active axonal growth (days 2–5 in vitro) produced a significant reduction in axonal length (Fig. 2B). To further confirm the dynamic regulation of axonal growth based on PDCD4 levels, we showed that the siRNA-

dependent knockdown of PDCD4 produced the opposite effect, with a significant increase in axonal length (Fig. 2C). To assess if this effect was also observed in peripheral neurons, we evaluated axonal growth in dorsal root ganglia (DRG) neurons cultured in compartmentalized microfluidic chambers. Addition of a cell-permeable siRNA probe targeting PDCD4 produced a significant increase in axonal growth (Fig. 2D). Importantly, we confirmed that in both cortical and DRG neurons the addition of PDCD4 siRNA led to a significant decrease in PDCD4 levels detected by immunocytochemistry (Supplemental Fig. S1B,C), an effect further confirmed by immunoblotting using the neuroblastoma N2a cell line, which has high transfection efficiency (Supplemental Fig. S1D). Overall, these functional studies demonstrate that PDCD4 modulates axonal growth in central and peripheral nervous system neurons.

#### Ribosome profiling reveals that PDCD4 regulates the translation of genes involved in axon/neurite growth

To explore the capacity of PDCD4 to regulate translation in neurons, we decided to use the ribosome profiling strategy (Ribo-seq) in differentiated PC12 neuron-like cells as a suitable and relevant model for the investigation of neuronal mechanisms (Shao et al. 2016; Zheng et al. 2016). To confirm the experimental validity of this approach, we first demonstrated the expression of PDCD4 in PC12 cells at different time points following NGF-induced neuron differentiation, with levels remaining relatively stable throughout the culture period (Supplemental Fig. S2A). Using a doxycycline inducible shRNA system, we obtained stable cell populations with inducible silencing of PDCD4 expression. In this way, addition of NGF and doxycycline for 72 h allowed us to achieve neuron differentiation of PC12 and silencing of PDCD4 expression (Supplemental Fig. S2B–G).

As a first experimental approach to the use of PC12 neuron-like cells, we analyzed if neurite growth was regulated by the presence or absence of PDCD4. Confirming our previous observations in primary neuron cultures, knockdown of PDCD4 in PC12 cells increased neurite length compared to controls (Fig. 3A,B), allowing us to validate their use in the search for putative PDCD4 translational targets. For this, we isolated polysomal and total RNA from



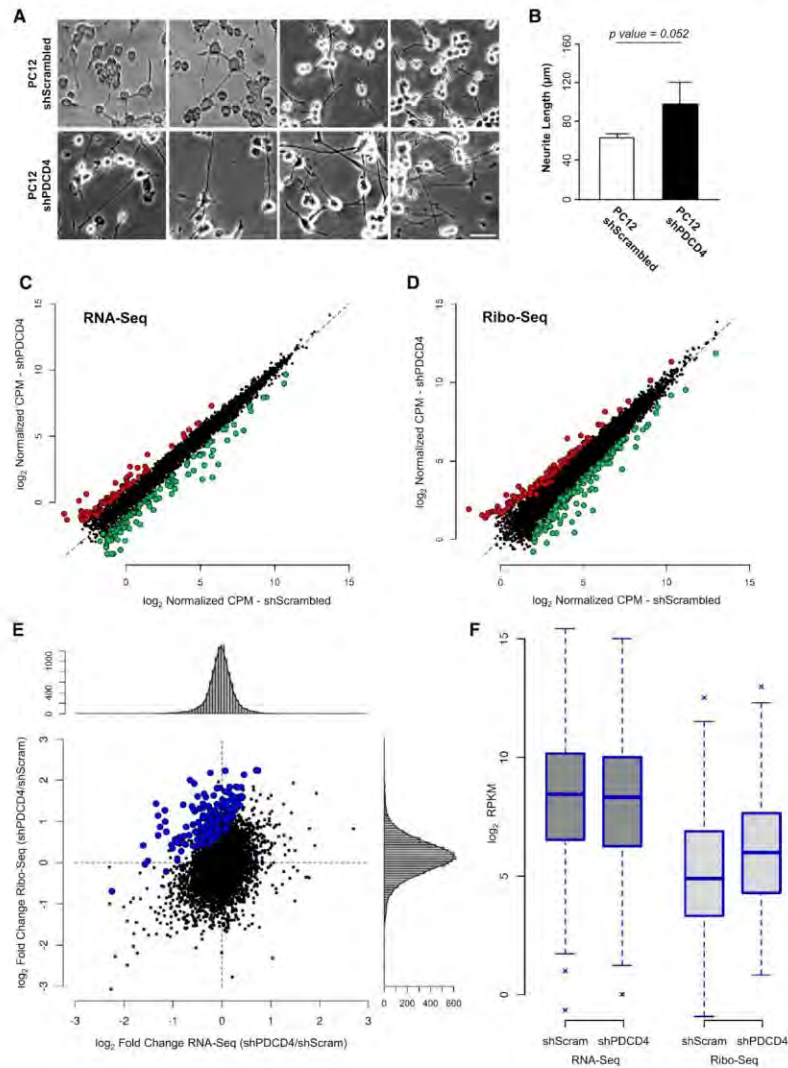
**FIGURE 2.** PDCD4 axonal levels change during neuron development and modulation of this protein can control axonal growth. (A) Immunocytochemistry assays show that PDCD4 levels increase during cortical primary neurons differentiation in vitro (scale bar, 20  $\mu$ m). Cell bodies were indicated by filled arrows and axons by unfilled arrows. The signal quantification shows that cell bodies and axons have a significant increase in PDCD4 expression for day 5, and a trend to increase for day 12, always compared to day 2 [(\*\*\*)  $P \leq 0.001$ , ANOVA test with post-Tukey, error bars: SEM,  $n = 3$  independent primary cortical neuron cultures for day 2 and day 5, with three technical replicates for each independent experiment;  $n = 2$  for day 12, with two technical replicates for each independent experiment). (B) Cotransfected cortical primary neurons with a GFP plasmid and a PDCD4 plasmid, or a GFP plasmid and a pcDNA plasmid (scale bar, 20  $\mu$ m). Overexpression of PDCD4 in transfected neurons at day 5 induce a decrease in axonal length (25%) compared to control condition [(\*\*)  $P \leq 0.01$ , paired test,  $n = 5$  independent primary cortical neuron cultures, error bars: SEM]. (C) Same as above but for PDCD4 knockdown using a siRNA for PDCD4 or a siRNA control (scale bar, 20  $\mu$ m). Down-regulation of PDCD4 induces an increase in axonal length (18%) compared to the control condition [(\*\*)  $P \leq 0.01$ , paired t-test,  $n = 6$  independent primary cortical neuron cultures, error bars: SEM]. (D) Immunocytochemistry assays with acetylated tubulin in peripheral DRG neurons cultured in compartmentalized chambers and transfected with a permeable siRNA for PDCD4, or with a siRNA control (scale bar, 500  $\mu$ m). Quantification of axonal growth shows similar effect as above: down-regulation of PDCD4 determines an increase (24%) of axonal growth increase (\*)  $P \leq 0.05$ , Student's t-test,  $n = 4$ , error bars: SEM). In all cases, the "n" corresponds to independent biological replicates.

differentiated PC12 cells in the presence and absence of PDCD4. Samples were analyzed using parallel RNA-seq and Ribo-seq protocols (Supplemental Fig. S3A–C), which

allowed us to determine steady-state transcriptome and translome levels for over 10,000 mRNAs (Supplemental Table S1). Fold changes (shPDCD4/shScrambled) at both



**PDCD4 can modulate axonal growth and regeneration**



**FIGURE 3.** Translatome and steady-state transcriptome levels of expression for mRNAs was quantified genome-wide by Ribo-seq and RNA-seq, respectively, in absence (shPDCD4) and presence (shScrambled) of PDCD4 achieved by lentiviral transfection in neuron-like differentiated PC12 cells. (A) To explore if PDCD4 modulates neurite outgrowth also in differentiated PC12 cells, we compared neurite length in differentiated PC12 growing in presence and absence of PDCD4. Three independent cultures were contrasted and illustrative fields are shown (scale bar, 50  $\mu$ m). (B) Quantification of neurite length of A is shown and an increase of almost 1.6 $\times$  in absence of PDCD4 is detected, with a marginal trend toward significance ( $P = 0.052$ , Student's t-test,  $n = 3$  independent cell cultures with an average of 80 neurites considered by replicate, error bars: SD). (C) Scatter plot showing PDCD4 regulation at the level of transcriptome evaluated by RNA-seq. Red and green dots indicate differentially expressed genes, up- and down-regulated, respectively (fold change  $> 2$  and  $P < 0.05$  estimated by *edgeR*). (D) Same as C but for PDCD4 regulation at the level of transcriptome evaluated by Ribo-seq. (E) Fold changes (shPDCD4/shScrambled) at transcriptome and translatome levels are contrasted for detected genes. Possible PDCD4 translational targets are those that present a significant increase in translational efficiency ( $P < 0.05$  estimated by *Xtail*), and are indicated in blue (267 mRNAs). Along the scatter plot, vertical and horizontal histograms show fold change values distribution estimated by Ribo-seq and RNA-seq. (F) RPKM gene expression levels for PDCD4 translational targets indicated in blue in E are shown for the two compartments (RNA-seq and Ribo-seq) in each condition.

Di Paolo et al.

transcriptome and translome levels were contrasted for detected genes, and according to its previously described role (Matsuhashi et al. 2019), PDCD4-knockdown has an impact on both transcriptome and translome compartments (Table 1; Fig. 3C,D; Supplemental Fig. S3D–G). To specifically study PDCD4 regulation in protein synthesis, we compared translation efficiency (TE) levels between conditions. TE, which is calculated as the ratio between translome over transcriptome levels for a particular mRNA, is an informative parameter to discriminate translational regulation events from those exclusively transcriptional, and indicates how efficiently an mRNA is translated (Ingolia et al. 2009). Using the *Xtail* R package (Xiao et al. 2016) to explore TE differences, we detected 267 mRNAs whose TE levels significantly increase following PDCD4 knockdown ( $P < 0.05$ ; Table 1; Fig. 3E,F; Supplemental Fig. S4; Supplemental Table S2), and 100 mRNAs whose TE decreases. The first group, which represents potential PDCD4 targets, displays unaltered steady-state transcriptome levels (88% has [fold change]  $< 1.5$ -fold), but they increase their levels of translation (86% has fold change  $> 1.5$ -fold; Fig. 3F). In order to explore if the regulation of translational efficiency was also being observed at the protein level, total protein samples obtained at the same time of the sequencing analysis were quantified by label-free proteomics. Although we observed some specific correlations with Ribo-seq data, we could only detect a small fraction of proteins changing significantly, with the sensitivity of this approach not sufficient to detect global correlations (Supplemental Fig. S5).

To investigate the functional implications of PDCD4 regulation over the 267 putative targets that increase their translational efficiency, protein association analysis was performed using STRING (Jensen et al. 2009). This revealed three to four related and altered protein cores and a network with significantly more interactions than expected ( $P$ -value = 0.0163; Supplemental Fig. S6A). The observed related protein cores within PDCD4 putative targets are grouped under *regulation of mitosis* (Moustafa-Kamal et al. 2019), *centromere and kinetochore; regulation of transcription and splicing* (Kim et al. 2014; see Fig. 3C;

Supplemental Fig. S3D,E); *regulation of mitochondrial activity* (Zhang et al. 2006); and *protein translocation to the endoplasmic reticulum* (Hudson 2008; Wang et al. 2013). Interestingly, when analyzing the list of targets whose translational efficiency decreases in the absence of PDCD4 (100 genes), we found that neither core-related proteins nor protein interactions were significantly altered ( $P$ -value = 0.954; Supplemental Fig. S6B). This difference provides a good indication that those putative targets increasing their translation after PDCD4 knockdown represent a defined set of cellular functions, while those down-regulated in our sequencing data are likely emerging as a secondary cell effect and/or experimental noise.

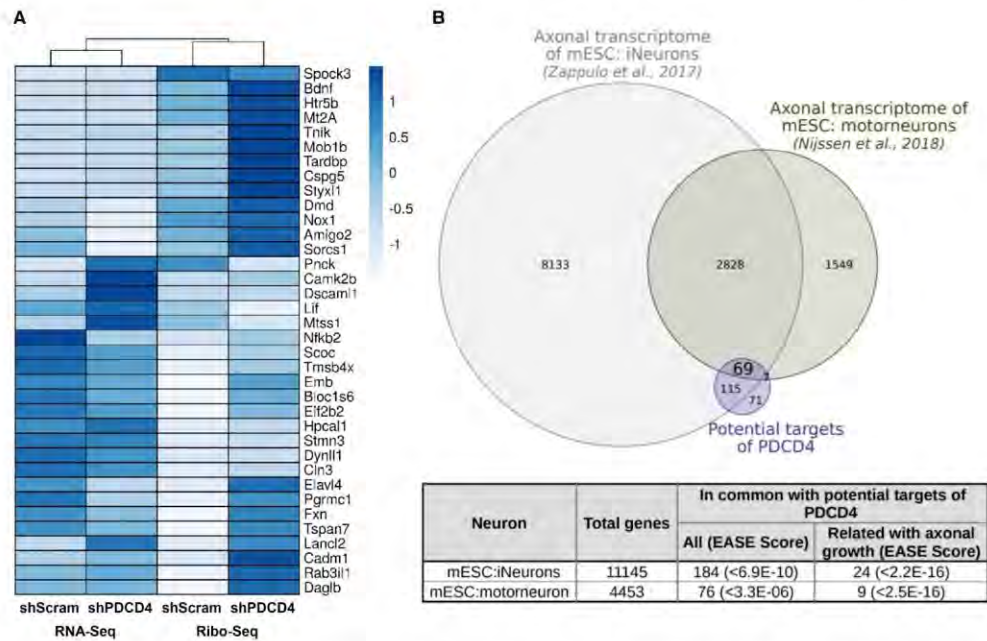
In order to uncover those potential PDCD4 targets with functional links to neurite, axon and/or dendritic growth, we curated the list using in-house software that allowed us to link published articles with gene lists and user-defined terms (Radío S, Sotelo-Silveira JR, and Smircich P, in prep.; <https://github.com/sradiouy/lDMiner>). We also explored the list of differentially expressed genes separately at the transcriptome or translome level (fold change  $> 2$  and  $P$ -value  $< 0.05$  estimated by *edgeR*), and the down-regulated genes at TE (100 genes with  $P$ -value  $< 0.05$  estimated by *Xtail*), searching for genes that might inhibit neurite outgrowth. This comprehensive approach highlighted several experimentally validated axon and/or neurite outgrowth-related genes from the list of potential PDCD4 translational targets. This signature of 36 genes was mainly composed of up-regulated genes at the level of TE in PDCD4 absence (26 genes), but also by genes up-regulated only at the translome (four genes) or transcriptome levels (three genes), or down-regulated at TE (three genes) whose ascribed function is to inhibit neurite outgrowth. Transcriptome and translome levels of the 36 genes show a global induction of translation after PDCD4 knockdown, from low-middle to high translational levels (Fig. 4A).

Among the signature of neurite and axon-growth-related genes, we found genes previously reported to directly control neurite outgrowth: *Elavl4*, *Styx11*, *Bdnf*, *Dmd*, *Lancl2*, *Lif*, and *Nfkb2*. In the case of ELAVL4 (also known as HUD), DMD and LANCL1 proteins, their expression is required for neurite outgrowth in PC12 cells (Mobarak et al. 2000; Acosta et al. 2004; Fukao et al. 2009; Zhang et al. 2009), while the pseudophosphatase MK-STYX (STYXL1) increases both the number of cells with neurite extensions and neurite outgrowth in PC12 (Flowers et al. 2014). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was shown to increase neurite length in rodent primary neuronal cultures (Iwasaki et al. 1998; Cohen-Cory et al. 2010; Dajas-Bailador et al. 2012), as well as in PC12 cells (Squinto et al. 1991; Iwasaki et al. 1997). On the other hand, the TE of LIF is down-regulated in PDCD4's absence, and it was shown that activating LIF receptor signaling can have a negative impact on neurite extension in PC12 cells (Ng et al. 2003). Particularly interesting is the

**TABLE 1.** Number of analyzed and differentially expressed genes ( $P < 0.05$ ) estimated by *edgeR* for transcriptome and translome, and by *Xtail* for translational efficiency

	Analyzed genes	Up-regulated		Down-regulated	
		FC $> 2$	FC $> 1$	FC $< -2$	FC $< -1$
Transcriptome	10,946	73	999	134	1039
Translome	9967	124	269	168	348
Translational efficiency	9931	164	267	95	100

## PDCD4 can modulate axonal growth and regeneration



**FIGURE 4.** PDCD4 regulates translation of several neurite growth-related genes evidenced by Ribo-seq and RNA-seq. The putative PDCD4 targets are present in previously described axonal transcriptomes. (A) Expression of neurite and axon growth-related genes is represented by a heatmap, where an induced expression at translation level is detected in the absence of PDCD4. (B) Venn diagram showing the intersection between the potential PDCD4 targets and axonal transcriptomes derived from mESC (Zappulo et al. 2017; Nijssen et al. 2018). Separate and overlapping expressions between samples are shown. Only transcripts with a level of expression of TPM  $\geq 1$  were considered. The table shows the type of neuron used in each study, the total genes detected and the number of common genes between potential PDCD4 targets (or potential PDCD4 targets related to axonal growth) and each axonal transcriptome. The EASE Score (a modified Fisher exact *P*-value) is also shown, which indicates gene enrichment.

relationship between the transcription factor complex nuclear factor-kappa-B (NF $\kappa$ B) and neuritogenesis, where activating the NF $\kappa$ B pathway and increasing *Nfkb2* gene expression promotes neuritogenesis in PC12 cells (Manecka et al. 2013). This strong link motivated us to confirm PDCD4 regulation of NF $\kappa$ B2 protein abundance. For this we used a model of cortical neurons in culture, silencing PDCD4 by a new set of lentiviral particles with shRNA against PDCD4, and quantifying protein abundance by western blot. By this, we confirmed by an orthogonal method that NF $\kappa$ B2 total protein levels increase significantly after knockdown of PDCD4 (Supplemental Fig. S7).

In line with the notion that PDCD4 can regulate axon-related mRNA translation in neurons, we found that a significant proportion of the 267 putative translational targets identified in our Ribo-seq analysis are found in two different published axonal transcriptomes from in vitro neuron models (Fig. 4B). On the other hand, those genes for which we observe a decrease in the TE after PDCD4 knockdown

are not specifically enriched in axonal transcriptomes, providing further support to our hypothesis that they reflect secondary mechanisms (Supplemental Fig. S8). A significant fraction of PDCD4 mRNA translational targets were also found in the recently described in vivo motor axon transcriptome (Farias et al. 2020) (23 out of 255, in a set of 1008 mRNAs; *P*-value =  $2.8 \times 10^{-04}$ ). These findings support the idea that PDCD4 could also be a player in regulating local axonal responses and plastic processes in vivo.

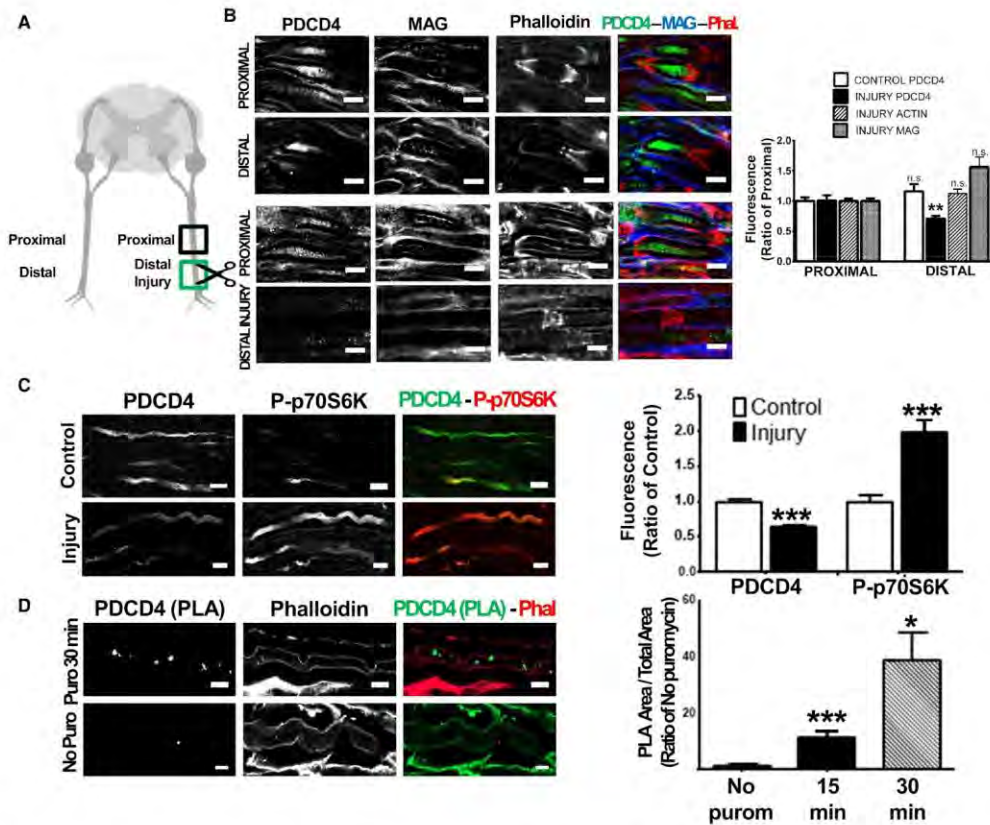
#### Sciatic nerve injury in vivo reduces local axonal levels of PDCD4

Our in vitro functional studies and ribosome profiling data support the hypothesis that PDCD4 is a novel regulator of axonal function. For this reason, we decided to test our findings in vivo, using a model of axon regeneration, a cellular process where the regulation of axonal protein

Di Paolo et al.

synthesis is important (Verma et al. 2005; Huebner and Strittmatter 2009; Gurny et al. 2010). For this, we performed a full transection of the rat sciatic nerve, using the contralateral nerve as a control for no injury (Fig. 5A).

At 18 h post injury, when the nerve is in the active regeneration phase, we analyzed the levels of PDCD4 along the axoplasm. Our analysis demonstrates that uninjured controls show no change in the expression of PDCD4



**FIGURE 5.** Sciatic nerve injury induces a decrease of PDCD4 levels locally in axons next to the injury site and an up-regulation (and activation) of p-p70S6K, a component of mTOR-PDCD4 pathway. PDCD4 could be locally synthesized in peripheral axons as a possible mechanism for protein level regulation. (A) A complete transection of the sciatic nerve was performed in adult rats using the contralateral nerve as a control condition. The analyzed regions are labeled as proximal and distal (or distal injury) in reference to cell bodies. (B) Eighteen hours post injury, the sciatic nerves were extracted from the animals and the levels of PDCD4 were analyzed by immunohistochemistry (scale bar, 5  $\mu$ m). Signal quantification shows no differences on PDCD4 levels between regions in the control condition (distal vs. proximal), but in the injury to the sciatic nerves, a significant decrease in PDCD4 levels at the injury region was detected (distal injury vs. proximal). These changes are specific to PDCD4 because other proteins in the axon-like F-Actin (evidenced by phalloidin) and MAG protein did not have differences on expression levels comparing distal injury versus proximal (\*\* $P \leq 0.01$ , two-tailed Mann-Whitney test,  $n = 3$ , error bars: SEM). White dotted ROIs correspond to examples of quantified axonal regions. (C) As in B, levels of PDCD4 and p70S6K were analyzed by immunohistochemistry comparing injury axons vs control (scale bar, 10  $\mu$ m). By signal quantification we detect an increase in the phosphorylated form of p70S6K, a direct upstream regulator of PDCD4 expression on the mTOR pathway (\*\* $P \leq 0.001$ , two-tailed Mann-Whitney test,  $n = 2$ , error bars: SEM). White dotted ROIs correspond to examples of axonal quantified regions. (D) Maximum intensity projection images showing Puro-PLA signal for PDCD4 inside the axoplasm at 30 min of puromycin incubation and the associated control condition without puromycin. The green spots inside the axoplasm reveals that PDCD4 is newly synthesized in the axon. The right panel shows the signal quantification at two different time points of puromycin incubation compared to the control (\*\* $P \leq 0.001$  and \* $P \leq 0.02$ , ANOVA and Mann-Whitney test,  $n = 2$ , error bars: SEM). White dotted regions define the limits of the axoplasm region. Note that in all the cases, "n" are from independent biological replicates.

**PDCD4 can modulate axonal growth and regeneration**

along the axoplasm of the sciatic nerves (Fig. 5B, confocal images of "Proximal" and "Distal" axonal sections in relation to the cell bodies). However, we observed a significant decrease of ~30% of PDCD4 axonal levels at the site of injury ("distal injury" in diagram) when compared to the proximal region of the same nerve segment (Fig. 5B). Importantly, these changes in PDCD4 levels are not due to an overall loss of protein content at the site of injury, as the levels of actin and MAG do not change when comparing all conditions (Fig. 5B). These findings allowed us to conclude that axonal levels of PDCD4 are dynamically decreased at the site of axonal injury and during the regeneration process.

The potential role of PDCD4 as a translation regulator in axonal growth would require the existence of precise molecular pathways controlling its localized expression. In this regard, degradation of PDCD4 would be able to rapidly promote axon regeneration in the context of nerve injury. Indeed, concomitant to the decrease in PDCD4 levels in injured axons, we found a significant increase in the activated form of p70S6K (phospho-p70S6K), which acts as a direct regulator of PDCD4 degradation via the mTOR pathway (Fig. 5C; Dorrello et al. 2006). The tight control of protein levels in the axoplasm is not only dependent on degradation, but also on localized protein translation (Vuppalachchi et al. 2009; Yoon et al. 2009; Sahoo et al. 2018). Indeed, PDCD4 mRNA levels are detected in the axon of peripheral neurons, both *in vivo* (Farias et al. 2020) and *in vitro* in our DRG compartmentalized cultures, where qPCR analysis of RNA extracted from the axon compartment showed an increase from day 3 to 12 (day 3  $C_t$  value = 25.5 and day 12  $C_t$  value = 23.6) samples. To test if local translation could control PDCD4 levels in axons, we carried out the Puromycin-Proximity Ligation Assay or Puro-PLA in rat ventral roots *in vivo* (tom Dieck et al. 2015) to explore local protein synthesis. Consistent with its dynamic role in the control of axon processes, our results indicate that PDCD4 can be locally translated in mature noninjured axons (Fig. 5D). Overall, these results revealed two possible molecular mechanisms for the regulation of PDCD4 levels in mature axons *ex vivo*, either via degradation and/or local protein synthesis.

**DISCUSSION**

Our studies demonstrate that PDCD4 is expressed in different neuronal cell types of the CNS and PNS and is distributed in axonal and dendritic compartments, possibly interacting with other components of the mTOR pathway, such as its upstream protein regulator p70S6K (Fig. 1). Since PDCD4 is known to regulate protein synthesis in tumor models and also act as a downstream component of the mTOR pathway, we postulated that it could have a role in molecular processes relevant to axonal function. The possibility that PDCD4 functions as a translation reg-

ulator factor in both cancer and neuronal cells agrees with the observation that many of the key cellular hallmarks of cancer encompass molecular processes that are crucial in nervous system development, such as invasive cell growth, cytoskeleton rearrangements, ECM dynamic interactions and survival (Duman-Scheel 2009; Heine et al. 2015).

In mouse primary cortical neurons, we observed that PDCD4 is localized to the cell body and axons, with levels increasing during time in culture (Fig. 2A). This increase in PDCD4 levels correlates with neuronal network maturation and the establishment of synaptic contacts, a period that requires decreased axon growth. It is thus possible that elevated levels of PDCD4 mark the end of active axonal growth and the establishment of a stable cortical network. Further confirmation came from the overexpression of PDCD4, which caused a significant decrease in axonal growth. Importantly, the knockdown of PDCD4 levels caused the opposite effect, with a significant increase in axonal length (Fig. 2C,D). The analysis of axonal growth in primary cortical neurons constituted a useful approach for the investigation of the cellular and molecular mechanisms that control neuronal network development in the CNS. However, the elucidation of those mechanisms that can control axonal growth is also a fundamental area of research in the study of nerve regeneration in PNS (He and Jin 2016). It was thus important to investigate if PDCD4 could have a role in the regulation of axonal growth using an *in vitro* model of peripheral neurons, such as dissociated DRG primary neurons. Consistent with the high levels of PDCD4 observed in peripheral axons *in vivo* (Fig. 1B,C), and the functional data from cortical neurons (Fig. 2B,C), siRNA-dependent knockdown of PDCD4 in DRG neurons grown in microfluidic chambers (Taylor and Jeon 2011; Dajas-Bailador et al. 2012) showed a significant increase in axon growth (Fig. 2D). Overall, the functional studies in primary neurons of central and peripheral origin demonstrate a clear mechanistic link between the control of PDCD4 levels and the regulation of axon growth and network development, confirming that PDCD4 can modulate these processes, probably at the level of translation.

In order to explore the molecular signature underlying the link between PDCD4 and the control of neurite/axon growth, we decided to use a genomic approach to elucidate putative PDCD4 translational targets. To do this, we first generated a stable PC12 cell line able to induce PDCD4 knockdown by shRNA (Supplemental Fig. S2), and then confirmed that similar to primary neurons, PDCD4 knockdown caused an increase in the neurite length of differentiated PC12 neuron-like cells (Fig. 3A, B). Despite its described role in selective mRNA translational mechanisms, the investigation of PDCD4 targets has been largely unexplored using genomics approaches, neither in cancer nor in neuronal models. However, very

recent work by Haas and collaborators described PDCD4 targets using transcriptomics and Ribo-seq in a telomerase-immortalized human epithelial cell line (Haas et al. 2020). The implementation of Ribo-seq protocols, which are based on deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments, makes it possible to monitor translation directly, significantly improving the estimation of protein translation levels as compared to the classic RNA-seq approaches (Ingolia et al. 2012; Eastman et al. 2018). Our Ribo-seq data confirmed the key role of PDCD4 in the regulation of translation and provided only the second approximation to the full scope of its cellular targets and the first in a neuronal cell model (Fig. 3C–F). It allowed us to compare the PDCD4-dependent transcriptome and translome data sets (Fig. 3C,D), identifying 267 mRNAs with a potential role as PDCD4 translational targets (Fig. 3E,F). This set of neuronal-related putative targets significantly increases their translational efficiency in the absence of PDCD4 ( $P$ -value  $<0.05$  estimated by *Xtail*; Supplemental Table S2). We compared this list with that defined by Haas et al., where 62 mRNAs increase their translation upon PDCD4 silencing. Although 50 of those 62 targets could be detected in our study and show considerable expression levels, only *Cldnd1*, an apoptosis-related gene in epithelial cells (Achari et al. 2015), is common to both studies. This is likely the reflection of differences in cell type, developmental stage and experimental model, and provides a tantalizing perspective on the regulatory potential that can be attributed to PDCD4 and which is likely controlled by the additional recruitment of cell- and stage-specific mechanisms.

In order to further elucidate the regulatory mechanisms at play, samples from the same RNA-seq and Ribo-seq experimental protocols were analyzed by label-free quantitative proteomics (LFQ). However, the number of observed and regulated proteins (~3000 and 141 proteins, respectively) were lower than expected. From 141 differentially expressed proteins ( $P$ -value  $<0.05$ ; ANOVA), 87 of them (62%) show the same direction of change seen in the Ribo-seq data (with similarly positive or negative fold changes; Supplemental Fig. S5B). In addition to the lack of sensitivity, it is also likely that protein levels might need to be evaluated at later time points than the Ribo-seq data, but this was beyond the scope of this study. Ultimately, protein levels are also subject to dynamic regulatory processes that control their half-life and degradation, and which might prevent the direct correlation of Ribo-seq data with estimation of proteome levels, particularly for low expression genes, which could be relevant in PDCD4 function (Zubarev 2013; Kumar et al. 2016).

Based on our functional results with primary neurons, we investigated the list of potential PDCD4 targets identified from our Ribo-seq data to uncover a neurite/axon growth gene signature. A list of 36 PDCD4 targets emerged with axon growth and/or neurite outgrowth links (Fig. 4A).

Besides the genes associated with neurite outgrowth in PC12 cells described previously, the remaining genes were also described as associated with neurite or axonal growth previously in the literature (Bisogno et al. 2003; Nakanishi et al. 2006; Su et al. 2006; Ghiani et al. 2010; Fiesel et al. 2011; Bali et al. 2013; Kar et al. 2013; Olbrich et al. 2013; Mincheva-Tasheva et al. 2014; Munnamalai et al. 2014; Siddiq et al. 2015; Yu et al. 2016; Parviainen et al. 2017; Tang et al. 2017; Chen et al. 2019). Relevant and interesting examples include genes coding for proteins associated with the cytoskeleton, either actin with *Tmsb4x* (van Kesteren et al. 2006; Yang et al. 2008) or microtubules with *Stmn3* (Riederer et al. 1997; Manna et al. 2007); cell adhesion molecules like *Cadm1* (Nagara et al. 2012), *Amigo2* (Kuja-Panula et al. 2003), *Dscam1* (Hattori et al. 2008; Zhu et al. 2013; Hutchinson et al. 2014), and *Emb* (Lain et al. 2009), transmembrane proteins associated to signal transduction including *Tspan7* (Bassani and Passafaro 2012); calcium-binding proteins like *Spock3* (Schnepp et al. 2005; Yamamoto et al. 2014), *Hpcal1* (Braunewell et al. 2011; Wang et al. 2014), and *Camk2b* (Fink et al. 2003; Yan et al. 2016), anterograde and retrograde transport and signaling with mRNAs like *Dynl1* (Lin et al. 2015) and *Lancl2*, different kinases like *Tnik* (Kawabe et al. 2010), *Mob1b* (Lin et al. 2011; Song et al. 2018), *Pnck* (Wayman et al. 2004; Uboha et al. 2007), and also synaptic-associated proteins like *Rab3il1* (Villaruel-Campos et al. 2016). Importantly, a significant proportion of PDCD4 putative translational targets identified in our analysis were also found in axonal transcriptomes from in vitro neuron models (Zappulo et al. 2017; Nijssen et al. 2018) and in vivo motor axon transcriptome (Farias et al. 2020) (Fig. 4B), supporting the validity of these processes beyond our experimental models.

Indeed, our own work managed to extend the observation of PDCD4's capacity for regulation of axon growth in primary neurons to an in vivo axon regeneration model, demonstrating that PDCD4 levels decrease following injury and during the regenerative growth phase (Fig. 5A,B). Taking into consideration that PDCD4 levels are high along adult peripheral axons in sciatic nerves (Fig. 1B), we believe a decrease in the levels of this translational repressor would allow the expression of growth-related proteins to aid local axon regeneration. Taken together, our in vitro and in vivo experiments support the idea that the dynamic control of PDCD4 levels in the neurons and axons could act as a new regulatory mechanism of protein synthesis in a specific and growth-oriented manner.

The role proposed for PDCD4 in the regulation of local protein synthesis in neurons would require a tight control of its levels in the axon. In agreement with previous reports (Verma et al. 2005; Terenzio et al. 2018), we found that the active form of p70S6K protein (phosphorylated at Thr 389) was increased twofold at the injury site, when compared to uninjured axons (Fig. 5C). Given that the local activation of

**PDCD4 can modulate axonal growth and regeneration**

the mTOR pathway in the injured axons increases axonal protein synthesis (Verma et al. 2005; Terenzio et al. 2018), our findings confirm that the increased phosphorylation of p70S6K in the axons correlates with a decrease in PDCD4 levels, likely mediated by activation of the proteasome system (Dorrello et al. 2006). In this scenario, the translation repression offered by PDCD4 would be removed, releasing the potential for growth mechanisms.

Local depletion of PDCD4 would be useful to mediate a rapid regeneration response; however, local neosynthesis can be used as an important mechanism to modulate protein synthesis of specific targets in other contexts of neuron development, when axon growth is reduced and synaptic consolidation might be needed. Indeed, PDCD4 levels have been shown to be regulated by miR-21 in cancer models increasing transformation, invasion, and metastasis (Asangani et al. 2008; Matsuhashi et al. 2019). Consistent with this, miR-21 is up-regulated during axonal growth and regeneration in DRG axons (Strickland et al. 2011) and miR-21 and PDCD4 have been analyzed in a model of spinal cord injury, where whole tissue levels of miR-21 increase and PDCD4 decrease after injury (Jiang et al. 2017). To test the potential existence of local protein synthesis as a regulatory mechanism controlling PDCD4 protein levels in the axoplasm, we used proximity ligation assays (PLA) (tom Dieck et al. 2015). Our results suggest that PDCD4 is locally translated in the axoplasm of peripheral neurons (Fig. 5D), supporting previous neurite data of newly synthesized proteomics, where PDCD4 is also detected (Zappulo et al. 2017).

Overall, our study shows the expression of PDCD4 in different types of neurons *ex vivo*, *in vitro* and also at different development stages in both mouse and rat experimental models. These results demonstrate a role of PDCD4 in processes where the dynamic regulation of protein synthesis is of crucial importance, such as axonal growth, in both development and regeneration. We report the first Riboseq data set for PDCD4 in a neuronal model, defining 267 mRNAs that could be regulated by PDCD4 at the translational level, with a significant number of these being related to neuronal plasticity and axonal growth processes. The potential relevance of this regulatory capacity for PDCD4 is further suggested by its regulation by local protein synthesis and/or degradation in peripheral axons. Taken together, our findings uncover a new role for PDCD4 in protein synthesis regulation at neuronal and specifically axon levels. This represents new evidence of the interesting correlation between cancer and neuronal pathways, especially the ones related to axonal growth and regeneration during injury. Further studies should elucidate the functional implications of those specific mRNAs regulated by PDCD4 in neurons, and particularly those acting locally in axons, a process that could provide novel functional insights in both plasticity and regenerative processes.

**MATERIALS AND METHODS****Animals and injury procedures**

Sprague-Dawley male adult rats (6–9 mo old) were used for *ex vivo* experiments. The maintenance was made in accordance with international agreements at IIBCE bioterium in Montevideo, Uruguay. Sciatic nerve transection was performed as in Canclini and collaborators (Canclini et al. 2014). All the experimental procedures were made according to the Uruguayan ethical national committee (CNEA) with approved project code “005/01/2014.”

**Cell cultures**

Rats (Sprague-Dawley) and mice (C57/BL6) used for primary neuron cultures were housed at the Animal Unit in the School of Life Sciences (University of Nottingham). They were bred and sacrificed according to the UK Animal (Scientific Procedures) Act 1986. Primary cortical neuron cultures were obtained from C57/BL6 E16 mice brains as previously described (Lucci et al. 2020). Primary DRG cultures were obtained from E18 rat embryos. PC12 cell lines from ATCC (ATCC CRL-1721) were grown in collagen I (ThermoFisher, Cat# A1048301) coated plastic surfaces at 8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Complete medium was made of RPMI (ThermoFisher, Cat# 31800022), 10% of horse serum (ThermoFisher, Cat# 26050088), 5% of fetal bovine serum (Capricorn Scientific, Cat# FBS-11A), and antibiotics (Sigma-Aldrich, Cat# A5955). The cells were cultured following commercial instructions and neuronal differentiation was achieved by removing growth factors and antibiotics and exposing cells to 100 ng/mL of NGF 2.5S (ThermoFisher, Cat# 13257019) for at least 72 h. Neuroblastoma (Neuro2a) cell lines were a kind gift from the Robert Layfield laboratory, University of Nottingham, UK. For more details about cell cultures, please see Supplemental Materials and Methods.

**siRNA and plasmid transfections**

Primary cortical neurons and Neuro2a cells were both transfected 24 h after neuron seeding (day 2 of culture). For siRNA experiments we used 25 nM of siGENOME Mouse Pdc4 SMARTpool 5 nmol (Cat# M-044032-01-0005) or siGENOME Non-Targeting siRNA Control Pool No.1, 5 nmol (Cat# D-001206-13-05), both from GE Healthcare Dharmacon—Horizon Solutions. Transfection protocols followed manufacturer's instructions using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ThermoFisher). Plasmid transfections were performed with 2  $\mu\text{g}$  of PDCD4-pcDNA 3.1 (zeromycin), kindly gifted by Yang Hsin-Sheng, using an empty plasmid as control. Cortical neurons were cotransfected with 1  $\mu\text{g}$  pmax-GFP Green-cat (ThermoFisher). In the specific case of primary DRG neuron cultures, the cell permeable Accell SMART POOL Pdc4 siRNA 5 nmol (Cat# E-097927-00-0005) or Accell Non-Targeting Pool 5 nmol (Cat# D-001910-10-05), both from GE Healthcare Dharmacon—Horizon Solutions, were incubated at 1  $\mu\text{M}$  final concentration in the cell body side of compartmentalized chambers after DRGs develop neurites. The PC12 cell line was transfected using commercial lentiviral particles from Dharmacon GE, with an inducible shRNA against PDCD4 (SMARTchoice Inducible Rat PDCD4 PGK-turboGFP shRNA, 100  $\mu\text{L}$ ,  $10^7$  TU/mL; Material# VSR6432-223515627), or shScrambled control

Di Paolo et al.

(SMARTchoice Inducible Non-targeting Control PGK/TurboGFP, 50  $\mu$ L,  $10^7$  TU/mL; Material# VSC6580). After transfection, cells were grown in complete medium for 24 h and selected with 5  $\mu$ g/mL of puromycin (P7255, Sigma-Aldrich) for 3–5 d. Cells were then cultured in complete medium to obtain stable cell lines able to induce silencing of PDCD4 or express a scrambled shRNA control.

### Immunohistochemistry and immunocytochemistry

For tissue sections, rats were intracardially perfused with 3% sodium citrate (S4641-500, Sigma-Aldrich) and 4% PFA (158127, Sigma-Aldrich) in Phosphate Buffer Saline (PBS) buffer pH 7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , and 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Following standard cryoprotection and 0.5% triton X-100 (13444259, ThermoFisher) permeabilization, 20  $\mu$ m cryosections were made. Incubation with primary and secondary antibodies was performed in a blocking buffer with 5% NGS (MERCK, NS02L) overnight at 4°C. The PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ) was used for washes. For primary neurons and cell lines, cells were rinsed with PBS buffer and fixed with 4% PFA, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 4% sucrose in PBS buffer for 30 min (RT), permeabilized in 0.2% Triton + 10 mM glycine in PBS for 20 min (RT) and incubated with antibodies overnight. Cells were mounted using Vectashield with DAPI (H-1200-10, VectorLabs) or Pro-Long Gold Antifade (P36930, ThermoFisher) mountant reagents. For a list of antibodies and probes used, please see Supplemental Material.

### Puro-PLA protocol

Ventral roots were extracted from adult rats and incubated in neurobasal media with puromycin at 300  $\mu$ M. Then a fixation with 4% PFA for 1 h was performed and cryosections were made as described above. The PLA protocol was carried out according to the manufacturer's instructions of Duolink, Sigma using the following reagents: Duolink In Situ PLA Probe Anti-Rabbit PLUS (Cat#DUO92002-30RXN), Duolink In Situ PLA Probe Anti-Mouse MINUS (Cat#DUO92004-30RXN), Duolink In Situ Detection Reagents FarRed (DUO92013-30RXN).

### Image acquisition and quantification analysis

Neocortex, cerebellum, sciatic nerves, and PC12 cell images were taken using an LSM confocal OLYMPUS FV300 with a 60 $\times$  oil, NA 1.42 objective. For primary cultures, we used an inverted fluorescent microscope ZEISS axiovert 200 M coupled to a CCD camera (Photometrics CoolSnap MYO). For axonal length images, a 10 $\times$  air NA 0.3 or 20 $\times$  air NA 0.8 were used, while immunofluorescence quantification was done with a 63 $\times$  oil NA 1.3. For PLA experiments on ventral roots, an LSM confocal ZEISS 800 was used with a 63 $\times$  oil, NA 1.4. The stacks were always taken at an ideal  $\mu$ m number between each z plane.

For image quantification, the Fiji (*Just Image J*) tools (Schindelin et al. 2012) and the Neuron\_Growth plugin software developed by Fanti and collaborators at the Universidad Nacional Autónoma de México (<http://www.ifc.unam.mx/ffm/>

conditions.html) were used. For full details of quantification methods, see Supplemental Methods.

### Ribosome profiling

Cells were treated with 100 mg/ $\mu$ L of cycloheximide (01810, Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C in the hood to stop translation before collection of RNA on ice. A transcriptome sample was separated to use as total RNA control and submitted to RNA extraction using mirVana Isolation Kit (ThermoFisher, Cat# AM1560) and RNA-seq protocol. At the same time, a proteome sample was separated and submitted to label-free quantitative proteomics using an LC-MS/MS Orbitrap Fusion. For translatoome samples, cells were lysed and a polysomal pellet was obtained by ultracentrifugation in sucrose cushion, resuspended and digested with Benzonase (Sigma-Aldrich, Cat# E1014). Ribosomal footprints were isolated running a denaturalized 15% PAGE 7 M urea, cutting the proper band identified by length (~30 nt) and extracting RNA from gel slice. Ribosomal footprints quality and quantity was checked using 2100 Agilent Bioanalyzer Small RNA Kit and submitted to small RNA-seq protocol. Two biological replicates per condition (shPDCD4 and shScrambled) and per compartment (transcriptome, translatoome and proteome) were obtained.

### Sequencing and bioinformatic analysis

All transcriptome and translatoome samples were sequenced in BGI Tech Solutions. Transcriptome samples were sequenced using RNA-Seq Quantification Library (Normal Library: 2–10  $\mu$ g) protocol, with poly(A)<sup>+</sup> selection and 20 million paired-end ( $2 \times 100$  bp) reads obtained. Translatoome samples were submitted to Small RNA Library (Low-Input Library: 0.2–1  $\mu$ g) protocol and 40 million single-end reads were obtained. Sequence data is available at the NCBI Sequence Read Archive (SRA; <https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>) under BioProject ID PRJNA6 11824.

Sequences were mapped using *bowtie2* (Langmead and Salzberg 2012) versus curated mRNAs described in the mouse genome (available at NCBI ftp site). Read counts were estimated by *featureCounts* (Liao et al. 2014) and differential gene expression analysis between transcriptomes or translatoomes was done using *edgeR* (Robinson et al. 2010). Normalized counts were exported and translational efficiency was calculated and contrasted between conditions (shPDCD4 vs. shScrambled) using *Xtail R* package (Xiao et al. 2016). Gene lists analysis was performed using the online free tool *STRING* (Jensen et al. 2009) and in-house software (Radio S, Sotelo-Silveira JR, and Smircich P, in prep.; <https://github.com/sradiouy/IdMiner/>).

For comparison between potential PDCD4 translational targets and axonal transcriptomes, we used published axonal RNA-seq data sets (Zappulo et al. 2017; Nijssen et al. 2018). Downloaded FASTQ files were mapped to the *Mus musculus* genome (GRCm38) with *HISAT2* (Kim et al. 2015). *StringTie* (Pertea et al. 2015, 2016) was used to assemble and quantify the transcripts. For subsequent analysis, low expression genes were removed (TPM < 1). For the comparison, mouse orthologs of the potential PDCD4 translational targets were used, since all the axonal transcriptomes data sets come from murine models. The Venn diagram was performed with the *VennDiagram* package of R (Chen and Boutros 2011). The EASE Score (a modified Fisher exact



## PDCD4 can modulate axonal growth and regeneration

P-value) was used to test if axonal transcriptomes were enriched in potential PDCD4 translational targets, and specifically those related with axonal growth. Extended protocols and details are available in SI Appendix.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available for this article.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the School of Life Sciences Imaging (SLIM) facility in the University of Nottingham and the IIBCE Confocal and Sequencing Facility. We would like to acknowledge the following institutions for the financial support received: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) for funding projects codes: INI\_X\_2011\_1\_3852, POS\_NAC\_2012\_1\_8584, POS\_NAC\_2013\_1\_11165, POS\_NAC\_2016\_1\_129865, POS\_NAC\_2016\_1\_129959; Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) for funding projects codes: CSIC Iniciación 2013 #197 and #370; Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA); Wellcome Trust (Seed Award UNS56079 to F.D.-B. and R.M.-R.); the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Wood-Whelan Fellowships grants of 2017, the 2018 American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB)-PROLAB fellowships, and the Science and Innovation Fund from the Foreign and Commonwealth Office-ANII Grant code UK\_ID\_2015\_1\_3.

**Author contributions:** J.R.S.-S. conceived the project. J.R.S.-S. and D.M. conceptualized the project. J.R.S.-S. and F.D.-B. designed and supervised the research. A.D.P. performed the experiments for Figures 1, 2, 5 and Supplemental Figure S1. G.E. performed the experiments and data curation for Figures 3, 4 and Supplemental Figures S2–S7. R.M.-R. and J.F. performed experiments. A.M., T.K., and N.C. contributed new reagents and resources. A.D.P. and G.E. analyzed data, and A.D.P., G.E., F.D.-B., and J.R.S.-S. wrote the paper.

Received March 22, 2020; accepted July 20, 2020.

## REFERENCES

- Achari C, Winslow S, Larsson C. 2015. Down regulation of CLDN1 induces apoptosis in breast cancer cells. *PLoS ONE* **10**: e0130300. doi:10.1371/journal.pone.0130300
- Acosta R, Montañez C, Fuentes-Mera L, Gonzalez E, Gómez P, Quintero-Mora L, Mornet D, Alvarez-Salas LM, Cisneros B. 2004. Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Exp Cell Res* **296**: 265–275. doi:10.1016/j.yexcr.2004.01.015
- Asangani IA, Rasheed SAK, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. 2008. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* **27**: 2128–2136. doi:10.1038/sj.onc.1210856
- Bali N, Arimoto JM, Morgan TE, Finch CE. 2013. Progesterone antagonism of neurite outgrowth depends on microglial activation via Pgrmc1/S2R. *Endocrinology* **154**: 2468–2480. doi:10.1210/en.2012-2109
- Banker G. 2018. The development of neuronal polarity: a retrospective view. *J Neurosci* **38**: 1867–1873. doi:10.1523/JNEUROSCI.1372-16.2018
- Bassani S, Passafaro M. 2012. TSPAN7: a new player in excitatory synapse maturation and function. *Bioarchitecture* **2**: 95–97. doi:10.4161/bioa.20829
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams E-J, et al. 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* **163**: 463–468. doi:10.1083/jcb.200305129
- Bitomsky N, Böhm M, Klempnauer K-H. 2004. Transformation suppressor protein Pdc4 interferes with JNK-mediated phosphorylation of c-Jun and recruitment of the coactivator p300 by c-Jun. *Oncogene* **23**: 7484–7493. doi:10.1038/sj.onc.1208064
- Biyane A, Ohnheiser J, Singh P, Klempnauer K-H. 2015. A novel mechanism for the control of translation of specific mRNAs by tumor suppressor protein Pdc4: inhibition of translation elongation. *Oncogene* **34**: 1384–1392. doi:10.1038/onc.2014.83
- Braunewell KH, Dwyer AD, Richter F, Trappe K, Zhao C, Giegling I, Schönath K, Rujescu D. 2011. Association of VSNL1 with schizophrenia, frontal cortical function, and biological significance for its gene product as a modulator of cAMP levels and neuronal morphology. *Transl Psychiatry* **1**: e22. doi:10.1038/tp.2011.20
- Canclini L, Wallrabe H, Di Paolo A, Kun A, Calliari A, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR. 2014. Association of Myosin Va and Schwann cell-derived RNA in mammal myelinated axons, analyzed by immunocytochemistry and confocal FRET microscopy. *Methods* **66**: 153–161. doi:10.1016/j.ymeth.2013.06.007
- Chédotal A, Kerjan G, Moreau-Fauvarque C. 2005. The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. *Cell Death Differ* **12**: 1044–1056. doi:10.1038/sj.cdd.4401707
- Chen H, Boutros PC. 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* **12**: 35. doi:10.1186/1471-2105-12-35
- Chen P, Xu L, Zhang J, Cai X, Yang Y, Yu J, Qiu J, Ge J, Yu K, Zhuang J. 2019. Up-regulation of SorCS1, an important sorting receptor, in the retina of a form-deprivation rat model. *Cell Mol Neurobiol* **40**: 395–405. doi:10.1007/s10571-019-00740-1
- Chiappalone M, Bove M, Vato A, Tedesco M, Martinoia S. 2006. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain Res* **1093**: 41–53. doi:10.1016/j.brainres.2006.03.049
- Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ, Marshak S. 2010. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol* **70**: 271. doi:10.1002/dneu.20774
- Cotterill E, Hall D, Wallace K, Mundy WR, Eglén SJ, Shafer TJ. 2016. Characterization of early cortical neural network development in multiwell microelectrode array plates. *J Biomol Screen* **21**: 510–519. doi:10.1177/1087057116640520
- Dajas-Bailador F, Bonev B, Garcez P, Stanley P, Guillemot F, Papalopulu N. 2012. microRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nat Neurosci* **15**: 697–699. doi:10.1038/nn.3082
- Deglinerti A, Jaffrey SR. 2012. Insights into the roles of local translation from the axonal transcriptome. *Open Biol* **2**: 120079. doi:10.1098/rsob.120079
- Dorrello NV, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. 2006. S6K1- and pTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* **314**: 467–471. doi:10.1126/science.1130276
- Duman-Scheel M. 2009. Netrin and DCC: axon guidance regulators at the intersection of nervous system development and cancer. *Curr Drug Targets* **10**: 602–610. doi:10.2174/138945009788680428

- Eastman G, Smircich P, Sotelo-Silveira JR. 2018. Following ribosome footprints to understand translation at a genome wide level. *Comput Struct Biotechnol J* **16**: 167–176. doi:10.1016/j.csbj.2018.04.001
- Farias J, Holt CE, Sotelo JR, Sotelo-Silveira JR. 2020. Axon micro-dissection and transcriptome profiling reveals the in vivo RNA content of fully differentiated myelinated motor axons. *RNA* **26**: 595–612. doi:10.1261/rna.073700.119
- Fiesel FC, Schurr C, Weber SS, Kahle PJ. 2011. TDP-43 knockdown impairs neurite outgrowth dependent on its target histone deacetylase 6. *Mol Neurodegener* **6**: 64. doi:10.1186/1750-1326-6-64
- Fink CC, Bayer K-U, Myers JW, Ferrell JE Jr, Schulman H, Meyer T. 2003. Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the  $\beta$  but not the  $\alpha$  isoform of CaMKII. *Neuron* **39**: 283–297. doi:10.1016/S0896-6273(03)00428-8
- Flowers BM, Rusnak LE, Wong KE, Banks DA, Muniyikwa MR, McFarland AG, Hinton SD. 2014. The pseudophosphatase MK-STYX induces neurite-like outgrowths in PC12 cells. *PLoS ONE* **9**: e114535. doi:10.1371/journal.pone.0114535
- Frank CL, Tsai L-H. 2009. Alternative functions of core cell cycle regulators in neuronal migration, neuronal maturation, and synaptic plasticity. *Neuron* **62**: 312–326. doi:10.1016/j.neuron.2009.03.029
- Fukao A, Sasano Y, Imataka H, Inoue K, Sakamoto H, Sonenberg N, Thoma C, Fujiwara T. 2009. The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a Poly(A)- and eIF4A-dependent manner. *Mol Cell* **36**: 1007–1017. doi:10.1016/j.molcel.2009.11.013
- Gao F, Zhang P, Zhou C, Li J, Wang Q, Zhu F, Ma C, Sun W, Zhang L. 2007. Frequent loss of PDCC4 expression in human glioma: possible role in the tumorigenesis of glioma. *Oncol Rep* **17**: 123–128. doi:10.3892/or.17.1.123
- Ghiani CA, Starcevic M, Rodríguez-Fernández IA, Nazarian R, Cheli VT, Chan LN, Malvar JS, de Vellis J, Sabatti C, Dell'Angelica EC. 2010. The dysbindin-containing complex (BLOC-1) in brain: developmental regulation, interaction with SNARE proteins and role in neurite outgrowth. *Mol Psychiatry* **15**: 115. 204–215. doi:10.1038/mp.2009.152
- Göke R, Barth P, Schmidt A, Samans B, Lankat-Buttgereit B. 2004. Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21<sup>Waf1/Cip1</sup>. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**: C1541–C1546. doi:10.1152/ajpcell.00025.2004
- 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
- Haas A, Nilges BS, Leidel SA, Klempner K-H. 2020. PDCC4 controls the G1/S-phase transition in a telomerase-immortalized epithelial cell line and affects the expression level and translation of multiple mRNAs. *Sci Rep* **10**: 2758. doi:10.1038/s41598-020-59678-w
- Hattori D, Millard SS, Wojtowicz WM, Zipursky SL. 2008. Dscam-mediated cell recognition regulates neural circuit formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 597–620. doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175250
- He Z, Jin Y. 2016. Intrinsic control of axon regeneration. *Neuron* **90**: 437–451. doi:10.1016/j.neuron.2016.04.022
- Heine P, Ehrlicher A, Käs J. 2015. Neuronal and metastatic cancer cells: unlike brothers. *Biochim Biophys Acta* **1853**: 3126–3131. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.06.011
- Holt CE, Martin KC, Schuman EM. 2019. Local translation in neurons: visualization and function. *Nat Struct Mol Biol* **26**: 557–566. doi:10.1038/s41594-019-0263-5
- Hudson BJ. 2008. Loss of PDCC4 results in insulin resistance through ER stress. University of Pennsylvania. <https://repository.upenn.edu/dissertations/AAI3347091>
- Huebner EA, Strittmatter SM. 2009. Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. *Results Probl Cell Differ* **48**: 339–351. doi:10.1007/400\_2009\_19
- Hutchinson KM, Vonhoff F, Duch C. 2014. Dscam1 is required for normal dendrite growth and branching but not for dendritic spacing in *Drosophila* motoneurons. *J Neurosci* **34**: 1924–1931. doi:10.1523/JNEUROSCI.3448-13.2014
- Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**: 218–223. doi:10.1126/science.1168978
- Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. 2012. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc* **7**: 1534–1550. doi:10.1038/nprot.2012.086
- Iwasaki Y, Ishikawa M, Okada N, Koizumi S. 1997. Induction of a distinct morphology and signal transduction in TrkB/PC12 cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* **68**: 927–934. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.68030927.x
- Iwasaki K, Isaacs KR, Jacobowitz DM. 1998. Brain-derived neurotrophic factor stimulates neurite outgrowth in a calcitonin-enriched neuronal culture system. *Int J Dev Neurosci* **16**: 135–145. doi:10.1016/S0736-5748(98)00011-2
- Jansen AP, Camalier CE, Colburn NH. 2005. Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis. *Cancer Res* **65**: 6034–6041. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2119
- Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, Doerks T, Julien P, Roth A, Simonovic M, et al. 2009. STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* **37**: D412–D416. doi:10.1093/nar/gkn760
- Jiang Y, Zhao S, Ding Y, Nong L, Li H, Gao G, Zhou D, Xu N. 2017. MicroRNA-21 promotes neurite outgrowth by regulating PDCC4 in a rat model of spinal cord injury. *Mol Med Rep* **16**: 2522–2528. doi:10.3892/mmr.2017.6862
- Jiménez-Díaz L, Géranton SM, Passmore GM, Leith JL, Fisher AS, Berliocchi L, Sivasubramanian AK, Sheasby A, Lumb BM, Hunt SP. 2008. Local translation in primary afferent fibers regulates nociception. *PLoS ONE* **3**: e1961. doi:10.1371/journal.pone.0001961
- Jung H, O'Hare CM, Holt CE. 2011. Translational regulation in growth cones. *Curr Opin Genet Dev* **21**: 458–464. doi:10.1016/j.gde.2011.04.004
- 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. doi:10.1038/nrn3210
- Kar AN, MacGibeny MA, Gervasi NM, Gioio AE, Kaplan BB. 2013. Intra-axonal synthesis of eukaryotic translation initiation factors regulates local protein synthesis and axon growth in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* **33**: 7165–7174. doi:10.1523/JNEUROSCI.2040-12.2013
- Kawabe H, Neeb A, Dimova K, Young SM, Takeda M, Katsurabayashi S, Mitkovski M, Malakhova OA, Zhang D-E, Umikawa M, et al. 2010. Regulation of Rap2A by the ubiquitin ligase Nedd4-1 controls neurite development. *Neuron* **65**: 358–372. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.007
- Kim J, Park RY, Chen J-K, Kim J, Jeong S, Ohn T. 2014. Splicing factor SRSF3 represses the translation of programmed cell death 4 mRNA by associating with the 5'-UTR region. *Cell Death Differ* **21**: 481–490. doi:10.1038/cdd.2013.171
- 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

## PDCD4 can modulate axonal growth and regeneration

- Kuja-Panula J, Kiiltomäki M, Yamashiro T, Rouhiainen A, Rauvala H. 2003. AMIGO, a transmembrane protein implicated in axon tract development, defines a novel protein family with leucine-rich repeats. *J Cell Biol* **160**: 963–973. doi:10.1083/jcb.200209074
- Kumar D, Bansal G, Narang A, Basak T, Abbas T, Dash D. 2016. Integrating transcriptome and proteome profiling: strategies and applications. *Proteomics* **16**: 2533–2544. doi:10.1002/pmic.201600140
- Lain E, Carnejac S, Escher P, Wilson MC, Lomo T, Gajdran N, Brenner HR. 2009. A novel role for embigin to promote sprouting of motor nerve terminals at the neuromuscular junction. *J Biol Chem* **284**: 8930–8939. doi:10.1074/jbc.M809491200
- Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**: 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923
- Li Y, Jia Y, Wang D, Zhuang X, Li Y, Guo C, Chu H, Zhu F, Wang J, Wang X, et al. 2020. Programmed cell death 4 as an endogenous suppressor of BDNF translation is involved in stress-induced depression. *Mol Psychiatry* doi:10.1038/s41380-020-0692-x
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**: 923–930. doi:10.1093/bioinformatics/btt656
- Lin AC, Holt CE. 2008. Function and regulation of local axonal translation. *Curr Opin Neurobiol* **18**: 60–68. doi:10.1016/j.conb.2008.05.004
- Lin C-H, Hsieh M, Fan S-S. 2011. The promotion of neurite formation in Neuro2A cells by mouse Mob2 protein. *FEBS Lett* **585**: 523–530. doi:10.1016/j.febslet.2011.01.003
- Lin T, Pan P-Y, Lai Y-T, Chiang K-W, Hsieh H-L, Wu Y-P, Ke J-M, Lee M-C, Liao S-S, Shih H-T, et al. 2015. Spindle-F is the central mediator of Ik2 kinase-dependent dendrite pruning in *Drosophila* sensory neurons. *PLoS Genet* **11**: e1005642. doi:10.1371/journal.pgen.1005642
- Liwak U, Thakor N, Jordan LE, Roy R, Lewis SM, Pardo OE, Seckl M, Holcik M. 2012. Tumor suppressor PDCD4 represses internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic proteins and is regulated by S6 kinase 2. *Mol Cell Biol* **32**: 1818–1829. doi:10.1128/MCB.06317-11
- Loh PG, Yang H-S, Walsh MA, Wang Q, Wang X, Cheng Z, Liu D, Song H. 2009. Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor Pdc4. *EMBO J* **28**: 274–285. doi:10.1038/emboj.2008.278
- Lucci C, Mesquita-Ribeiro R, Rathbone A, Dajas-Bailador F. 2020. Spatiotemporal regulation of GSK3 $\beta$  levels by miRNA-26a controls axon development in cortical neurons. *Development* **147**: dev180232. doi:10.1242/dev.180232
- Manecka D-L, Mahmood SF, Grumolato L, Lihmann I, Anouar Y. 2013. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) promotes both survival and neurogenesis in PC12 cells through activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway: involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK), calcium, and c-REL. *J Biol Chem* **288**: 14936–14948. doi:10.1074/jbc.M112.434597
- Manna T, Grenningloh G, Miller HP, Wilson L. 2007. Stathmin family protein SCG10 differentially regulates the plus and minus end dynamics of microtubules at steady state in vitro: implications for its role in neurite outgrowth. *Biochemistry* **46**: 3543–3552. doi:10.1021/bi061819d
- Matsuhashi S, Manirujjaman M, Hamajima H, Ozaki I. 2019. Control mechanisms of the tumor suppressor PDCD4: expression and functions. *Int J Mol Sci* **20**: 2304. doi:10.3390/ijms20092304
- Mincheva-Tasheva S, Obis E, Tamarit J, Ros J. 2014. Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-x<sub>L</sub> protein. *Hum Mol Genet* **23**: 1829–1841. doi:10.1093/hmg/ddt576
- Mobarak CD, Anderson KD, Morin M, Beckel-Mitchener A, Rogers SL, Furneaux H, King P, Perrone-Bizzozero NI. 2000. The RNA-binding protein HuD is required for GAP-43 mRNA stability, GAP-43 gene expression, and PKC-dependent neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol Biol Cell* **11**: 3191–3203. doi:10.1091/mbc.11.9.3191
- Moustafa-Kamal M, Kucharski T, El Assad W, Gandin V, Abas Y, Nagar B, Pelletier J, Topisirovic I, Teodoro JG. 2019. The mTORC1/S6K/PDCD4/eIF4A axis determines outcome of mitosis. *bioRxiv* 794545. doi:10.1101/794545v1.abstract
- Mudduluru G, Medved F, Grobholz R, Jost C, Gruber A, Leupold JH, Post S, Jansen A, Colburn NH, Allgayer H. 2007. Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. *Cancer* **110**: 1697–1707. doi:10.1002/cncr.22983
- Munnamalai V, Weaver CJ, Weisheit CE, Venkatraman P, Agim ZS, Quinn MT, Suter DM. 2014. Bidirectional interactions between NOX2-type NADPH oxidase and the F-actin cytoskeleton in neuronal growth cones. *J Neurochem* **130**: 526–540. doi:10.1111/jnc.12734
- Murray JT, Tee AR. 2018. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) in the cancer setting. *Cancers (Basel)* **10**: 168. doi:10.3390/cancers10060168
- Nagara Y, Hagiwara M, Hatano N, Futai E, Suo S, Takaoka Y, Murakami Y, Ito A, Ishiura S. 2012. Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by  $\gamma$ -secretase complex. *Biochem Biophys Res Commun* **417**: 462–467. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.140
- Nakanishi K, Aono S, Hirano K, Kuroda Y, Ida M, Tokita Y, Matsui F, Oohira A. 2006. Identification of neurite outgrowth-promoting domains of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, and involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C signaling pathways in neurogenesis. *J Biol Chem* **281**: 24970–24978. doi:10.1074/jbc.M601498200
- Narasimhan M, Rathinam M, Riar A, Patel D, Mummidi S, Yang H-S, Colburn NH, Henderson GI, Mahimainathan L. 2013. Programmed cell death 4 (PDCD4): a novel player in ethanol-mediated suppression of protein translation in primary cortical neurons and developing cerebral cortex. *Alcohol Clin Exp Res* **37**: 96–109. doi:10.1111/j.1530-0277.2012.01850.x
- Ng YP, He W, Ip NY. 2003. Leukemia inhibitory factor receptor signaling negatively modulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells and sympathetic neurons. *J Biol Chem* **278**: 38731–38739. doi:10.1074/jbc.M304623200
- Nijssen J, Aguila J, Hoogstraaten R, Kee N, Hedlund E. 2018. Axon-seq decodes the motor axon transcriptome and its modulation in response to ALS. *Stem Cell Rep* **11**: 1565–1578. doi:10.1016/j.stemcr.2018.11.005
- Obara I, Hunt SP. 2014. Axonal protein synthesis and the regulation of primary afferent function. *Dev Neurobiol* **74**: 269–278. doi:10.1002/dneu.22133
- Ohtake Y, Hayat U, Li S. 2015. PTEN inhibition and axon regeneration and neural repair. *Neural Regeneration Res* **10**: 1363–1368. doi:10.4103/1673-5374.165496
- Olbrich L, Wessel L, Balakrishnan-Renuka A, Böing M, Brand-Saberi B, Theiss C. 2013. Rapid impact of progesterone on the neuronal growth cone. *Endocrinology* **154**: 3784–3795. doi:10.1210/en.2013-1175
- Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B, Xu B, Connolly L, Kramvis I, Sahin M, et al. 2008. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* **322**: 963–966. doi:10.1126/science.1161566

Di Paolo et al.

- Park KK, Liu K, Hu Y, Kanter JL, He Z. 2010. PTEN/mTOR and axon regeneration. *Exp Neurol* **223**: 45–50. doi:10.1016/j.expneurol.2009.12.032
- Parviainen L, Dihanich S, Anderson GW, Wong AM, Brooks HR, Abeti R, Rezaie P, Lalli G, Pope S, Heales SJ, et al. 2017. Glial cells are functionally impaired in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis and detrimental to neurons. *Acta Neuropathol Commun* **5**: 74. doi:10.1186/s40478-017-0476-y
- Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang T-C, 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. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* **11**: 1650–1667. doi:10.1038/nprot.2016.095
- Riar AK, Narasimhan M, Rathinam ML, Vedpathak D, Mummidu S, Henderson GI, Mahimainathan L. 2014. Ethanol-induced transcriptional activation of programmed cell death 4 (Pcdcd4) is mediated by GSK-3 $\beta$  signaling in rat cortical neuroblasts. *PLoS ONE* **9**: e98080. doi:10.1371/journal.pone.0098080
- Riederer BM, Pellier V, Antonsson B, Di Paolo G, Stimpson SA, Lütjens R, Catsicas S, Grenningloh G. 1997. Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 741–745. doi:10.1073/pnas.94.2.741
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
- Sahoo PK, Smith DS, Perrone-Bizzozero N, Twiss JL. 2018. Axonal mRNA transport and translation at a glance. *J Cell Sci* **131**: jcs196808. doi:10.1242/jcs.196808
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Schmidt T, Jansen AP, Baker AR, Hegamyer G, Hagan JP, Colburn NH. 2008. Translation inhibitor Pcdcd4 is targeted for degradation during tumor promotion. *Cancer Res* **68**: 1254–1260. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1719
- Schnepp A, Komp Lindgren P, Hülsman H, Kröger S, Paulsson M, Hartmann U. 2005. Mouse testican-2. Expression, glycosylation, and effects on neurite outgrowth. *J Biol Chem* **280**: 11274–11280. doi:10.1074/jbc.M414276200
- Shao J, Cao J, Wang J, Ren X, Su S, Li M, Li Z, Zhao Q, Zang W. 2016. MicroRNA-30b regulates expression of the sodium channel Nav1.7 in nerve injury-induced neuropathic pain in the rat. *Mol Pain* **12**: 1744806916671523. doi:10.1177/1744806916671523
- Siddiq MM, Hannila SS, Carmel JB, Bryson JB, Hou J, Nikulina E, Willis MR, Mellado W, Richman EL, Hilaire M, et al. 2015. Metallothionein-I/II promotes axonal regeneration in the central nervous system. *J Biol Chem* **290**: 16343–16356. doi:10.1074/jbc.M114.630574
- Singh P, Wedeken L, Waters LC, Carr MD, Klempner K-H. 2011. Pcdcd4 directly binds the coding region of c-myc mRNA and suppresses its translation. *Oncogene* **30**: 4864–4873. doi:10.1038/onc.2011.202
- Song Z, Han X, Zou H, Zhang B, Ding Y, Xu X, Zeng J, Liu J, Gong A. 2018. PTEN-GSK3 $\beta$ -MOB1 axis controls neurite outgrowth in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci* **75**: 4445–4464. doi:10.1007/s00018-018-2890-0
- Sotelo-Silveira JR, Holt CE. 2014. Introduction to the special issue on local protein synthesis in axons. *Dev Neurobiol* **74**: 207–209. doi:10.1002/dneu.22163
- Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, Furth ME, Valenzuela DM. 1991. trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* **65**: 885–893. doi:10.1016/0092-8674(91)90395-F
- Strickland IT, Richards L, Holmes FE, Wynick D, Uney JB, Wong L-F. 2011. Axotomy-induced miR-21 promotes axon growth in adult dorsal root ganglion neurons. *PLoS ONE* **6**: e23423. doi:10.1371/journal.pone.0023423
- Su C-W, Tharin S, Jin Y, Wightman B, Spector M, Meili D, Tsung N, Rhiner C, Bourikas D, Stoeckli E, et al. 2006. The short coiled-coil domain-containing protein UNC-69 cooperates with UNC-76 to regulate axonal outgrowth and normal presynaptic organization in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol* **5**: 9. doi:10.1186/jbiol39
- Suzuki C, Garces RG, Edmonds KA, Hiller S, Hyberts SG, Marintchev A, Wagner G. 2008. PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 3274–3279. doi:10.1073/pnas.0712235105
- Swanger SA, Bassell GJ. 2011. Making and breaking synapses through local mRNA regulation. *Curr Opin Genet Dev* **21**: 414–421. doi:10.1016/j.gde.2011.04.002
- Tang G-B, Zeng Y-Q, Liu P-P, Mi T-W, Zhang S-F, Dai S-K, Tang Q-Y, Yang L, Xu Y-J, Yan H-L, et al. 2017. The histone H3K27 demethylase UTX regulates synaptic plasticity and cognitive behaviors in mice. *Front Mol Neurosci* **10**: 267. doi:10.3389/fnmol.2017.00267
- Taylor AM, Jean NL. 2011. Microfluidic and compartmentalized platforms for neurobiological research. *Crit Rev Biomed Eng* **39**: 185–200. doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v39.i3.20
- Terenzio M, Koley S, Samra N, Rishal I, Zhao Q, Sahoo PK, Urisman A, Marvaldi L, Oses-Prieto JA, Forester C, et al. 2018. Locally translated mTOR controls axonal local translation in nerve injury. *Science* **359**: 1416–1421. doi:10.1126/science.aan1053
- tom Dieck S, Kochen L, Hanus C, Heumüller M, Bartnik I, Nassim-Assir B, Merk K, Mosler T, Garg S, Bunse S, et al. 2015. Direct visualization of newly synthesized target proteins in situ. *Nat Methods* **12**: 411–414. doi:10.1038/nmeth.3319
- Uboba NV, Flajolet M, Nairn AC, Picciotto MR. 2007. A calcium- and calmodulin-dependent kinase *lu*/microtubule affinity regulating kinase 2 signaling cascade mediates calcium-dependent neurite outgrowth. *J Neurosci* **27**: 4413–4423. doi:10.1523/JNEUROSCI.0725-07.2007
- van Kesteren RE, Carter C, Dissel HMG, van Minnen J, Gouwenberg Y, Syed NI, Spencer GE, Smit AB. 2006. Local synthesis of actin-binding protein  $\beta$ -thymosin regulates neurite outgrowth. *J Neurosci* **26**: 152–157. doi:10.1523/JNEUROSCI.4164-05.2006
- 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**: 331–342. doi:10.1523/JNEUROSCI.3073-04.2005
- Villarroel-Campos D, Bronfman FC, Gonzalez-Billault C. 2016. Rab GTPase signaling in neurite outgrowth and axon specification. *Cytoskeleton* **73**: 498–507. doi:10.1002/cm.21303
- Vuppalachandi D, Willis DE, Twiss JL. 2009. Regulation of mRNA transport and translation in axons. *Results Probl Cell Differ* **48**: 193–224. doi:10.1007/400\_2009\_16
- Wang Q, Dong Z, Liu X, Song X, Song Q, Shang Q, Jiang Y, Guo C, Zhang L. 2013. Programmed cell death-4 deficiency prevents diet-induced obesity, adipose tissue inflammation, and insulin resistance. *Diabetes* **62**: 4132–4143. doi:10.2337/db13-0097
- Wang W, Zhong Q, Teng L, Bhatnagar N, Sharma B, Zhang X, Luther W, Haynes LP, Burgoyne RD, Vidal M, et al. 2014. Mutations that disrupt PHOXB interaction with the neuronal calcium sensor HPCAL1 impede cellular differentiation in neuroblastoma. *Oncogene* **33**: 3316–3324. doi:10.1038/onc.2013.290

## PDCD4 can modulate axonal growth and regeneration

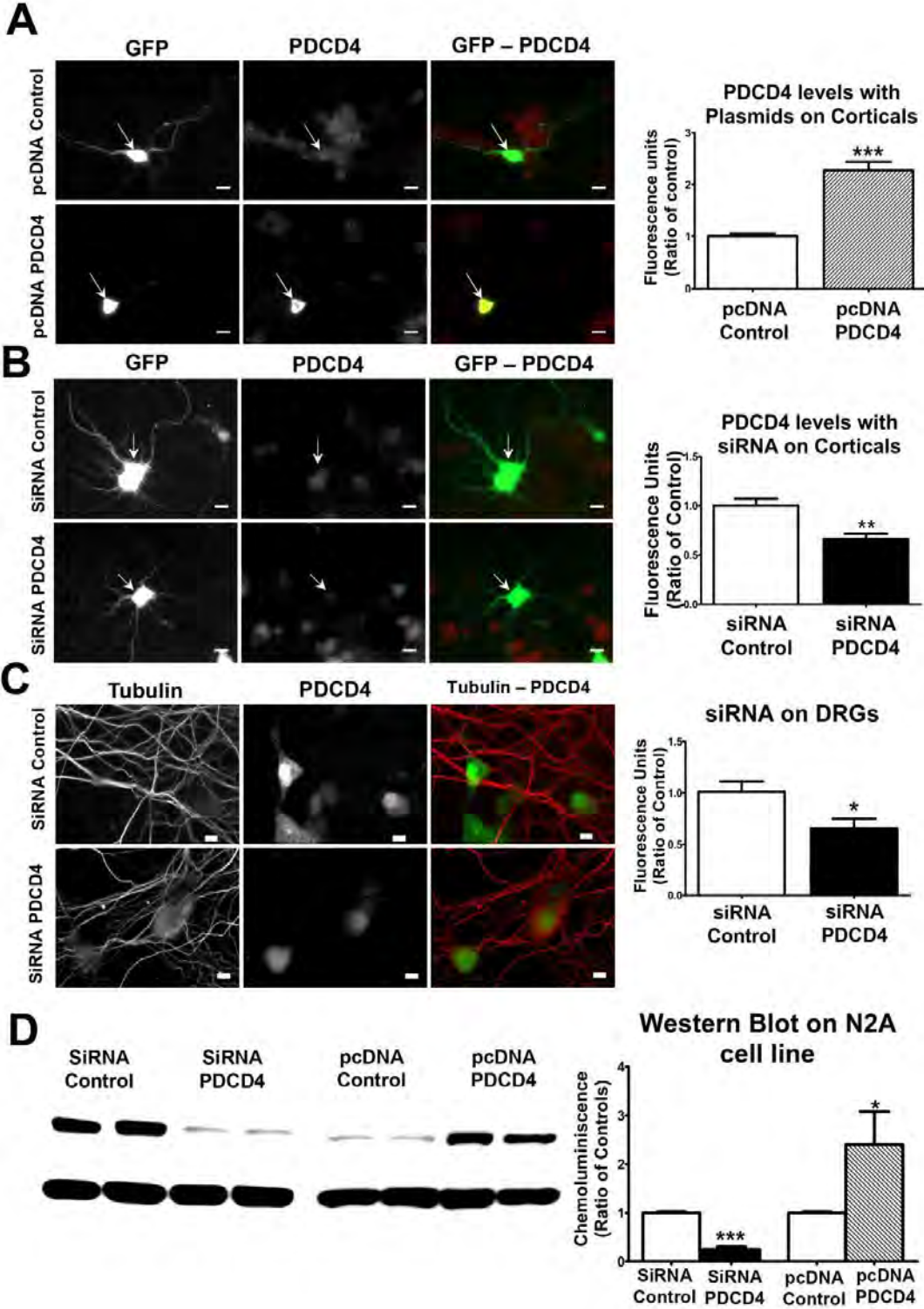
- Wang Q, Zhu J, Wang Y-W, Dai Y, Wang Y-L, Wang C, Liu J, Baker A, Colburn NH, Yang H-S. 2017. Tumor suppressor Pcdcd4 attenuates Sin1 translation to inhibit invasion in colon carcinoma. *Oncogene* **36**: 6225–6234. doi:10.1038/onc.2017.228
- Wayman GA, Kaech S, Grant WF, Davare M, Impey S, Tokumitsu H, Nozaki N, Banker G, Soderling TR. 2004. Regulation of axonal extension and growth cone motility by calmodulin-dependent protein kinase I. *J Neurosci* **24**: 3786–3794. doi:10.1523/JNEUROSCI.3294-03.2004
- Wedeken L, Singh P, Klempnauer K-H. 2011. Tumor suppressor protein Pcdcd4 inhibits translation of p53 mRNA. *J Biol Chem* **286**: 42855–42862. doi:10.1074/jbc.M111.269456
- Xiao Z, Zou Q, Liu Y, Yang X. 2016. Genome-wide assessment of differential translations with ribosome profiling data. *Nat Commun* **7**: 11194. doi:10.1038/ncomms11194
- Yamamoto A, Uchiyama K, Nara T, Nishimura N, Hayasaka M, Hanaoka K, Yamamoto T. 2014. Structural abnormalities of corpus callosum and cortical axonal tracts accompanied by decreased anxiety-like behavior and lowered sociability in spock3- mutant mice. *Dev Neurosci* **36**: 381–395. doi:10.1159/000363101
- Yan X, Liu J, Ye Z, Huang J, He F, Xiao W, Hu X, Luo Z. 2016. CaMKII-mediated CREB phosphorylation is involved in Ca<sup>2+</sup>-induced BDNF mRNA transcription and neurite outgrowth promoted by electrical stimulation. *PLoS ONE* **11**: e0162784. doi:10.1371/journal.pone.0162784
- Yang H-S, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC, Costes S, Lockett SJ, Sonenberg N, Colburn NH. 2003. The transformation suppressor Pcdcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol* **23**: 26–37. doi:10.1128/MCB.23.1.26-37.2003
- Yang H-S, Matthews CP, Clair T, Wang Q, Baker AR, Li C-CH, Tan T-H, Colburn NH. 2006. Tumorigenesis suppressor Pcdcd4 down-regulates mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 expression to suppress colon carcinoma cell invasion. *Mol Cell Biol* **26**: 1297–1306. doi:10.1128/MCB.26.4.1297-1306.2006
- Yang H, Cheng X, Yao Q, Li J, Ju G. 2008. The promotive effects of thymosin  $\beta_4$  on neuronal survival and neurite outgrowth by up-regulating L1 expression. *Neurochem Res* **33**: 2269–2280. doi:10.1007/s11064-008-9712-y
- Yoon BC, Zivraj KH, Holt CE. 2009. Local translation and mRNA trafficking in axon pathfinding. *Results Probl Cell Differ* **48**: 269–288. doi:10.1007/400\_2009\_5
- Yu J, Lin S, Wang M, Liang L, Zou Z, Zhou X, Wang M, Chen P, Wang Y. 2016. Metastasis suppressor 1 regulates neurite outgrowth in primary neuron cultures. *Neuroscience* **333**: 123–131. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.07.002
- Zappulo A, van den Bruck D, Mattioli C C, Franke V, Imami K, McShane E, Moreno-Estelles M, Calviello L, Filipchuk 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
- Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, Hamajima H, Yasutake T, Eguchi Y, Ideguchi H, Yamamoto K, Matsuhashi S. 2006. Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor- $\beta$ 1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **25**: 6101–6112. doi:10.1038/sj.onc.1209634
- Zhang W, Wang L, Liu Y, Xu J, Zhu G, Cang H, Li X, Bartlam M, Hensley K, Li G, et al. 2009. Structure of human lanthionine synthase C-like protein 1 and its interaction with Eps8 and glutathione. *Genes Dev* **23**: 1387–1392. doi:10.1101/gad.1789209
- Zhen Y, Li D, Li W, Yao W, Wu A, Huang J, Gu H, Huang Y, Wang Y, Wu J, et al. 2016. Reduced PDCD4 expression promotes cell growth through PI3K/Akt signaling in non-small cell lung cancer. *Oncol Res* **23**: 61–68. doi:10.3727/096504015X14478843952861
- Zheng W, Chong C-M, Wang H, Zhou X, Zhang L, Wang R, Meng Q, Lazarovici P, Fang J. 2016. Artemisinin conferred ERK mediated neuroprotection to PC12 cells and cortical neurons exposed to sodium nitroprusside-induced oxidative insult. *Free Radic Biol Med* **97**: 158–167. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.023
- Zhu K, Chen X, Liu J, Ye H, Zhu L, Wu JY. 2013. AMPK interacts with DSCAM and plays an important role in netrin-1 induced neurite outgrowth. *Protein Cell* **4**: 155–161. doi:10.1007/s13238-012-2126-2
- Zubarev RA. 2013. The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. *Proteomics* **13**: 723–726. doi:10.1002/pmic.201200451

## **Supplemental Figures and Figure Legends.**

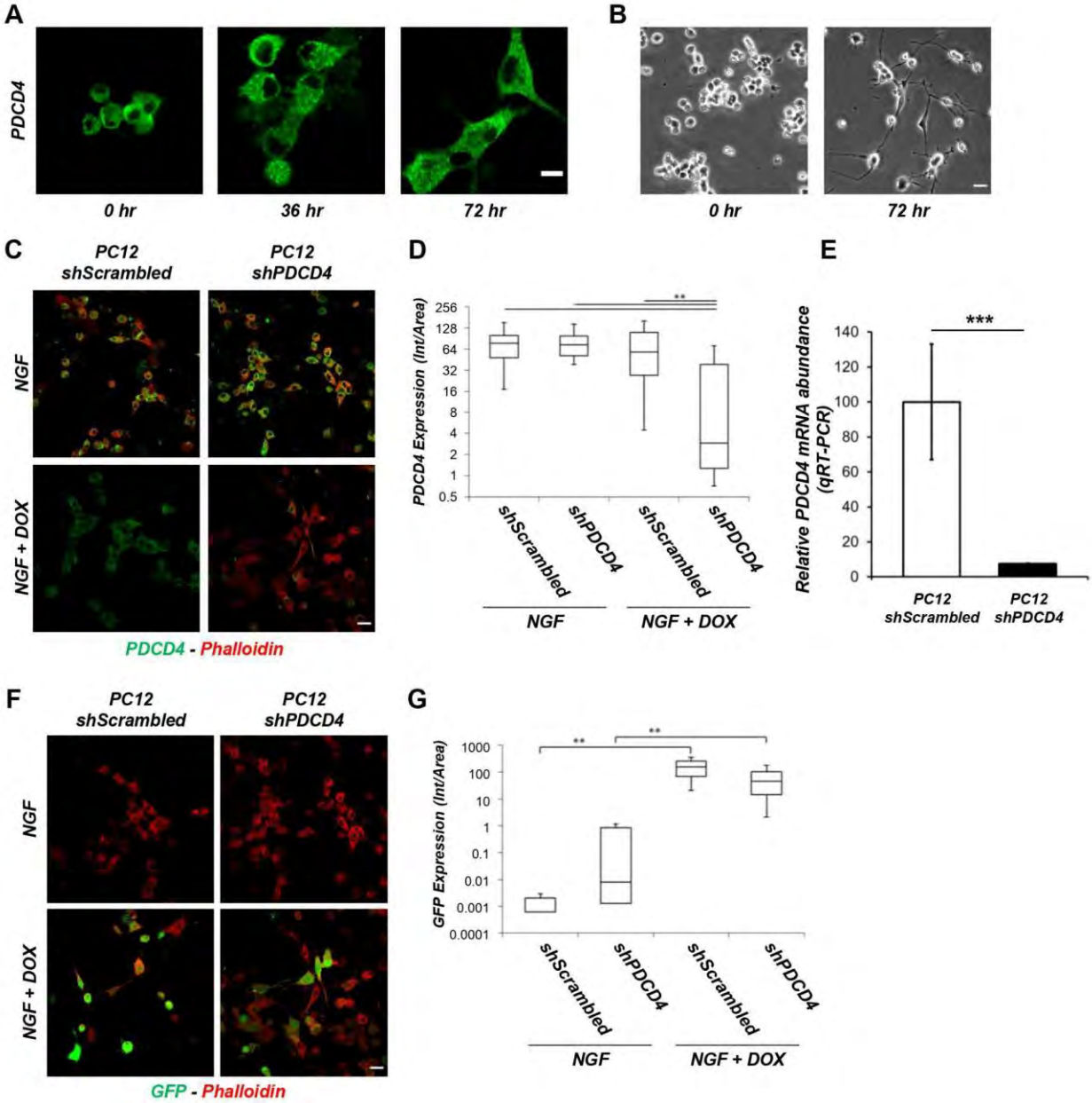
PDCD4 regulates axonal growth by translational repression of neurite growth-related genes and is modulated during nerve injury responses

Andrés Di Paolo, Guillermo Eastman, Raquel Mesquita-Ribeiro, Joaquina Farias, Andrew Macklin, Thomas Kislinger, Nancy Colburn, David Munroe, José Sotelo Sosa, Federico Dajas-Bailador, José Roberto Sotelo-Silveira.

Supplemental Figure 1.

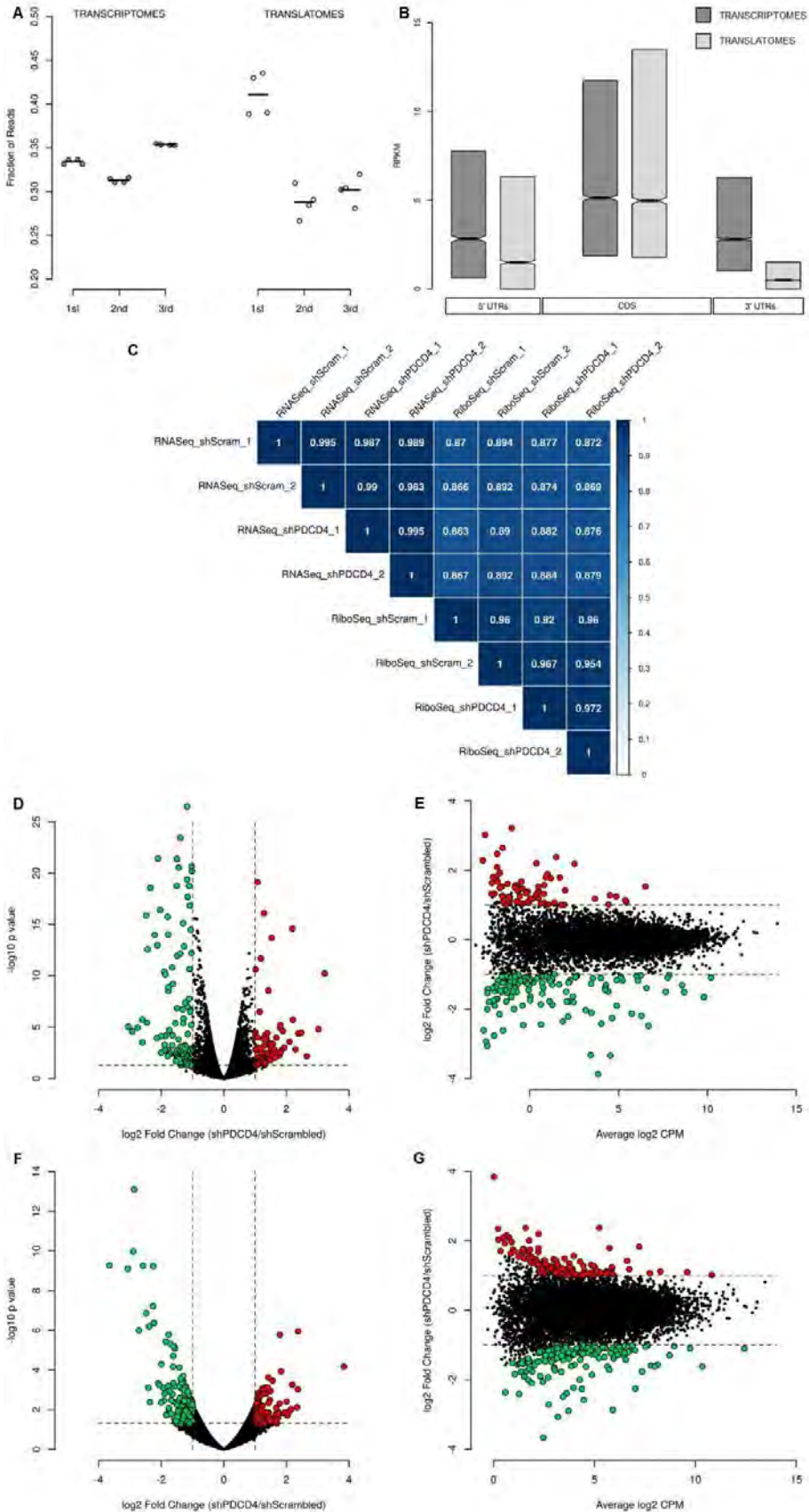


Supplemental Figure 2.

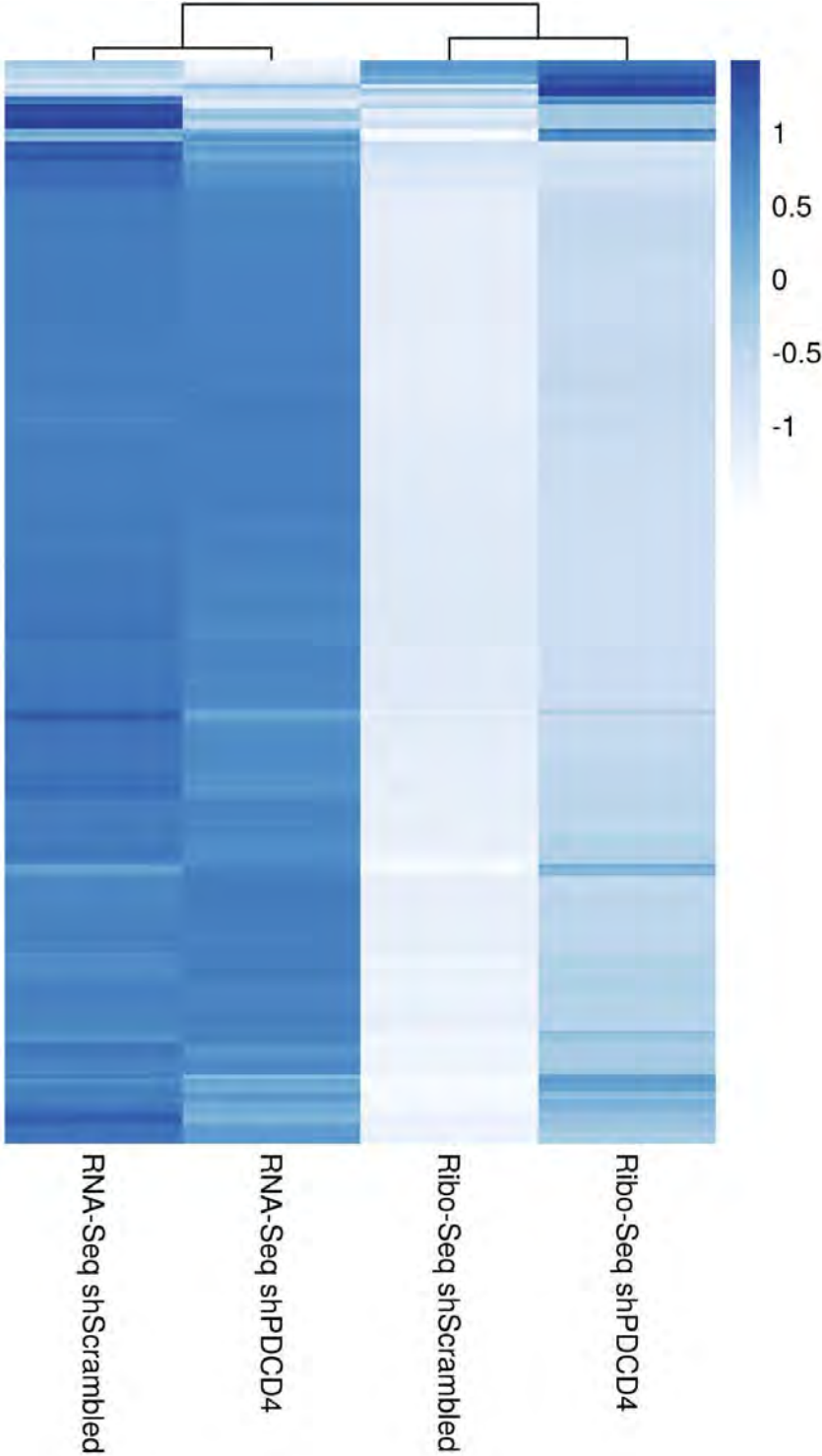




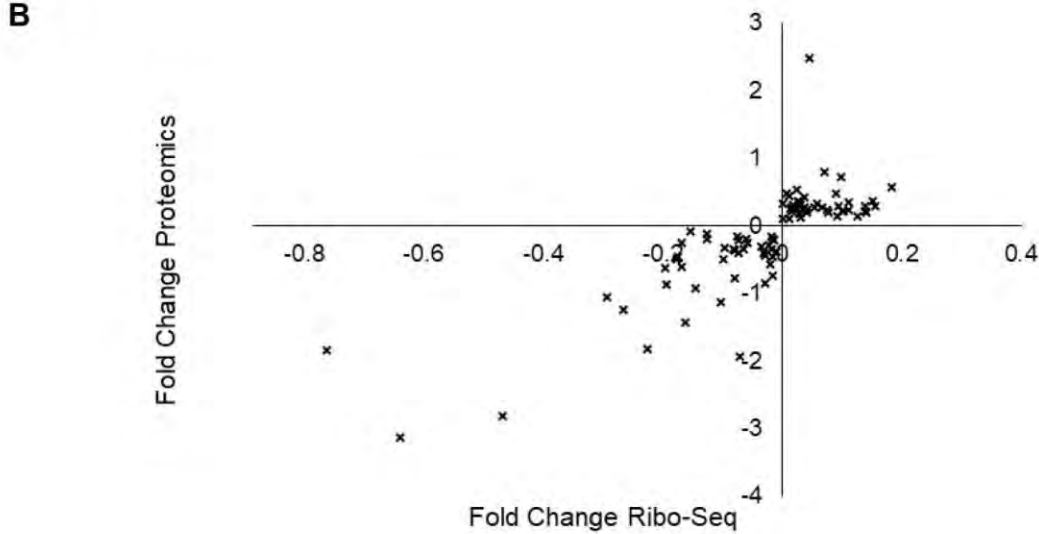
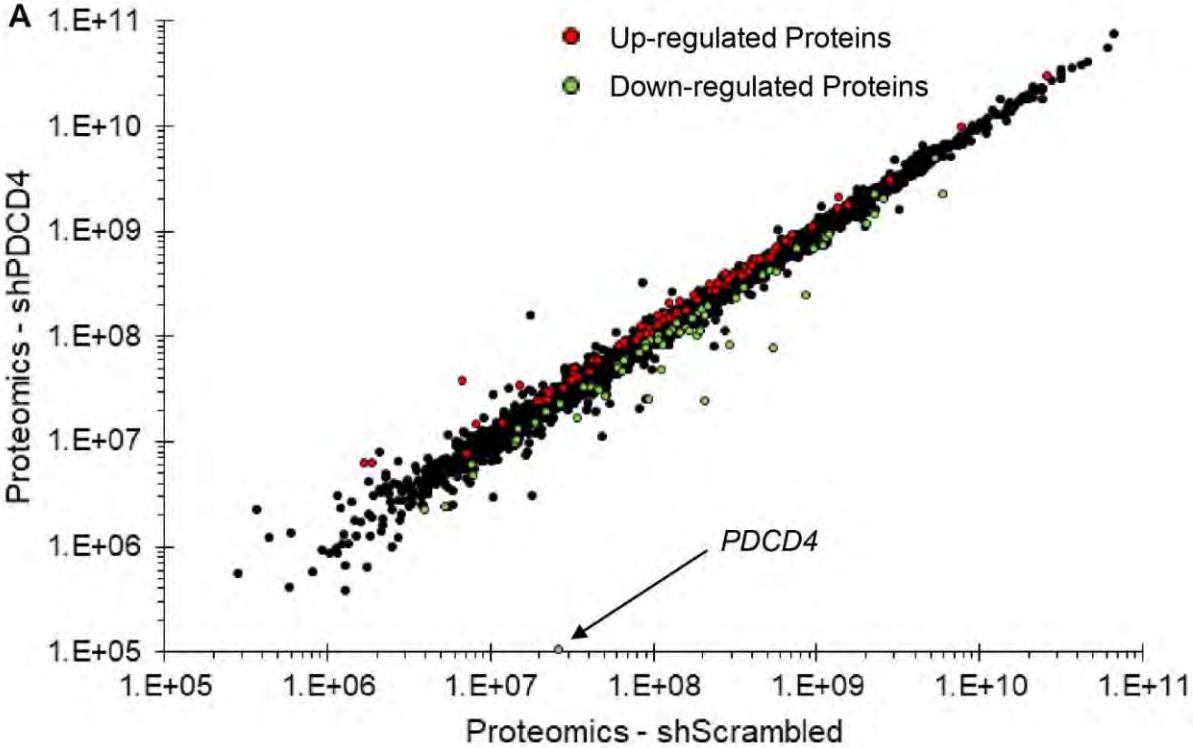
Supplemental Figure 3.



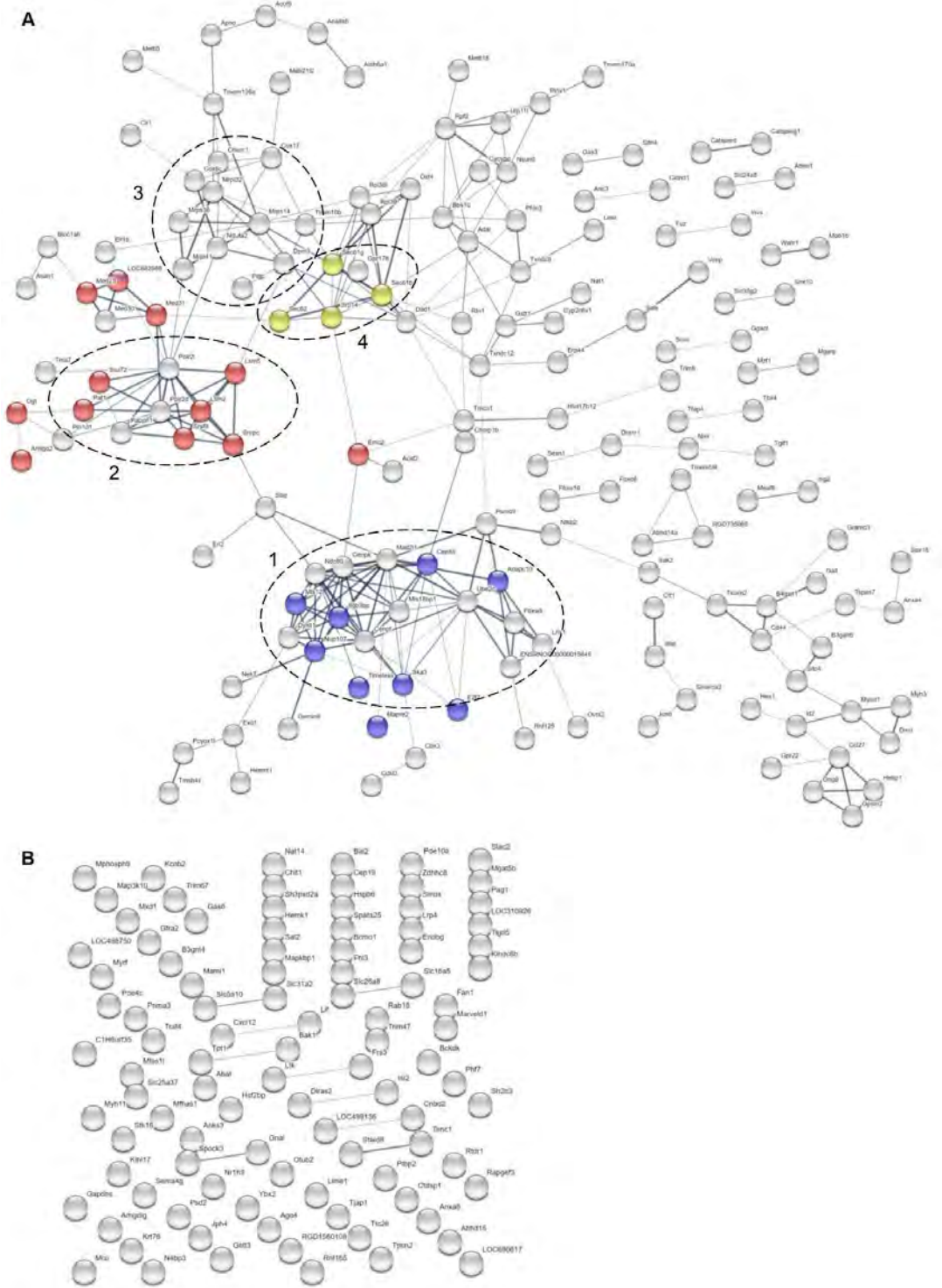
Supplemental Figure 4.



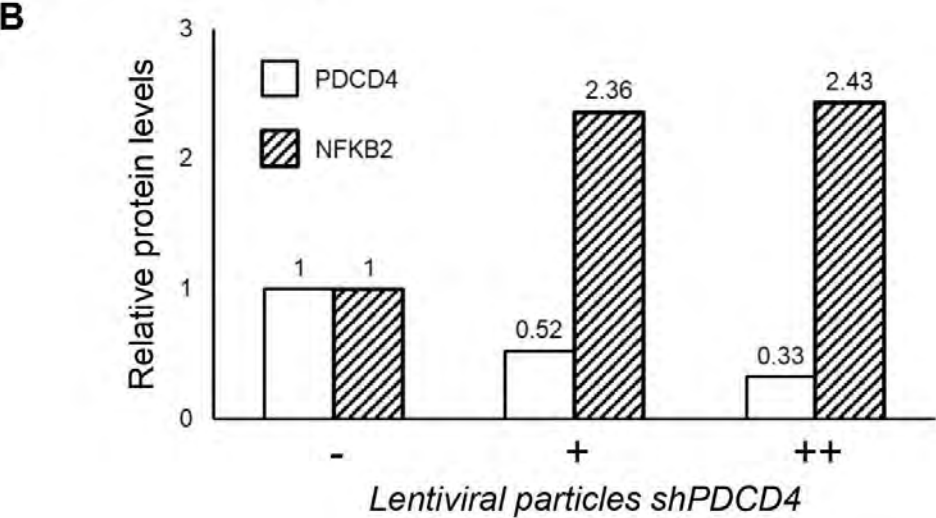
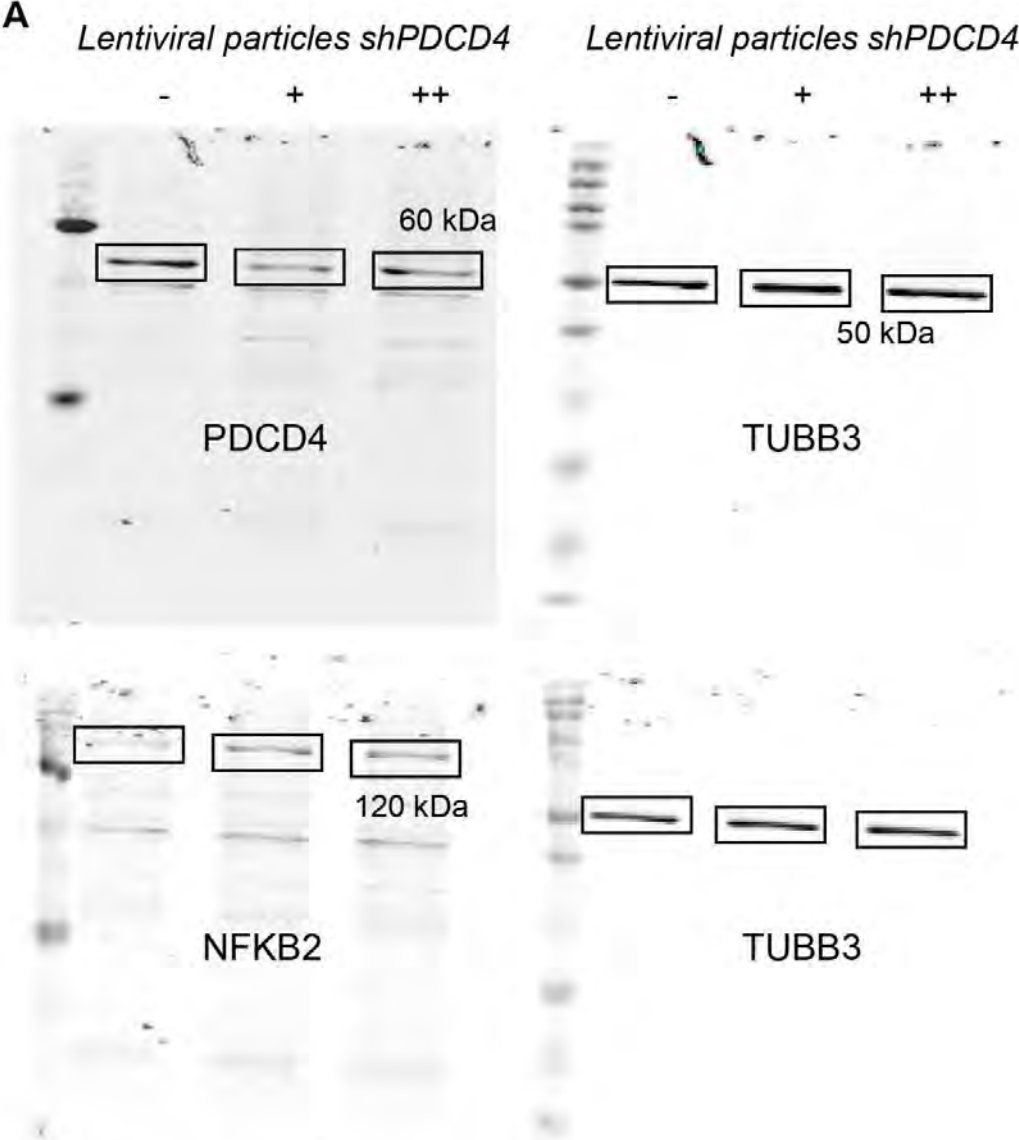
Supplemental Figure 5.



**Supplemental Figure 6.**

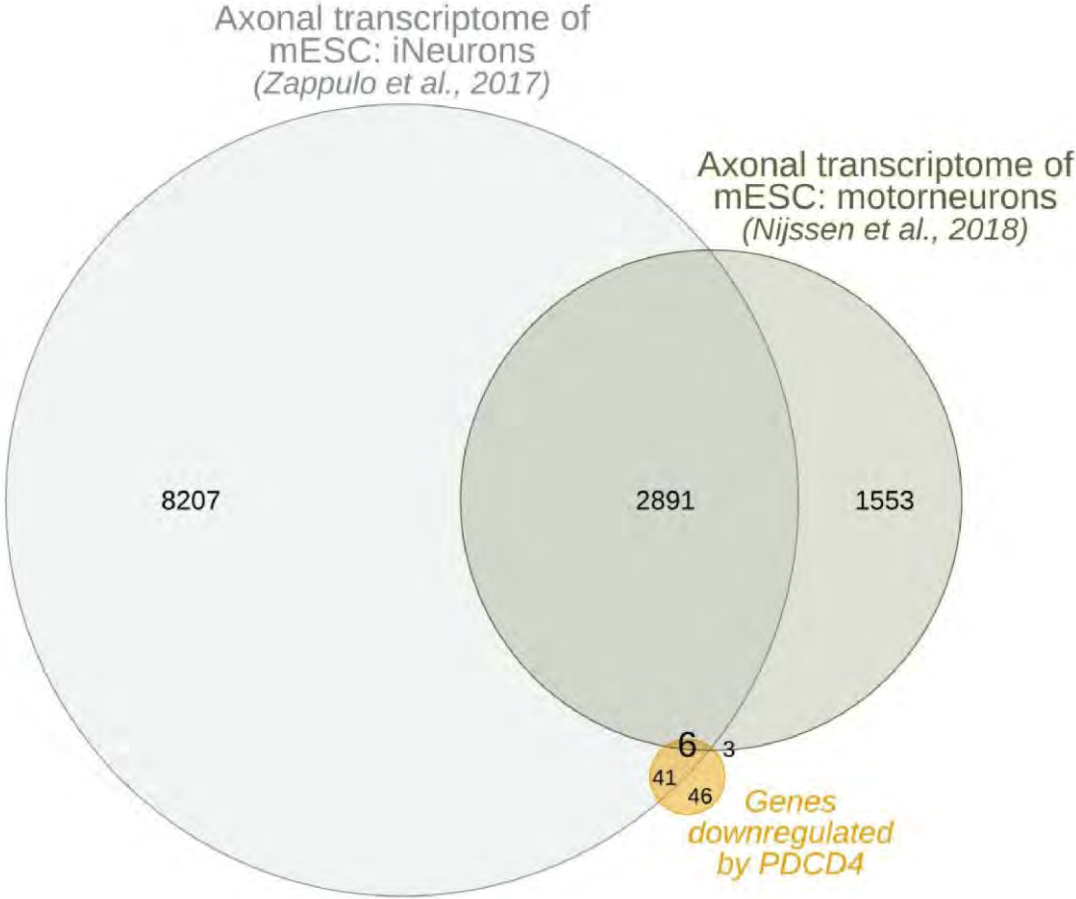


Supplemental Figure 7.



Supplemental Figure 8.

**A**



**B**

Neuron	Total genes	In common with genes downregulated by PDCD4	Reference
		All (EASE Score)	
mESC:iNerons	11145	47 (0.2263)	Zappulo et al., 2017
mESC:motorneuron	4453	9 (0.1118)	Nijssen et al., 2018

## Supplementary Figure Legends.

Figure S1. (A) Fluorescent image of cortical neurons overexpressing PDCD4: GFP and PDCD4 expression is shown in cortical neurons transfected with a PDCD4 cDNA plasmid or with a pcDNA control plasmid. In both cases, a GFP co-transfected plasmid was used as a positive evidence of transfection. White arrows indicate the transfected neurons (scale bar 20  $\mu$ m). The right panel shows quantification of PDCD4 levels, detecting an increase of 2.3 fold compared to the control condition (p value (\*\*\*)  $\leq 0.001$ , two tailed Mann Whitney test, n=3 with 3 technical replicates, error bars: SEM). (B) Same as (A) but for cortical neurons where PDCD4 was knockdown using a mix of 4 siRNA sequences against PDCD4 (Dharmacon siRNA SMARTPOOL) or a mix of 4 scrambled siRNA sequences as control. Again a GFP co-transfected plasmid was used, and the white arrows show the transfected neurons (scale bar 20  $\mu$ m). The right panel shows quantification of PDCD4 levels, detecting a decrease of 0.66 fold compared to the control (p value (\*\*\*)  $\leq 0.01$ , two tailed Mann Whitney test, n=3 with 3 technical replicates, error bars: SEM). (C) Fluorescent image of DRG neurons where PDCD4 was knockdown using 4 cell permeable siRNA sequences against PDCD4 (Dharmacon Accell siRNA SMARTPOOL) or a mix of 4 Accell scrambled siRNA sequences as control. Tubulin and PDCD4 expression is shown (scale bar 20  $\mu$ m). The right panel shows quantification of PDCD4 levels detecting a decrease of 0.65 fold compared to the control (p value (\*)  $\leq 0.02$ , two tailed Mann Whitney test, n=3 with 3 technical replicates, error bars: SEM). (D) To test if the siRNA probes or plasmids have an effect on total PDCD4 protein levels, we transfect N2A cell line, as a high transfection efficiency model. PDCD4 expression is shown by western blot as the upper bands, while lower bands correspond to actin as a loading control. The right panel shows relative quantification of PDCD4 Western Blots bands (p value (\*\*\*)  $\leq 0.001$  and p value (\*)  $\leq 0.02$ , two tailed Mann Whitney test, n=3 with 2 technical replicates, error bars: SEM).

Figure S2. PDCD4 expression silenced by inducible shRNA in the PC12 cell line. Inducible PDCD4 silencing in PC12 cells was achieved by lentiviral transfection and confirmed by semi-quantitative RealTime PCR and immunofluorescence. (A) PDCD4 expression was followed at different time points of NGF-induced neuron differentiation in wt PC12 cells using immunofluorescence. (B) Neuron-like phenotype achieved in PC12 cells after 72 h of NGF exposure, evidenced by phase contrast microscopy. (C) PDCD4 expression evaluated by immunofluorescence was analyzed in PC12-shScrambled and PC12-shPDCD4 cells after NGF exposure alone or with shRNA expression induction by doxycycline (DOX). Illustrative images are shown. (D) PDCD4 signal quantification shows a high decrease in PDCD4 only in PC12-shPDCD4 exposed to NGF+DOX (p value (\*\*\*)  $< 0.01$ , One-way ANOVA with post-hoc Tukey test; n=2 with almost 150 cells analyzed per replicate). (E) PDCD4 silencing was also confirmed by semi-quantitative RealTime PCR (p value (\*\*\*)  $< 0.001$ , Student's t test, n=3, error bars: SD). (F) GFP expression was also monitored by immunofluorescence as an indication of shRNA expression induction by DOX. Illustrative images are shown. (G) Quantification of GFP signal shows insignificant levels in absence of DOX while considering levels when is present. Differences were statistically significant (p value (\*\*\*)  $< 0.01$ , one-way ANOVA with post-hoc Tukey test, n=2 with almost 150 cells analyzed per replicate). In A-C and F scale bars means 20  $\mu$ m.

Figure S3. RNA-Seq and Ribo-Seq data were analyzed individually by edgeR. (A) Ribosomal footprints periodicity was explored comparing 5'-end read mapping distribution among the three codon nucleotides. Each dot represents a fraction of reads in each position for each sample (transcriptome RNA-Seq derived and translome Ribo-Seq derived). For translome samples the first position in the codon tends to be enriched but for transcriptome samples distribution tends to be uniform. (B) Mapping distribution among mRNA features

was studied comparing 5'UTR, CDS and 3'-UTR expression and comparing between transcriptomes and translomes. In the first, the three regions are expressed while for translome samples CDS is preferentially expressed over UTRs regions. (C) Inter-replicate Pearson correlation value is shown for transcriptome and translome samples, in the two conditions (shScrambled and shPDCD4). (D) and (E) Volcano and MA plot, respectively, for transcriptome compartment (RNA-Seq). (F) and (G), same as (D) and (E) but for translome compartment (Ribo-Seq). In D-G red and green dots indicate differentially expressed genes, up- and down-regulated, respectively ( $|\text{fold change}| > 2$  and  $p \text{ value} < 0.05$ ).

Figure S4. Heatmap of potential PDCD4 targets. RNA-Seq and Ribo-Seq expression levels in PDCD4 presence and absence (shScrambled and shPDCD4, respectively) is shown for the 267 putative PDCD4 mRNA targets.

Figure S5. Quantification and comparison of protein abundance in PDCD4 presence and absence (shScrambled and shPDCD4, respectively) by *Label-Free Quantitative Proteomics*. (A) Scatter plot comparing protein abundance ( $LFQ/IBAQ$  values) in shScrambled and shPDCD4 conditions. Red and green dots indicate differentially expressed proteins, up- and down-regulated respectively ( $p \text{ value} < 0.05$  estimated by ANOVA). PDCD4 is indicated in the scatter where the knock-down could be also evidenced. (B) Correlation between fold change values estimated by proteomics and Ribo-Seq for 87 differentially expressed proteins at the proteome that also show the same direction of change in the Ribo-Seq data.

Figure S6. Functional protein association network by STRING for PDCD4 putative translational targets defined by translational efficiency criteria (A) and for the opposite direction genes (B). In (A) the 4 functional-related clusters discussed in the text are indicated: Cluster 1 in blue, highlighting genes associated to mitosis and cell cycle; Cluster 2 in red, highlighting genes associated to the nucleus; Cluster 3 correspond to mitochondrial activity and Cluster 4 in yellow, highlighting genes associated to protein export. Disconnected nodes are hidden in (A) but shown in (B) for illustrative reasons.

Figure S7. Lentiviral shPDCD4 on cortical neurons cultured *in vitro* upregulates total levels of NFKB2 measured by Western Blot. (A) Cortical neurons were transfected with increasing amounts of lentiviral particles (+ and ++) containing shPDCD4 sequences, or with vehicle (no lentiviral particles). Western blot bands for PDCD4, NFKB2 and TUBB3 as non-target control are shown in each case. (B) Relative quantitation of PDCD4 and NFKB2 levels in each condition is shown. While levels of PDCD4 descend down to three-fold with increasing lentiviral particles, NFKB2 levels increase more than two fold.

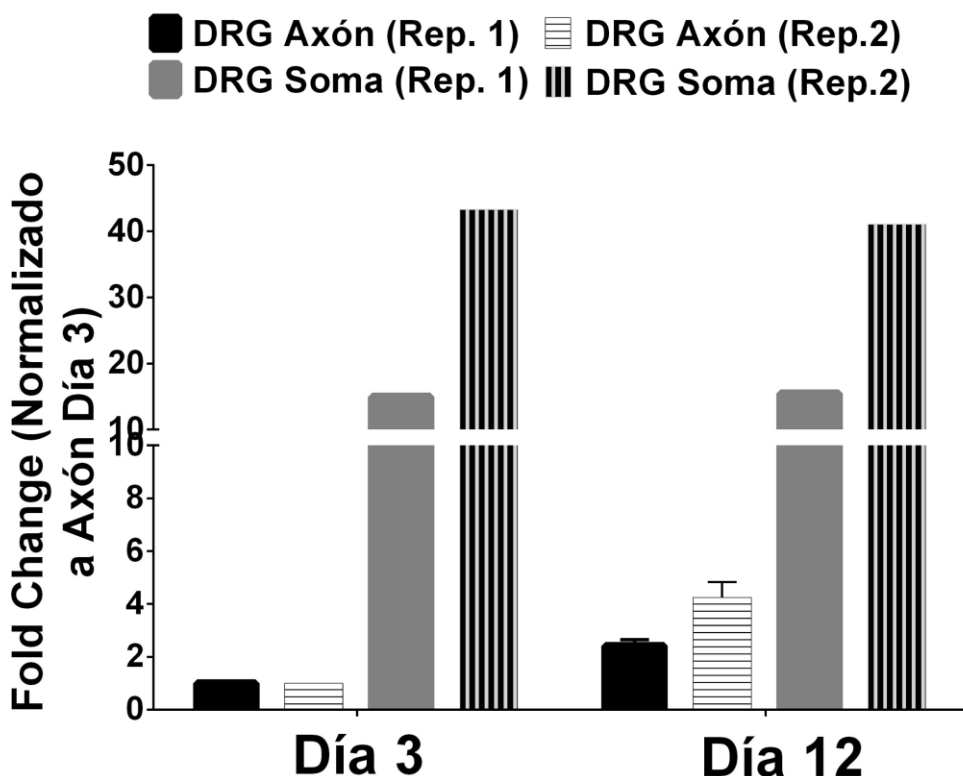
Figure S8. Comparison of down-regulated mRNAs targets after PDCD4 knockdown with previously reported axonal transcriptomes. (A) Venn diagram showing the intersection between TE down-regulated mRNAs by PDCD4 and axonal transcriptomes described in Figure 4B. Separate and overlapping expressions between samples are shown. Only transcripts with a level of expression of  $TPM \geq 1$  were considered. (B) The table shows the type of neuron used in each study, the total genes detected and the number of common genes between potential PDCD4 targets (or potential PDCD4 targets related to axonal growth) and each axonal transcriptome. The EASE Score (a modified Fisher Exact  $p\text{-value}$ ) is also shown, which indicates gene-enrichment.



## 6.2.3) Resultados Capítulo II.

### 6.2.3.1. La proteína Pcd4 se expresa en diferentes tejidos del sistema nervioso central y periférico de rata y ratón tanto en individuos adultos como en etapas del desarrollo embrionario.

Evidenciamos mediante microscopía confocal la distribución de la proteína Pcd4 en dendritas de neuronas de Purkinje, axones de neuronas de hipocampo, del nervio ciático y de raíces ventrales de ratas adultas (Figura 1 del artículo, página 79). También detectamos su expresión en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (*DRGs*, por sus siglas en inglés) de ratas en estadio embrionario “E18” así como en neuronas corticales de ratón en estadio embrionario “E16” (Figura 2 del artículo, página 80). También detectamos el ARNm de PDCD4 mediante qPCR en axones de neuronas *DRG* de ratas en estadio embrionario “E18” con 5 días de cultivo en cámaras compartimentalizadas de 2 canales (los valores promedio de Ct en axón fueron 25.5 en el día 3 y 23.6 en el Día 12 de cultivo). Este resultado sólo fue mencionado en la publicación, por lo cual lo detallamos a continuación en la Figura 24.



**Figura 24. qPCR de PDCD4 en neuronas DRG.** Rep.1 y Rep. 2 hacen referencia a 2 réplicas técnicas realizadas en forma independiente partiendo del mismo pool de ARN. Los datos se encuentran normalizados a los CT obtenidos para el Axón en el día 3.

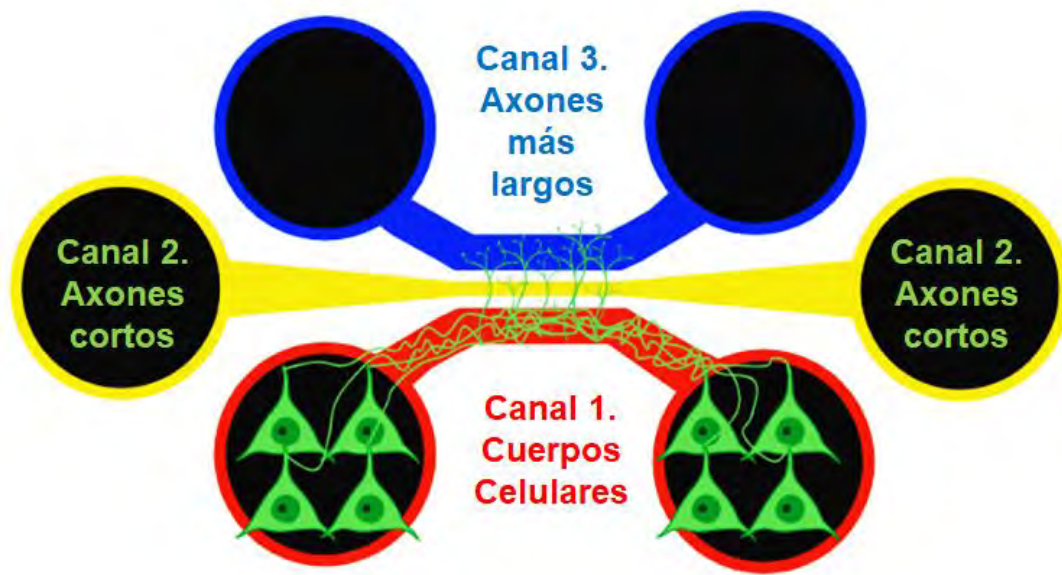
### **6.2.3.2. La proteína Pdc4 aumenta sus niveles de expresión cuanto mayores son los tiempos de cultivo *in vitro* en neuronas corticales “E16” de ratón.**

Analizando los niveles de Pdc4 a los 2, 5 y 12 días de cultivo, detectamos un aumento significativo en los niveles de PDCD4, tanto en los somas como en los axones (Figura 2A de la publicación, página 80). Está reportado que a los 12 días de cultivo las neuronas corticales son capaces de generar sinapsis definitivas entre ellas y la formación de proteínas de novo disminuye (Cotterill *et al.*, 2016; Banker, 2018). Nuestros resultados sugieren un posible rol represor de PDCD4 sobre ARNm importantes para el crecimiento axonal y apoya la hipótesis de que un aumento en los niveles de Pdc4 puede producir una inhibición del crecimiento neurítico. Por ello el siguiente paso fue evaluar si PDCD4 es capaz de regular el crecimiento axonal *in vitro*.

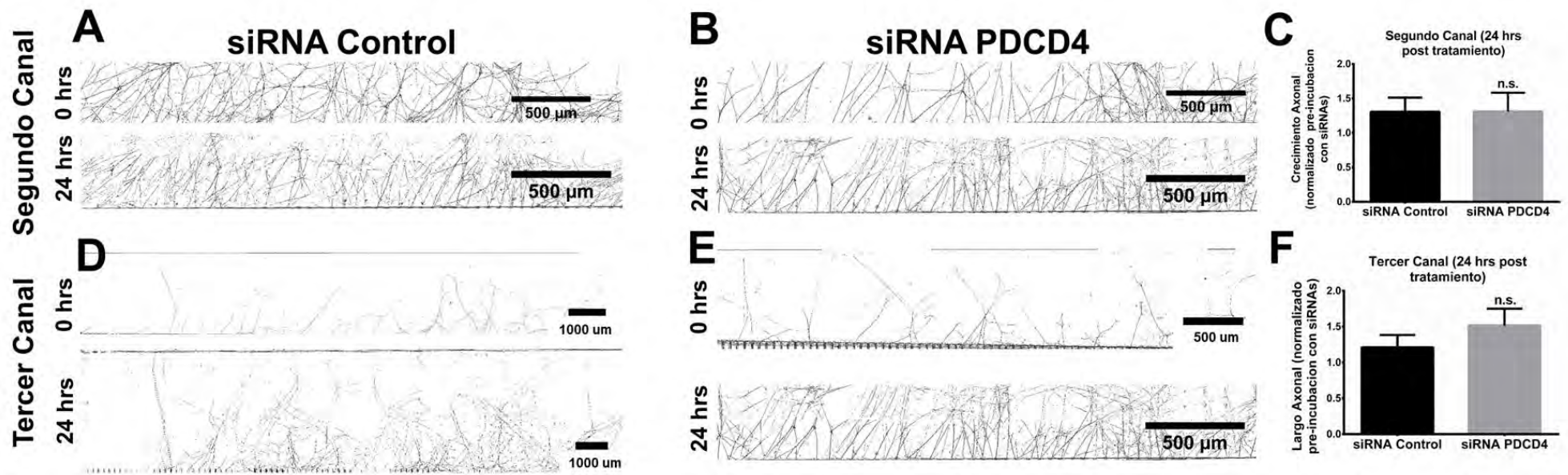
### **6.2.3.3. La modulación específica de los niveles de expresión de PDCD4 en cultivos primarios de neuronas centrales y periféricas tiene un efecto represor sobre el crecimiento axonal *in vitro*.**

Para testear la hipótesis de si PDCD4 presenta un rol regulador del crecimiento axonal, analizamos qué efecto tiene la modulación específica de los niveles de PDCD4 (a nivel del ARNm y de la proteína) en etapas activas del crecimiento neuronal. Realizamos entonces experimentos de transfección para sobreexpresar (mediante un plásmido portador del cDNA de PDCD4) o silenciar (mediante siRNAs específicos para el mensajero de PDCD4) esta proteína a las 24 horas de iniciado el cultivo, analizando el efecto sobre el crecimiento axonal 72 horas después. Pasado este tiempo se dieron los cambios esperados en los niveles de la proteína Pdc4, lo cual evidencia que los tratamientos son efectivos (Figura Suplementaria 1A, 1B del manuscrito, página 95). A nivel del crecimiento neurítico, un aumento en los niveles de PDCD4 induce una reducción del largo axonal, mientras que una disminución en los niveles de esta proteína produce un aumento de dicho crecimiento, como se muestra en la Figura 2B y 2C del artículo (página 80). Estos análisis fueron realizados en cultivos primarios de neuronas centrales, por lo cual nos preguntamos si este efecto puede observarse también en axones del SNP, en donde los procesos de regeneración axonal juegan un papel muy importante (He and Jin, 2016). Con este objetivo, silenciamos los niveles de PDCD4 en

cultivos primarios de neuronas *DRGs* de rata en el estadio embrionario E18. Dado que estas células presentan una alta tasa de crecimiento axonal y es muy complejo rastrear cada axón individualmente, para cuantificar este fenómeno decidimos utilizar cámaras compartimentalizadas de 2 canales. Mediante este sistema es posible aislar los somas en un compartimento y los axones en otro e incluso es posible realizar tratamientos individuales en cada compartimento y analizar sus efectos en forma local (Taylor and Jeon, 2011; Dajas-Bailador *et al.*, 2012). En una primera aproximación, utilizamos siRNAs permeables en el compartimento de los somas (sin restricciones de flujo para que dicha droga alcance el compartimento axonal) y cuantificamos el crecimiento axonal a las 72 horas, comparando los resultados con un siRNA control permeable sin reconocimiento de secuencias en el genoma. Similar a lo sucedido en neuronas corticales tratadas con un siRNA mediante una transfección convencional, observamos una disminución significativa en los niveles de PDCD4 (Figura Suplementaria 1C del artículo, página 95) así como un aumento del crecimiento axonal tras silenciar PDCD4 (Figura 2D del artículo, página 80), siempre respecto a la condición control. Estos resultados revelan que esta proteína es capaz de regular el crecimiento axonal en neuronas no solo del SNC, sino también del SNP. También nos interesaba conocer si es posible alcanzar un efecto represor del crecimiento axonal localmente, únicamente modulando la expresión de PDCD4 a nivel axonal, sin silenciar ni el ARNm ni la proteína a nivel del cuerpo celular. Para ello, empleamos cámaras compartimentalizadas de 3 canales como los que se muestran en la Figura 25. En estos sistemas es posible observar el crecimiento axonal en su extensión “máxima” ya que los cuerpos celulares pueden ser cultivados en el primer canal y los axones alcanzar los canales 2 y 3 con tiempos suficientes de cultivo. En este caso, incubamos el siRNA únicamente en los 2 compartimentos axonales una vez que los axones alcanzaron el tercer canal y cuantificamos el efecto 24 horas después. Si bien no se obtuvieron diferencias significativas, si detectamos una tendencia (p valor 0.16) al aumento del largo axonal al analizar los axones que alcanzaron el tercer canal, no así para el crecimiento axonal general (Figura 26). Esto nos sugiere que al menos parte del efecto que PDCD4 tiene sobre el crecimiento axonal podría ser local en el axón, pero no únicamente en el mismo.



**Figura 25. Esquema de Cámara Compartimentalizada de 3 canales.** Se detalla la configuración utilizada en nuestros experimentos, donde se incubaron los cuerpos celulares de neuronas *DRG* en el canal 1 (rojos) y se hicieron crecer los axones hacia los canales 2 (amarillos) y 3 (azúles).



**Figura 26. Tratamiento con siRNA para PDCD4 específicamente en los axones.** Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de campo claro. **(A)** Ejemplo de crecimiento axonal en el segundo canal a tiempo 0 y a las 24 horas post incubación con el siRNA Control. **(B)** Lo mismo que (A) pero incubando con el siRNA para PDCD4. **(C)** Cuantificación del crecimiento axonal en el segundo canal para las condiciones control y experimental. **(D)** Ejemplo del crecimiento axonal en el tercer canal a tiempo 0 y a las 24 horas post incubación con el siRNA Control. **(E)** Lo mismo que (D) pero incubando con el siRNA para PDCD4. **(F)** Cuantificación del largo axonal alcanzado en el tercer canal para las condiciones control y experimental. Las gráficas han sido normalizadas contra el crecimiento (para el segundo canal) o el largo axonal (para el tercer canal) alcanzado al momento previo de tratar la muestra con el siRNA Control o el siRNA para PDCD4, según el caso. (Test estadístico: Paired t test p valor < 0.49 para “Segundo Canal” y Unpaired t test p valor < 0.16 para “Tercer Canal”).

#### **6.2.3.4. Pdc4 disminuye sus niveles de expresión en axones de nervio ciático regenerantes.**

Tras comprobar que esta proteína es capaz de regular el crecimiento axonal *in vitro*, nos interesaba analizar si sus niveles cambian en procesos donde interviene la síntesis local de proteínas como lo es la respuesta axonal a un evento de injuria. Durante la regeneración axonal periférica se ha demostrado el aumento general de la síntesis de proteínas, así como también una activación de la vía mTORC1 (Verma *et al.*, 2005), lo que supondría una disminución en los niveles de PDCD4. Acorde a esta hipótesis, detectamos que la señal fluorescente de Pdc4 disminuye localmente en los sitios próximos a la injuria, no así en las regiones proximales de las mismas fibras (respecto a los cuerpos celulares). Además, estos cambios no se observan en nervios que no hayan sido lesionados ni tampoco en otras proteínas presentes en el tejido (Figura 5B del artículo, página 84). Por último y de acuerdo a nuestra hipótesis de trabajo, la forma fosforilada de la proteína p70S6K en la treonina 389 aumenta sus niveles tras la injuria (Figura 5C del artículo, página 84), lo que sugiere una activación de la vía mTORC1 como ya se ha visto en trabajos anteriores de axón en proceso de regeneración (Verma *et al.*, 2005; Terenzio *et al.*, 2018). Además, p70S6K es el regulador directo de la fosforilación de Pdc4 y está reportada que la fosforilación de esta proteína desencadena su ubiquitinación y degradación por el proteosoma (Dorrello *et al.*, 2006). Ello explicaría el porqué disminuye localmente los niveles de Pdc4 tras la injuria. Bajo nuestro modelo, al “quitar” Pdc4 del sitio de lesión tras la activación de la vía mTORC1, se liberaría la síntesis proteica local de ARNm importantes para la regeneración y crecimiento de los axones lesionados.

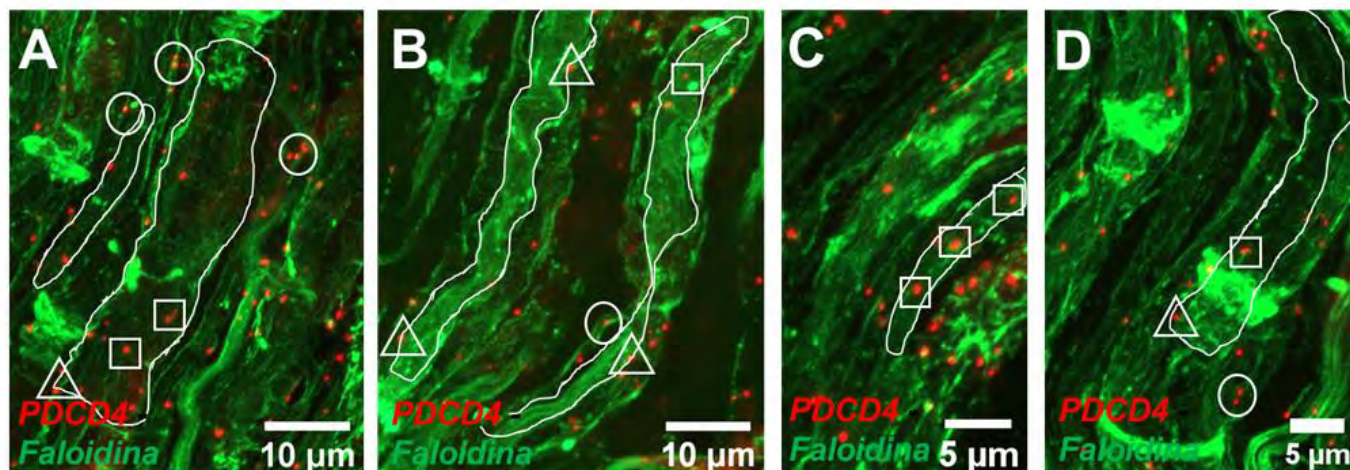
#### **6.2.3.5. Pdc4 es neo-sintetizado localmente en axones de raíces ventrales y nervio ciático *in vivo* y aumenta el número de centros traduccionales tras un evento de injuria.**

Mediante el protocolo de “Puromycin Proximity Ligation Assay” o PURO-PLA es posible identificar los sitios donde una proteína de interés es neo-sintetizada. El sistema consiste en un ensayo de ligación por proximidad entre 2 pares de anticuerpos (Tom Dieck *et al.*, 2015). Uno de los anticuerpos primarios reconoce un epítipo de la proteína de interés, en este caso Pdc4. El segundo anticuerpo primario reconoce un compuesto llamado puromicina el cual es

incorporado en las proteínas nacientes y detiene su traducción, liberando el extremo C-terminal del péptido que se estaba sintetizando (Aviner, 2020). Estos anticuerpos primarios son luego reconocidos por otro par de anticuerpos secundarios que están conjugados a oligonucleótidos. Si los anticuerpos secundarios (y por tanto los primarios) están lo suficientemente cerca (menor a 40 nm) es posible realizar una reacción de ligación entre ambos oligos seguida de una reacción de amplificación circular *in situ*. Parte de la secuencia del producto amplificado es reconocida por sondas fluorescentes. El conjunto de éstos puede visualizarse como spots fluorescentes mediante microscopía confocal y se corresponden con los centros traduccionales donde la proteína analizada está siendo neo-sintetizada. Nosotros adaptamos el protocolo de PURO-PLA para raíces ventrales *ex vivo* y con tiempos cortos de incubación (menores a 30 minutos) en presencia de puromicina, logramos identificar centros activos de traducción para PDCD4 en el dominio axonal (Figura 4D del artículo, página 84).

Adicionalmente, al emplear el protocolo de Puro-PLA en el nervio ciático *ex vivo* tanto en estado basal como a las 18 horas post injuria, observamos por microscopía confocal spots de fluorescencia que indican centros traduccionales donde PDCD4 está siendo neo sintetizado. Estos eventos de síntesis proteica local, al igual que para las raíces ventrales, son independientes de los cuerpos celulares ya que la puromicina es incorporada *ex vivo* en ciáticos separados de los ganglios y en un pulso de solamente 30 minutos. La Figura 27 ejemplifica algunos de los sitios dentro del dominio axonal donde evidenciamos la señal de fluorescencia esperada (cuadrados) y también en el citoplasma externo (círculos) e interno (triángulos) de las células de Schwann. En el caso de los nervios en estado de regeneración, también se detectaron spots de fluorescencia tanto en la célula de Schwann como en el dominio axonal. La señal detectada es específica ya que los controles sin anticuerpo primario disminuyen dramáticamente la señal de PLA y además la incorporación de puromicina en el

tejido es inhibible por anisomicina, una droga que reprime la traducción celular (Figura 19 de la Tesis en Capítulo I, página 65).



**Figura 27. (A-D) Spots de PLA para PDCD4 en el dominio axonal (cuadrados) y en el citoplasma interno (triángulos) y externo (círculos) de la célula de Schwann. Los límites del axoplasma están indicados con siluetas en blanco.**

Nos interesaba además conocer si existen diferencias en el número de centros traduccionales entre ambas condiciones. Dado el gran número de spots de PLA en todas las imágenes obtenidas y la variabilidad a lo largo de las fibras, decidimos aplicar 2 protocolos de cuantificación semi-automáticos diseñados en *FIJI* y descritos en la sección 5.4.1.2. de materiales y métodos en las páginas 40-46). El primer sistema de cuantificación (al que llamamos “A”) fue elaborado por nuestro grupo y el segundo (al que llamamos “B”) por el grupo de Schuman y colaboradores, expertos en el tema de cuantificación de PLA en neuronas en cultivo. En el primero se busca cuantificar el total de spots por área total y en el segundo el área cubierta por señal de PLA respecto al área total. Por tanto, con el segundo protocolo podemos considerar no solo los spots de PLA sino también la acumulación de los mismos que se corresponden con sitios con altos niveles de traducción.

Dadas la gran cantidad de spots de PLA y el largo del nervio ciático decidimos tomar imágenes a bajo aumento (20x) en mosaico cubriendo gran parte del área total del tejido (detallado en la sección 5.4.1. de Materiales y Métodos en la página 39). Tanto bajo el protocolo de cuantificación “A” (Figura 28) como en el “B” (Figura 29) evidenciamos un aumento significativo (de aproximadamente 2 veces) en el número de centros traduccionales por unidad



de área de PDCD4 en el nervio lesionado. Este efecto se observa al analizar el tejido entero (citoplasma de la célula de Schwann y axón) y también cuando solamente se toma en consideración el dominio axonal. Es de destacar que para el caso de PDCD4 solamente se evidenciaron spots de PLA y no grandes conglomerados de los mismos como si se encuentran para el NefL en el Capítulo I (ver Figura 20, página 66).

## Estrategia “A” de Cuantificación (Pdc4)

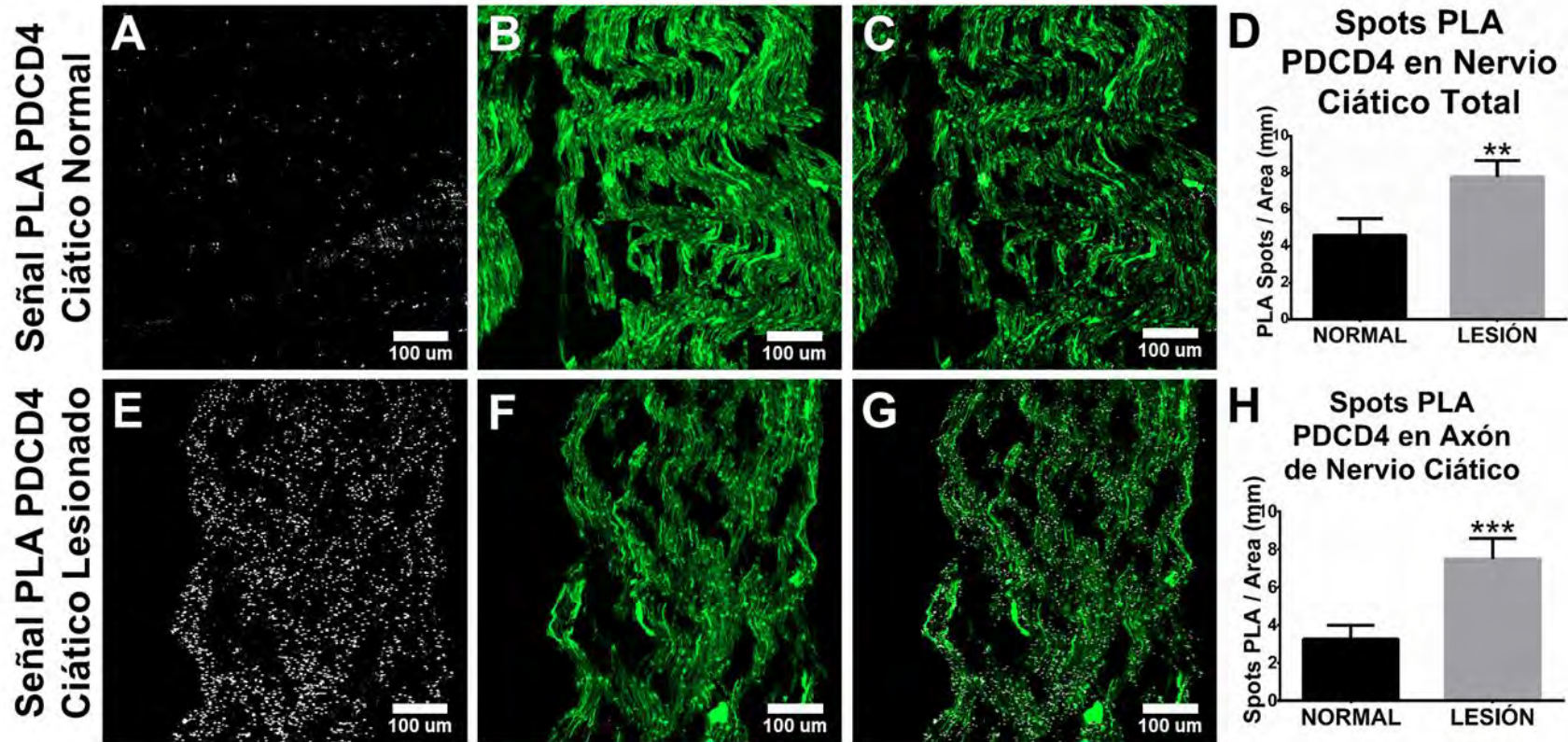


Figura 28. Cuantificación de los spots de fluorescencia para Pdc4 en nervio ciático en estado basal y de lesión mediante la estrategia “A”. (A) Señal de PLA para Pdc4 en el nervio ciático en estado basal (B) Lo mismo que en (A) pero para la contraindicación con faloidina. (C) Merge entre la señal del PLA y la faloidina en el nervio ciático en estado basal. (D) Cuantificación de los spots de PLA en las fibras del nervio ciático en estado basal y lesionado. (E) Señal de PLA para Pdc4 en una sección del nervio ciático lesionado. (F) Lo mismo que en (E) pero para la contraindicación con faloidina. (G) Merge entre la señal del PLA y la faloidina en el nervio ciático lesionado. (H) Cuantificación de los spots de PLA en axones del nervio ciático en estado basal y lesionado por el método “A” de cuantificación. (Unpaired t test, p valores: \*\*  $\leq 0.018$  y \*\*\*  $\leq 0.003$ ).

### Estrategia "B" de Cuantificación (Pdc4)

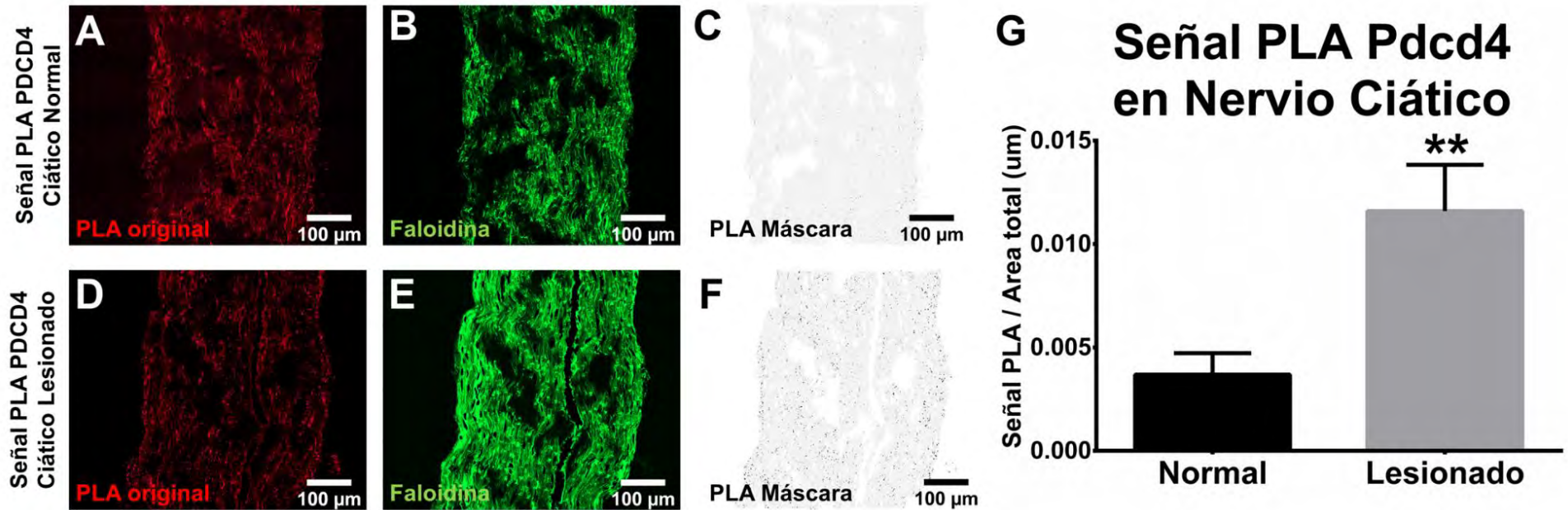


Figura 29. Cuantificación de los spots de fluorescencia para Pdc4 en nervio ciático en estado basal y de lesión mediante la estrategia "B". (A) Señal original de PLA en una sección del nervio ciático en estado basal. (B) Lo mismo que en (A) pero para la contratinción con faloidina. (C) Máscara aplicada sobre el canal de PLA mostrando los spots seleccionados por el método de cuantificación "B" en el ciático normal. (D) Señal original de PLA en una sección del nervio ciático lesionado. (E) Lo mismo que en (D) pero para la contratinción con faloidina. (F) Máscara aplicada sobre el canal de PLA mostrando los spots seleccionados por el método de cuantificación "B" en el ciático lesionado. (G) Cuantificación de los spots de PLA en el nervio ciático en estado basal y lesionado por el método "B" de cuantificación. (Test estadístico: Mann-Whitney p valor  $** < 0.01$ ).

## 6.2.4) Discusión Capítulo II.

A partir de los resultados obtenidos demostramos que la proteína Pdc4 está presente en axones, dendritas y cuerpo celulares de neuronas tanto del SNC como del SNP de rata y ratón en etapas del desarrollo embrionario y en animales adultos. Además, detectamos el ARNm de PDCD4 en el cuerpo celular y axón de neuronas *DRG* de ratas en estadio embrionario E18, el cual fue detectado previamente en axones de nervios periféricos en ratas adultas (Farias *et al.*, 2020) y en neuritas de *iNeurons* (Zappulo *et al.*, 2017) mediante ensayos de transcriptómica. Los niveles de esta proteína son elevados en axones de animales adultos (Figura 1 del artículo, página 79) y también detectamos que aumenta con los días en cultivo en neuronas corticales (Figura 2, artículo, página 80) lo cual es coincidente con la necesidad de disminución en las tasas de crecimiento de los axones y el establecimiento de conexiones sinápticas definitivas a partir de los 12 días de cultivo. Esto sugiere que Pdc4 podría estar regulando el crecimiento axonal, modulando negativamente la tasa traduccional de mensajeros específicos relacionados con el crecimiento neurítico los cuales disminuirían su expresión en dichas etapas. Mediante experimentos de sobreexpresión y silenciamiento de PDCD4 a nivel del ARNm y proteína, demostramos su efecto represor del crecimiento axonal *in vitro* en modelos de neuronas del SNC (neuronas corticales) y del SNP (neuronas *DRGs*) (Figura 2 del artículo, página 80). Estos análisis fueron realizados modificando los niveles de PDCD4 a nivel neuronal, por lo cual nos interesó evaluar si existiría también un efecto local al silenciar PDCD4 solo en los axones. Si bien nuestros resultados no muestran diferencias significativas, si existe una tendencia al aumento del crecimiento axonal en el grupo donde PDCD4 ha sido silenciado respecto al control a nivel del largo axonal alcanzado (Figura 26, página 109). Por qué el efecto no es significativo puede deberse a que los niveles de PDCD4 en axones de cultivos primarios son bajos respecto a los estadios posteriores donde observamos altos niveles de señal, especialmente en axones de animales adultos. Esto puede observarse en los niveles de PDCD4 en los primeros 2 días de cultivo respecto a los 12 días de la Figura 2A del artículo (página 80) y también en los niveles detectados en axones de animales adultos como los de la Figura 1 de este artículo (página 79). Es posible que en axones de neuronas *DRG* de animales adultos, los efectos del silenciamiento local sobre el crecimiento axonal sean más notorios.

Los resultados anteriores demuestran que PDCD4 es un represor del crecimiento axonal, por lo cual es esperable que regule ARNm relacionados con estos procesos. En este contexto, los estudios de *Ribosome Profiling* en células PC12 diferenciadas a neuronas, en donde previamente se silenció PDCD4 mediante vectores virales, muestran una lista de 267 genes candidatos a ser regulados negativamente por PDCD4 a nivel traduccional (Tesis Doctorado de Guillermo Eastman., 2021). De esta lista, detectamos 36 genes relacionados con funciones ya reportadas en procesos relacionados con el crecimiento neurítico (Figura 4A del artículo, página 83) y se destacan NFkB2 y BDNF. Se ha reportado el rol de NFkB2 para regular la extensión de árboles dendríticos y el crecimiento neurítico (Gutierrez *et al.*, 2005), su papel en la neuritogénesis (Manecka *et al.*, 2013) y evidencias recientes muestran interacciones entre esta proteína y PDCD4 modulando la activación inflamatoria de la microglia e induciendo la apoptosis neuronal en SNC (Chen *et al.*, 2021). Nosotros hemos demostrado en neuronas corticales que el silenciamiento de PDCD4 produce una disminución en los niveles de NFkB2 a nivel proteico (Figura Suplementaria 7 del artículo, página 101) verificando así el efecto represor de la traducción por parte de PDCD4. Respecto al BDNF, recientemente se ha reportado que PDCD4 reprime la traducción de este mensajero en neuronas de hipocampo (Li *et al.*, 2020), validando el potencial blanco de PDCD4 obtenido en nuestro estudio. Por último, el análisis fenotípico de estas células diferenciadas a neuronas muestra un aumento del crecimiento neurítico cuando PDCD4 es silenciado (Figura 3A y 3B del artículo, página 81). Todos estos datos nos estarían indicando que PDCD4 regularía el crecimiento axonal posiblemente reprimiendo la traducción de mensajeros involucrados en estos procesos e incluso localmente en el axón.

Si PDCD4 es capaz de modular el crecimiento axonal y presenta blancos relacionados al desarrollo neurítico en modelos *in vitro*, es posible que participe en eventos de plasticidad neuronal donde la regulación de la síntesis de proteínas sea importante, como lo es la regeneración axonal. Se conoce de la literatura que, tras un evento de lesión axonal periférica, existe un aumento de la síntesis de proteínas como respuesta a la injuria, lo cual forma parte del proceso de regeneración en axones periféricos (Zheng *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 2005; Willis *et al.*, 2005; Gumy *et al.*, 2010; Obara *et al.*, 2012; Twiss *et al.*, 2016; Terenzio *et al.*, 2018). Para estudiar si los niveles de Pdc4 se veían reducidos como respuesta a la injuria,

empleamos un modelo ya caracterizado de lesión y regeneración axonal *in vivo* en nervio ciático (Canclini *et al.*, 2014) utilizando como control el ciático contralateral sin lesión de los mismos animales (Figura 5B del artículo página 84). Nuestra hipótesis es que, si Pdc4 es capaz de regular la tasa traduccional de mensajeros importantes en procesos de crecimiento axonal, posiblemente disminuya sus niveles de expresión y con ello su efecto como represor traduccional durante un evento de regeneración axonal. De acuerdo con lo esperado, detectamos una disminución en los niveles de Pdc4 en las regiones axonales cercanas a la lesión (distales, en relación con los cuerpos neuronales) respecto a las más alejadas o proximales a los cuerpos celulares. Estos cambios no se observan en los nervios sin lesión.

Estos resultados muestran que los niveles de Pdc4 podrían ser modulados localmente en los axones en, por ejemplo, procesos de regeneración axonal desencadenados tras una injuria. Un paso más sería conocer bajo qué mecanismos de regulación esta proteína podría ser reprimida localmente. Una posibilidad es a través de la activación de la vía mTORC1. Como mencionamos en las secciones 2.3 y 2.4 de la introducción general, ya se ha descrito el rol de mTORC1 en la regeneración y la SPL axonal a través de la fosforilación de la proteína p70S6K (ver Figura 2B de esta tesis página 26). Paralelamente, estudios en cáncer han mostrado que p70S6K en su forma activa fosforila a PDCD4, lo cual desencadena su ubiquitinación y posterior degradación por parte del proteosoma (Dorrello *et al.*, 2006). Cuando analizamos los niveles de la proteína p70S6K fosforilada en axones sometidos a injuria respecto al estado basal, detectamos un aumento significativo en los niveles de esta proteína (Figura 5C del artículo, página 84). Esta activación de la vía mTORC1 podría explicar los cambios en los niveles de expresión de PDCD4 en axones lesionados.

La depleción de los niveles de Pdc4 a nivel local en axones lesionados puede ser uno de los mecanismos que aseguren una respuesta rápida del axón a la injuria, pero no necesariamente el único. La síntesis local de proteínas dentro del dominio axonal puede ser un sistema importante para modular los niveles de expresión de blancos específicos en diferentes escenarios del metabolismo axonal. En este contexto demostramos que Pdc4 puede ser neo sintetizado en axones de raíces ventrales (Figura 5D del artículo, página 84) y en nervio ciático *in vivo*, tanto en condiciones basales como de injuria. El aumento en el número de centros traduccionales durante los procesos de regeneración axonal podría en

principio contradecir la disminución de los niveles de dicha proteína en los sitios próximos a la injuria. Sin embargo, es posible que este proceso se corresponda con mecanismos que aseguren una reposición rápida de la proteína Pdc4 a nivel axonal para etapas posteriores del proceso de regeneración. Nosotros evidenciamos la activación de la vía mTORC1-p70S6K en los axones injuriados, la cual podría estar desencadenando la fosforilación, ubiquitinación y posterior degradación de Pdc4 por el complejo del proteosoma (Dorrello *et al.*, 2006). Realizar experimentos en tiempos mayores del proceso de regeneración y analizar específicamente los niveles de Pdc4 fosforilado en la Ser 67 (la que desencadena su degradación) podría agregar más información al respecto de cómo es finamente modulado los niveles de Pdc4 en las diferentes etapas de la regeneración axonal.

En suma, estos resultados sugieren la capacidad de la maquinaria axonal de regular los niveles de PDCD4 *in vivo* mediante la degradación a través de la activación de la vía mTORC1 y/o la síntesis local de dicha proteína dentro del compartimento axonal.

## **Conclusiones Capítulo II.**

Nuestros estudios demuestran por primera vez que PDCD4 tiene la capacidad de modular el crecimiento axonal, tanto durante etapas del desarrollo embrionario neuronal como en proceso de regeneración en axones maduros. También reportamos una lista de posibles blancos traduccionales de PDCD4 y 36 de estos genes están directamente relacionados con una firma neurítica. Por último, demostramos la modulación de esta proteína localmente en axones *in vivo* a través de su degradación y su síntesis proteica local, posiblemente modulados por la vía mTORC1-p70S6K. Estos hallazgos muestran nuevas evidencias respecto a la correlación entre las vías moleculares involucradas en cáncer y en el crecimiento axonal como ya ha sido indicado por otros autores (Chédotal *et al.*, 2005; Heine *et al.*, 2015).

## **6.3) Capítulo III. Las proteínas ribosomales se encuentran enriquecidas en el proteoma axonal de nervios periféricos *in vivo*.**

### **6.3.1) Introducción Capítulo III.**

Como se mencionó en la introducción general, la localización de los ARNm y proteínas en cada compartimento neuronal es esencial para mantener la morfología y polaridad característico de este tipo celular. En el caso de los axones en nervios periféricos, los mecanismos de regulación de localización de ARNm son importantes para la respuesta a estímulos, tanto en condiciones normales como de injuria, a través de diversas vías de señalización molecular (Mahar and Cavalli, 2018; Koley *et al.*, 2019). Si bien los sistemas de transporte axonales son una fuente muy importante de ARNm y proteínas provenientes desde el cuerpo celular, no serían suficientes para definir completamente la localización de proteínas en el axón (Alvarez and Torres, 1985; Perry and Fainzilber, 2014). En este contexto, se han descrito la transferencia de macromoléculas desde la glía al axón (Lasek *et al.*, 1977; Buchheit and Tytell, 1992; Sheller *et al.*, 1995; Court *et al.*, 2008; Lopez-Verrilli and Court, 2012; Sotelo *et al.*, 2013, 2014) y la síntesis proteica local (Sotelo-Silveira and Holt, 2014; Kim and Jung, 2015; Twiss *et al.*, 2016; Rangaraju *et al.*, 2017) como mecanismos adicionales para el mantenimiento de la homeostasis axonal, especialmente en estados de crecimiento activo o de regeneración. En estos escenarios se activan cascadas de señalización conformadas por cientos de proteínas junto con cambios en las tasas traduccionales de ARNm, eventos de fosforilación y proteólisis, todo ello en forma simultánea y altamente organizada (Hanz *et al.*, 2003; Hanz and Fainzilber, 2006; Ben-Yaakov and Fainzilber, 2009; Perry *et al.*, 2012; Terenzio *et al.*, 2018). Además, muchos de estos cambios son inicialmente independientes de cambios transcripcionales en el soma, demostrando la independencia del axón para la respuesta rápida en ciertos escenarios metabólicos. En este contexto, los estudios omicos surgen como herramientas moleculares poderosas para comprender globalmente el desarrollo de estos procesos y para identificar cuáles ARNs y proteínas están involucrados. La revisión del Anexo 1 resume en detalle los ensayos omicos efectuados en axones en la última década discutiendo los principales hallazgos aportados mediante transcriptómica, translatómica y proteómica axonal (ver Anexo 1, página 182).



A los crecientes avances tecnológicos en los sistemas de secuenciación masiva y de proteómica, en conjunto con el aumento exponencial en las capacidades de cómputo fundamentales para analizar los datos obtenidos, se ha sumado el desarrollo de eficientes protocolos de aislamiento de material axoplásmico, principalmente en modelos *in vitro*. Para más detalles de estos sistemas, consultar la revisión del Anexo 1 (páginas 183-186 y Figura 1 del artículo III). A la fecha, existen más de 20 publicaciones de transcriptomas axonales *in vitro* desarrollados en diferentes tipos neuronales y diversos escenarios metabólicos (Willis *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2009; Andreassi *et al.*, 2010; Zivraj *et al.*, 2010; Gumy *et al.*, 2011; Cajigas *et al.*, 2012b; Baleriola *et al.*, 2014; Minis *et al.*, 2014; Saal *et al.*, 2014; Sasaki *et al.*, 2014; Briese *et al.*, 2016; Taliaferro *et al.*, 2016; Bigler *et al.*, 2017; Rotem *et al.*, 2017; Zappulo *et al.*, 2017; Mathur *et al.*, 2018; Tóth *et al.*, 2018). A ellos se suma el reciente trabajo de nuestro grupo donde se ha reportado el transcriptoma axonal de raíces ventrales de ratas adultas *in vivo* (Farias *et al.*, 2020). Sin embargo, los estudios de proteómica en axón son escasos, siendo la mayoría en modelos *in vitro* (Zappulo *et al.*, 2017; Cagnetta *et al.*, 2018; Chuang *et al.*, 2018) y únicamente unos pocos trabajos han sido desarrollados en modelos *in vivo* (Perlson *et al.*, 2005; Michaelevski *et al.*, 2010b; Rishal *et al.*, 2010). Estos últimos han sido desarrollados a partir de protocolos de aislamiento axoplásmico reportados por Fainzilber y colaboradores (Perlson *et al.*, 2005). Este modelo se basa en el aislamiento de material *ex vivo* a partir de una extrusión de axoplasma por diferencias osmóticas con el medio. La variante inicial del protocolo fue utilizando buffers iso-osmóticos (Perlson *et al.*, 2005), pero luego los mismos autores lograron disminuir la presencia de proteínas contaminantes provenientes del suero utilizando un paso previo de incubación en un buffer salino hipotónico, lo cual aumenta los niveles de pureza de la muestra (Rishal *et al.*, 2010). Para más detalles del protocolo de aislamiento axoplásmico, consultar la sección 5.8 de materiales y métodos (página 48). Mediante este sistema y utilizando el protocolo de proteómica cuantitativa *iTRAQ*, el grupo de Fainzilber y colaboradores detectó 972 grupos de proteínas en el axoplasma de nervio ciático (Michaelevski *et al.*, 2010b) con una sobrerrepresentación de aquellas relacionadas con traducción y proteínas ribosomales, como ya ha sido reportado en otros estudios mediante ensayos bioquímicos y de biología molecular (Kun *et al.*, 2007; Court *et al.*, 2008; Biever *et al.*, 2020).

Hemos mencionado la importancia de la SPL axonal para la homeostasis neuronal. Por tanto, los ensayos omicos que permitan su identificación son valiosos y al mismo tiempo metodológicamente desafiantes dada la escasa cantidad de proteínas neo-sintetizadas axonales. Hay muy pocos trabajos que reporten por ensayos de proteómica proteínas neo-sintetizadas en axón y han sido únicamente desarrollados en modelos *in vitro* de ratón (Zappulo *et al.*, 2017) y de *Xenopus Laevis* (Cagnetta *et al.*, 2018). Considerando estos datos previos es que nos propusimos analizar el proteoma del axoplasma de nervio ciático de ratas adultas utilizando el protocolo de extruido hipotónico de Fainzilber y colaboradores, tanto en condiciones basales como de injuria (18 horas posteriores a una incisión completa de dicho nervio) empleando tecnología de proteómica cuantitativa de última generación en colaboración con el Laboratorio de Proteómica del Dr. Thomas Kislinger en Toronto, Canadá. Además, comparamos el proteoma axonal con el del nervio ciático entero en ambas condiciones. El protocolo de proteómica cuantitativa empleado es el sistema de “marcado libre” o *Label-Free Quantitative Proteomics (LFQ)*, para el cual existen estudios que reportan una mayor capacidad de detectar proteínas diferencialmente expresadas respecto al *iTRAQ* (previamente utilizado en un modelo similar por Fainzilber y colaboradores), especialmente para muestras con poca cantidad de proteína total (Latosinska *et al.*, 2015). Detectamos más de 2000 grupos de proteínas en axón, lo que es más del doble que lo previamente detectado por Fainzilber y colaboradores (Michaevlevski *et al.*, 2010b). Las categorías relacionadas con traducción y citoesqueleto están sobre-representadas en axón. En cuanto a las proteínas ribosomales, las mismas están elevadas en las etapas posteriores a la injuria únicamente en los axones regenerantes, siempre respecto a la condición basal. Por último, y dada la escasez de estudios proteómicos que analicen las proteínas neo-sintetizadas en axón, combinamos el sistema *LFQ* con protocolos de *BONCAT* en extruidos de axoplasmas, detectando 42 proteínas neo-sintetizadas y validando una de ellas (el NefL) por el sistema de Puro-PLA en nervio ciático *ex vivo* como ya describimos en el Capítulo I de esta tesis.

### **6.3.2) ARTÍCULO II. Rat sciatic nerve axoplasm proteome is enriched with ribosomal proteins during regeneration processes.**

*Contribuciones Específicas. En este artículo los experimentos descritos en cada una de las figuras derivan directamente de mi trabajo experimental. En lo que respecta a la preparación de muestras de axoplasmas y tejido entero de raíces ventrales y dorsales (Figura 2 del artículo) fue realizada junto a la PhD. Joaquina Farías y los protocolos de extracción de péptidos y corrida en el espectrómetro de masas junto a Andrew Macklin, el técnico del MS/MS del Princess Margaret Cancer Research Center en Toronto, Canadá. El diseño gráfico de las Figuras 1A-D, 4A-D, 5A-C, 6C, 6D y el análisis estadístico de los datos producidos tras los ensayos de proteómica fueron desarrollados con la colaboración de Vladimir Ignatchenko. El diseño de las Figuras 3E-H y 4E-H se realizaron en colaboración con el Lic. Joaquín Garat. Respecto a la escritura del manuscrito, se realizó por mi en colaboración con el PhD. José Sotelo Silveira y PhD. Thomas Kislinger.*

## Rat Sciatic Nerve Axoplasm Proteome Is Enriched with Ribosomal Proteins during Regeneration Processes

Andres Di Paolo, Joaquina Farias, Joaquin Garat, Andrew Macklin, Vladimir Ignatchenko, Thomas Kislinger,\* and José Sotelo Silveira\*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00980>

Read Online

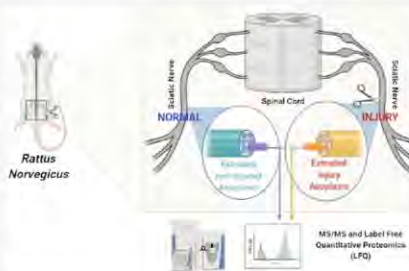
ACCESS |

Metrics &amp; More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Axons are complex subcellular compartments that are extremely long in relation to cell bodies, especially in peripheral nerves. Many processes are required and regulated during axon injury, including anterograde and retrograde transport, glia-to-axon macromolecular transfer, and local axonal protein synthesis. Many *in vitro* omics approaches have been used to gain insight into these processes, but few have been applied *in vivo*. Here we adapted the osmotic *ex vivo* axoplasm isolation method and analyzed the adult rat sciatic-nerve-extruded axoplasm by label-free quantitative proteomics before and after injury. 2087 proteins groups were detected in the axoplasm, revealing translation machinery and microtubule-associated proteins as the most overrepresented biological processes. Ribosomal proteins (73) were detected in the uninjured axoplasm and increased their levels after injury but not within whole sciatic nerves. Meta-analysis showed that detected ribosomal proteins were present in *in vitro* axonal proteomes. Because local protein synthesis is important for protein localization, we were interested in detecting the most abundant newly synthesized axonal proteins *in vivo*. With an MS/MS-BONCAT approach, we detected 42 newly synthesized protein groups. Overall, our work indicates that proteomics profiling is useful for local axonal interrogation and suggests that ribosomal proteins may play an important role, especially during injury.



**KEYWORDS:** axon, proteomics, ribosomal proteins, local protein synthesis, sciatic nerve regeneration

### INTRODUCTION

Protein localization in cellular compartments is an important strategy to maintain cell asymmetry, especially in polarized cells like neurons.<sup>1–4</sup> Several reports indicate that the localization of specific proteins in peripheral nerve axons is important for the neuronal signaling and stimuli response in both normal and regenerative stages.<sup>5–7</sup> With this in mind, a recent study performed *in vitro* indicated that the axonal protein distribution is partially dependent on the mRNA localization and reported that half of the axon-enriched proteome relative to cell bodies is encoded by axonal-localized mRNAs.<sup>8</sup> It is worth noting that axonal transport systems are important but not sufficient in fully defining the axonal protein localization.<sup>9,10</sup> The transfer of macromolecules from glia to axon<sup>11–17</sup> and the axonal local protein synthesis<sup>1,4,18,19</sup> are relevant mechanisms for axon maintenance, especially during injury responses. After nerve injury, a cascade of retrograde signals, protein phosphorylation, proteolysis, and local protein synthesis occurs,<sup>20–24</sup> which is initially independent of transcriptional changes in the cell bodies.<sup>25</sup> Omics studies are useful tools for understanding these processes and aim to identify which mRNAs and proteins are present during these events. Although several publications describe the tran-

scriptome of *in vitro* axons,<sup>7,8,26–41</sup> our group recently revealed the content of RNAs present in motor axons *in vivo* using axon microdissection in combination with RNA-Seq.<sup>42</sup> For proteomics studies, only a few reports have identified thousands of proteins obtained from axons grown *in vitro*.<sup>8,43,44</sup> Concerning the detection of axonal newly synthesized proteins by proteomic approaches, very few *in vitro* studies have been developed<sup>8,43,44</sup> due to the need for highly sensitive methods.<sup>45</sup> Regarding the difficulties of isolating the axoplasm directly from nerves, only a few reports have developed *in vivo* axonal transcriptomics<sup>42</sup> and axonal proteomics.<sup>25,46,47</sup> In a significant effort, a method compatible with proteomics was developed for *ex vivo* axon isolation based on osmotic axoplasm extrusion.<sup>19,45</sup> Using iTRAQ proteomics, the authors detected 972 proteins groups from osmotic-extruded axoplasms of *Rattus norvegicus* sciatic nerve

Received: December 4, 2020

ligatures,<sup>25</sup> revealing proteins involved in translation as described previously<sup>30–33</sup> and ribosomal proteins, as previous *in vitro* studies also reported.<sup>11,12,34,35</sup> In this work, we study the *Rattus norvegicus* whole sciatic nerve and the osmotic-extruded axoplasm proteomes under normal and early-time postinjury conditions by label-free quantitative (LFQ) proteomics. Previous work from our group showed that at 18 h post-complete-nerve-transection, changes to the proximal segment were induced, including RNA synthesis transport from glia to axons<sup>11,12,36</sup> and intraxonal mTOR-p70S6K-PDCD4 pathway activation;<sup>37</sup> therefore, a proteomic view of this point can reveal early local processes concerning nerve regeneration. Our results indicate that translation- and cytoskeleton-related proteins are over-represented in axoplasm extracts, and ribosomal protein levels are elevated following axonal injury. Because local protein synthesis is a key determinant of the axonal protein localization, we also performed LFQ proteomics combined with bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT) to detect the most abundant newly synthesized proteins in osmotic-extruded sciatic nerve axoplasm, detecting 42 newly synthesized proteins. Overall, the results presented here significantly improve the axonal quantitative proteomics *in vivo* and reveal that ribosomal proteins are important elements in axons, especially during the regenerative stages.

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

### Animal Procedures

Sprague–Dawley male adult rats (6–9 months old) were purchased from the animal facility at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, Montevideo, Uruguay) and maintained on a 12 h light–dark cycle, with food and water provided *ad libitum*. All experimental procedures were performed according to the Uruguayan Ethical National Committee (CNEA) under law 18.611 of the República Oriental del Uruguay. The Institution's Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA-IIBCE) approved the specific protocol (experimental protocol no. 005/01/2014).

For the analysis of the total proteome of sciatic nerves, we used six animals. Three were injured in both sciatic nerves, as described later, and the other three were noninjured. By this approach, it was possible to compare the axoplasm samples with the contralateral whole nerve from the same animal under the same conditions (normal or injury conditions). For ventral root (VR) and dorsal root (DR) studies, three animals were used, and the L5 and L6 lumbar VR and DR were extracted. For the BONCAT experiment, we extracted the axoplasm from two sciatic nerves from two different rats and mixed the extracted proteins before the MS/MS protocols.

Sciatic nerve injury was performed as previously described.<sup>13</sup> In brief, the animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine. An incision was made at midhigh, and the sciatic nerve was transected, which was then closed with cyanoacrylate glue. After 18 h of recovery, rats were euthanized by decapitation, and a 2 cm sciatic nerve segment proximal to the transection site was removed. Afterward, we immediately started the epineurium extraction and the whole-nerve sonication or axoplasm isolation protocols described as follows.

### Axoplasm Isolation Protocol

The axoplasm isolation was performed according to Michaelevski et al. (2009)<sup>17</sup> with a few modifications. In

brief, the different nerves were obtained from the rats (injured and noninjured sciatic nerves, VRs, and DRs), and, in the case of the sciatic nerve, the epineurium was extracted. The nerve fascicles were opened with forceps in 0.2× phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in 250  $\mu$ L of 0.2× PBS per nerve for 2 h at room temperature (RT). Then, the nerves were washed 3 × 5 min in 500  $\mu$ L of 0.2× PBS at RT with rotation and incubated in 150  $\mu$ L of PBS 1× at RT for 30 min. Finally, they were centrifuged at 10 000g for 10 min at 4 °C, and the supernatant, which contained the axoplasm proteins, was transferred to a clean low-binding protein tube. Proteins were quantified by NanoDrop, and sodium dodecyl sulphate (SDS) electrophoresis and silver nitrate staining were used to check the quality of the samples.

### Protein Extraction from the Whole Nerves

All of the nerves analyzed (injured and noninjured sciatic nerves, VRs, and DRs) were obtained from the animals, and, in the case of sciatic nerves, the epineurium was extracted in cold 1× PBS. Then, the nerve fascicles were transferred to a 1.5 mL tube with 150  $\mu$ L of 1× PBS on ice. Sonication was carried out immediately by six cycles of 8 s under standard configuration conditions.

### BONCAT Protocol

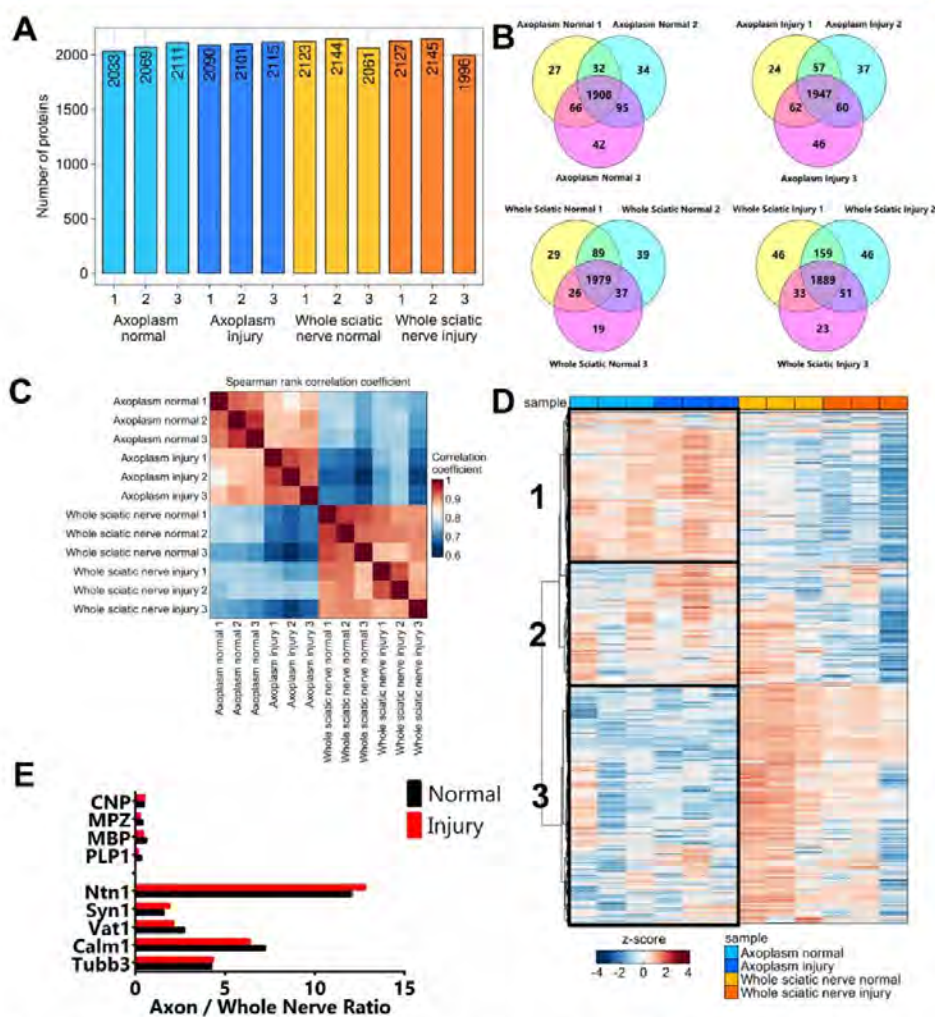
After sciatic nerve extraction and epineurium removal, nerve fascicles were slightly opened with forceps and incubated in custom Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) high-glucose stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) media (MD12-420, Molecular Dimensions) without methionine (Met) for 1 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> to partially deplete the endogenous reserves of Met in the sciatic nerve. Then, the fascicles were transferred to fresh complete SILAC media supplemented with 30 mg/mL Met and 1 mM Click-IT AHA (C10102, Thermo Fisher) and incubated for 4 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The final molecular ratio between AHA/Met was 5/1, and the rest of the amino acids were at standard concentrations. Afterward, the fascicles were extracted and processed for the axoplasm isolation protocol, as previously described.

### Peptide Extraction Method

For whole-proteome (injured and noninjured sciatic nerves, VRs, and DRs) and axoplasm samples, the extracted protein concentration was quantified by BCA assay and resuspended in 1× PBS with 50% trifluoroethanol (TFE) to contain 20  $\mu$ g of total protein. After 5 min of shaking and 5 min of sonication in a water bath, proteins were incubated at 60 °C for 2 h, denatured with 5 mM dithiothreitol (DTT), shaken for 2 min, and incubated another 30 min at 60 °C. After cooling to RT, iodoacetamide was added to a concentration of 25 mM and incubated for 30 min at RT in the dark. Samples were then treated with 80 mM ammonium bicarbonate, pH 8.0, 2 mM of CaCl<sub>2</sub>, and 2  $\mu$ g of trypsin/LysC protease mixture (Promega, MS grade) for 16 h at 37 °C with rotation. Next, 1  $\mu$ g of trypsin was added and incubated for 2 h. Formic acid was added to a concentration of 1% to halt digestion. The samples were spun down by centrifugation at 11 000g for 10 min. The supernatant was taken and dried in a SpeedVac to a volume of 25  $\mu$ L. Then, a reverse solid-phase extraction protocol was performed using C18 stage tips containing three discs. Peptides were eluted with 80% acetonitrile with 0.1% formic acid, dried in a SpeedVac, resuspended in water with 0.1% formic acid, vortexed for 10 min, and sonicated 5 min.

B

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00900>  
J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 1.** Sciatic nerve proteomics data. (A) Number of protein groups detected for each sample and replicate. (B) Venn diagrams showing the overlap of detectable protein groups in each replicate. (C) Spearman rank correlation map including all sample replicates. (D) Heatmap for all sample replicates analyzed. Three clusters are highlighted to indicate the highly abundant axonal (“1”) or whole sciatic nerve (“3”) protein groups. Cluster “2” indicates protein groups with mixed intensity levels for both extractions. (E) Axoplasm quality controls showing a decrease in typical myelin proteins in axoplasm samples and an increase in axonal-related proteins compared with the whole nerve under normal (black bars) and injury (red bars) conditions.

For the AHA-labeled samples, two axoplasm samples from two different rat nerves were mixed to obtain a higher amount of total protein (6.5  $\mu\text{g}$ ). Then, the Thermo Click iT enrichment protocol (C10416) was followed with a few modifications. Those modifications included reducing all of the suggested reaction volumes by 6.5 times and the resin concentration by half. The sample digestion, desalting, binding to the column, washing, elution, and drying steps were carried out as previously described for total proteome samples.

#### MS/MS Proteomics and Statistical Analysis

The peptide concentration was quantified using a NanoDrop Lite spectrophotometer (at 280 nm), and a constant aliquot of 2  $\mu\text{g}$  of peptides was injected onto the column for the chromatography and proteomic analysis. LC–MS/MS data were acquired using an Easy nLC 1000 (Thermo) nanoflow liquid chromatography system with a 50 cm EasySpray (Thermo) column coupled to an Orbitrap Fusion (Thermo) tribrid mass spectrometer. Data was acquired using a 4 h chromatographic gradient with the mass spectrometer

C

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00980>  
J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX

operating in data-dependent mode. MS1 data were acquired at resolution of 120 000 with the Orbitrap, whereas MS2 data were acquired with a top-20 method with the linear ion trap.

For the AHA-labeled samples, 2  $\mu$ g of peptides was loaded onto an Acclaim PepMap (ThermoFisher) precolumn using an Easy 1000 nanoLC liquid chromatograph (Thermo). The peptides were further separated using an Easy Spray column (Thermo). The peptides were detected using a Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher) mass spectrometer performing data-dependent acquisition. Parent ion scans were performed with a scan range of 350–1550  $m/z$ , an AGC target of 3E6, a maximum injection time of 220 ms, a resolution of 140 000, an RF lens of 60%, and microscans set to 1. This was followed by a maximum of 25 fragment ion scans after higher-energy collisional dissociation (HCD) fragmentation. The fragment ions were detected with an isolation window width of 2.0  $m/z$  and an offset of 0.4  $m/z$ , a normalized collision energy of 27%, an AGC target of 5E5, and a maximum fill time of 45 ms.

The acquired data were searched using MaxQuant (v1.5.8.3) with the UniProt protein sequences database (complete *Rattus norvegicus* proteome; 2016-12-09, 2016, 9560 sequences) with a fragment ion mass tolerance of  $\pm 20$  ppm and a parent ion mass tolerance of  $\pm 10$  ppm. Searches were performed with a maximum of two missed tryptic cleavages, the carbamidomethylation of cysteine as a fixed modification, and the oxidation of methionine and acetylation of the protein N-terminus as variable modifications. Additional variable modification of AHA (1-azidohomoalanine)-azide (+107.0773 Da) was added when the AHA-labeled experiments were searched, which was incorporated instead of the methionine amino acid. Proteins were identified with a minimum of two unique peptides, the maximum false peptide discovery rate (FDR) was specified as 1% for peptide spectral matches, and protein identification was carried out using a target-decoy strategy.<sup>58</sup> The “match between runs” option was enabled with a 2 min matching window. The ProteinGroup.txt file was used for all subsequent analysis. Relative quantification was performed using MS1 signal intensity for label-free quantification, following a standard MaxQuant analysis strategy, MaxLFQ.<sup>59</sup> The resulting protein group file was processed with an in-house developed tool, as described in 2016.<sup>60</sup> In brief, the distribution of iBAQ values was adjusted to the distribution of LFQ values based on the median for each sample. All other missing values were replaced by random numbers drawn from a simulated normal distribution of width 0.2 of standard deviation and shifted downward for 1.8 of standard deviation, a method described in Perseus.<sup>61</sup> This resulted in a list of 2313 protein groups detected and quantified for sciatic nerve samples and 950 protein groups for VR samples. (See Supplemental Table 1 for sciatic nerve samples and Supplemental Table 2 for VR and DR samples.) All proteomic data have been deposited to the Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment (MassIVE) consortium with data set identifier MSV000086475 and are available at the following link: <ftp://massive.ucsd.edu/MSV000086475/>.

To identify differences in the protein expression between groups (Axoplasm Injury, Axoplasm Normal, Whole Sciatic Injury, Whole Sciatic Normal), we used Welch's unpaired *t* test and fold change of the group means. Statistical significance was set at raw *p* value  $\leq 0.05$  and fold change (FC)  $> 2$ . In Supplemental Tables 1 and 2, we report the mentioned raw *p* value and also the adjusted *p* value corrected for multiple comparisons (Benjamini–Hochberg correction).

### Over-Representation Pathway Analysis

The Panther free software statistical overrepresentation test tool was used. In brief, the Gene Ontology (GO) biological processes category was selected using the axoplasm and whole-nerve lists as the quote input and the whole list of detected proteins as the background. Then, we selected GO categories for the axoplasm condition that had  $p \leq 0.05$  and a fold enrichment  $> 2$  in each case and compared them to the same categories in the whole nerve. Supplemental Table 3 resumes the complete list of categories for each analysis.

### Venn Diagram Constructions

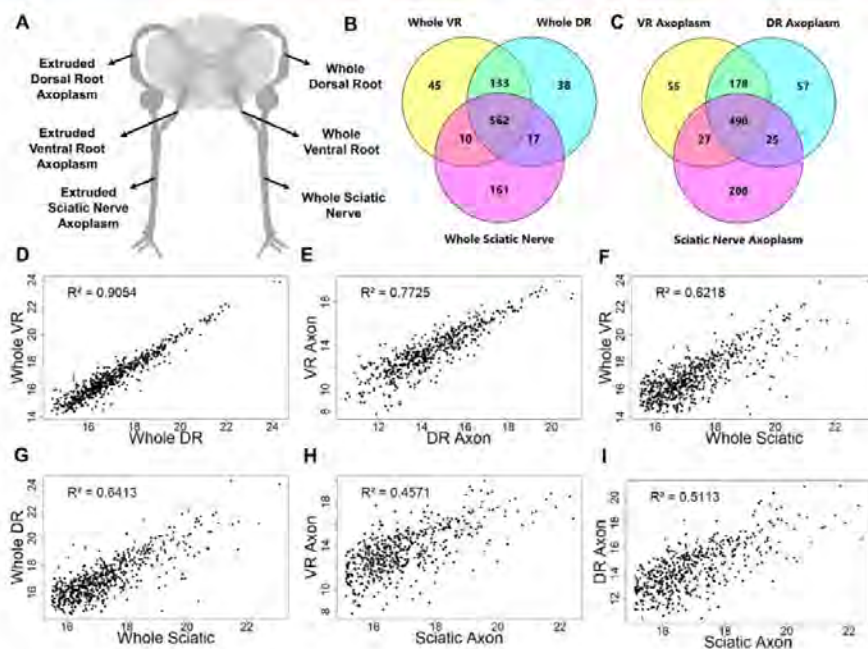
For a comparison of protein lists and to analyze which detected proteins are in common between data sets, we used Venn diagrams constructed with VennDIS software.<sup>62</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

### Quantitative Proteomics of Osmotic-Extruded Axoplasm

An average of 2087 and 2099 proteins groups were detected in the axoplasm and whole sciatic nerve proteomes, respectively (Figure 1A). We expected to observe a higher number of protein groups in the whole-nerve protein extract, but the low number is likely due to technical reasons like the high abundance of myelin-related proteins masking the detection of lower abundance proteins, a common dynamic range issue in proteomics. In addition, we likely have a diminished recovery of proteins due to the high fat content and the solubility of myelin proteins in the detergent-free lysis buffer used. Previous approaches using the same osmotic axoplasm extraction method detected 540 proteins in one study<sup>47</sup> and 972 proteins by iTRAQ proteomics from injured sciatic nerve ligatures.<sup>25</sup> In this iTRAQ analysis, 100 animals per biological replicate were used. Because our axoplasm material was obtained from one sciatic nerve segment per replicate, the detection depth of the method was significantly increased.

Ninety five percent of the proteins found for each condition were present in all biological replicates (Figure 1B), and 97% of axonal detected proteins were included in the whole tissue proteome. The highest dissimilarity was observed between whole nerves and axoplasm proteomes, with normal and injury conditions showing the closest resemblance, as seen by Spearman rank correlation (Figure 1C). The heatmap including all sample replicates showed clear clusters of the biological replicates and conditions and distinguished more precisely axonal from whole-nerve nonaxonal proteins, as almost a third of the proteome detected had high Z-scores on axoplasm extracts (cluster 1 of Figure 1D). Additionally, if the axoplasm and whole-nerve samples were clustered separately, then the differences between injured and noninjured proteomes at the axoplasm and whole-nerve levels could be observed in more detail. (See Supplementary Figure 1.) The cluster of high-intensity proteins on all axoplasm samples (cluster 1 of Figure 1D) could be used to assemble a list of axonal proteins (provided in Supplemental Table 4). Cluster 3 may, on the contrary, represent whole-nerve contaminants found in the extruded axonal extract besides low abundant axonal proteins common to the rest of the nerve proteome. When we analyzed proteins levels that were previously reported as markers for *in vivo* adult sciatic nerve Schwann cells like Mbp, Mpz, Ncam1, and various S100 isoforms,<sup>63</sup> these proteins were detected in the “whole-nerve cluster” (marked with 3; see Supplemental Table 4). Other Schwann-



**Figure 2.** Use of hypotonic extruded axoplasm isolation protocol shows reproducibility in different peripheral nerve axons. (A) Scheme of the proteomes obtained from ventral root (VR), dorsal root (DR), and sciatic nerve samples. (B) Venn diagram for the three whole-nerve proteomes of the VR, DR, and sciatic nerve. (C) Venn diagram for the three extracted axoplasm proteomes of the VR, DR and sciatic nerve. (D–I) Scatter plots of iBAQ values for the proteins in common between different pairs of samples. The  $R^2$  coefficient values are shown.

cell-related proteins like Gap43 were present in the axoplasm cluster, but it was recently reported as locally synthesized in axons,<sup>64</sup> and its transcript was also detected in the rat VR axon transcriptome,<sup>12</sup> so it could be expected to be found at extruded axonal extracts.

These results suggest that the axoplasm isolation procedure generates an enrichment in axonal components relative to glial material. It is important to note that typical axonal proteins like the three neurofilament (NF) subunits are also present in the top 30 detected axonal proteins. (See Supplemental Table 5.)

#### Osmotic Protocol Allows for the Isolation of Axoplasm from Different Peripheral Nerves Tissues

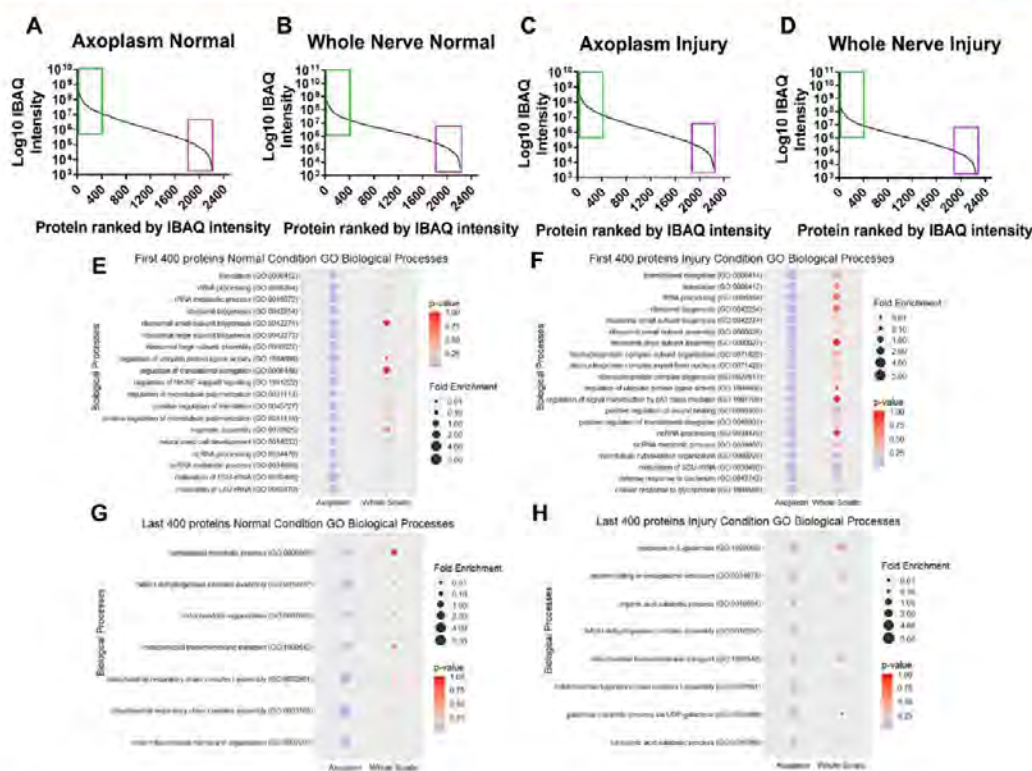
It is becoming evident that variations in protein abundances exist between axons of different origins, physiological states, and external stimuli. Therefore, it is relevant to the field to test this idea using the described osmotic protocol and to isolate axoplasm from different types of neurons. Apart from this approach, a different protocol was developed by Koenig and collaborators to obtain axonal material known as axoplasm microdissection<sup>65</sup> and was previously used by our group.<sup>66–70</sup> Nevertheless, this method is not suitable for the isolation of nerves with high contents of collagen and connective tissue as the sciatic nerve.<sup>71</sup> Here we isolated axoplasm from the L5 and L6 VR and DR axons, which corresponds to proximal segments of axoplasm originating from motor neurons or sensory neurons, respectively. In addition, these axons also will be components of those extruded from the sciatic nerve (Figure 2A). It is worth noting that axoplasm extruded from the DR

corresponds to the axons projecting from the dorsal root ganglion neurons to the spinal cord, not the periphery. As an initial analysis, we compared the top 750 most intensely detected proteins among all samples. Seventy five percent of proteins were found in the three whole-nerve tissue proteomes (Figure 2B), and 65% were found in the three axoplasm proteomes (Figure 2C), suggesting similar protein contents among the proteomes but also indicating some differences. (For raw data, see Supplemental Table 2.) The R-squared ( $R^2$ ) values from protein intensities (iBAQ) showed higher similarities between DR and VR whole nerves ( $R^2 = 0.90$ , Figure 2D) and DR and VR axons ( $R^2 = 0.77$ , Figure 2E) compared with the sciatic nerve with VR ( $R^2 = 0.62$ , Figure 2F) and DR whole nerves ( $R^2 = 0.64$ , Figure 2G) or the sciatic nerve axon with VR ( $R^2 = 0.46$ , Figure 2H) or DR axons ( $R^2 = 0.51$ , Figure 2I). The Pearson correlation matrix shows similar tendencies between conditions. (See Supplementary Figure 2.) Because axons derived from VRs and DRs are quite homogeneous regarding the type of neurons, that is, motor and sensory types, we also present the list of proteins differentially detected in these two axons. (See Supplemental Table 6.) As expected, only 14 proteins were enriched in the VR axoplasm, and 35 were enriched in the DR axoplasm, suggesting a similar protein content in both axon types. Interestingly in the list of enriched axonal DR proteins, we found APOE, which was previously reported as an important regulator of the DRG lipidome,<sup>72</sup> glutathione peroxidase,<sup>73</sup> which is relevant for oxidative toxicity modulation in DRGs,<sup>74</sup>

E

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00980>  
J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX





**Figure 3.** Overrepresented GO biological processes of the top (T) and last (L) 400 detected proteins in the axoplasm under normal and injury conditions. (A–D) Graphics of protein Log<sub>2</sub> (iBAQ) intensities for each condition. The green rectangle shows the expression levels of the first 400 proteins, and the violet rectangle shows the expression levels of the last 400 proteins. (E–H) Selected list of GO biological processes for normal and injury conditions with significant *p* value (<0.05; see the color scale) and a fold enrichment >2 (see the circle size) in the axoplasm samples compared with the whole-nerve samples.

and dynein light chain, which is a motor molecule essential for retrograde transport in axons. Mutations in this gene could produce proprioceptive sensory neuron loss and impaired retrograde axonal transport.<sup>74</sup> In the list of enriched VR axonal proteins, we identified Myosin X, which is involved in filopodia elongation<sup>75,76</sup> and functions in axon pathfinding. The lower correlation observed between protein extracts from VR or DR axons with sciatic nerve axons may be due to the high diversity of axons found in the latter, which originates from a larger number of spinal cord/ganglion segments and includes the full variety of neurons projecting into it. The lowest level of correlation between the roots and the whole sciatic nerve may be a reflection of dissimilar tissue organization.<sup>71</sup> Overall, these results indicate that an osmotic axoplasm isolation protocol could be used in different peripheral nerves with reproducible results.

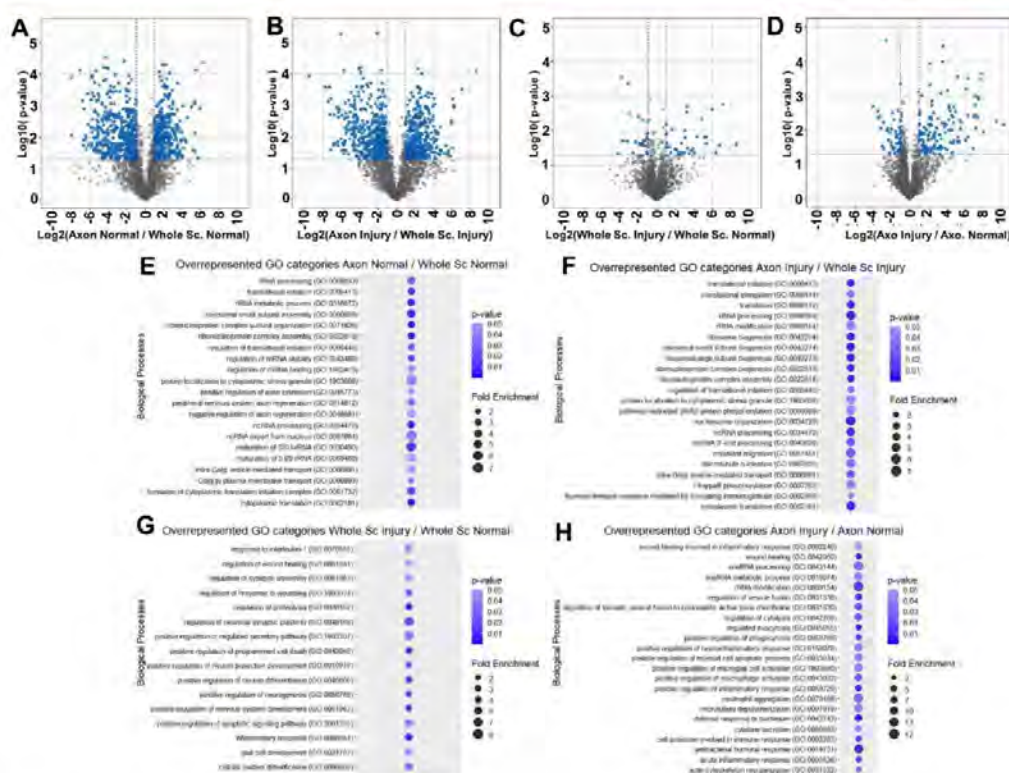
#### Axoplasm Proteome Is Enriched in the Cytoskeleton and Translation-Related Proteins with Further Increased Expression Postinjury

To evaluate the overall differences between the axoplasm and whole-nerve proteomes, the top 400 most intensely detected

(T400) and last 400 (L400) least intensely detected proteins (Figure 3A–D and Supplemental Table 5) were selected for the assessment. The noninjured axoplasm proteome relative to the whole sciatic nerve reveals overrepresented biological processes (Supplemental Table 3), including ribosome assembly and biogenesis, regulation of translation elongation, and microtubule organization (Figure 3E). Those categories included elongation-related proteins (i.e., Eef1a1, Eif5a, Eef1g, Eef1d, and Eif4a2), the tubulin alpha and beta subunits (including nine different chains), the three NF subunits, the molecular motor proteins like myosin 6 and 9, dynein-1 and -2, and the microtubule-associated protein 1A (Map1a). These results are in agreement with previous *in vitro*<sup>8</sup> and *in vivo*<sup>25</sup> axonal proteomic results. Interestingly, we also detected a higher percentage of ribosomal proteins in axons, with 48 cytosolic ribosomal proteins out of the 89 reported for the rat genome<sup>77</sup> present in the axonal T400 list and only 7 ribosomal proteins present in the whole-nerve T400 list under normal conditions. For the T400 of the injured axoplasm, biological processes related to wounding and the immune response were overrepresented compared with the whole injured nerve and may imply an initial axonal response to the injury (Figure 3E).

F

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00980>  
J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 4.** Analysis of the significantly enriched proteins in axoplasm samples under normal and injury conditions and the biological processes associated. (A–D) Volcano plots showing the statistically significant enriched proteins for different conditions. Enriched proteins in the axoplasm compared with the whole nerve in (A) a preinjury state and (B) a postinjury state. (C) Enriched proteins of the whole-nerve proteome pre- and postinjury and (D) the enriched axonal proteome pre- and postinjury. (E–H) The over-represented GO biological processes for the differentially detected proteins with a significant  $p$  value ( $<0.05$ , see the color scale) and fold enrichment  $>2$  (see the circle size).

Those categories include neutrophil-related proteins (Np4, Lcn2, Defa, Mmp8) and apolipoproteins like APOE, which was previously reported to be locally translated in the sciatic nerve and necessary for injury response signals.<sup>76,79</sup> In addition, 61 cytosolic ribosomal proteins in the injured axoplasm and 15 in the injured whole nerve were detected in the T400 protein lists, respectively. (See Supplemental Table 7.) The L400 detected proteins in axons included biological processes related to oxidative metabolism functions like various ATP synthase subunits, mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (Slc25a11), and cytochrome complex subunits (Figures 3G,H). It is known that mitochondria are extensively distributed along peripheral axons,<sup>80,81</sup> but in our data, most of the mitochondria-related proteins were between the T400 and L400 groups with moderate expression levels. (See Supplemental Table 5.)

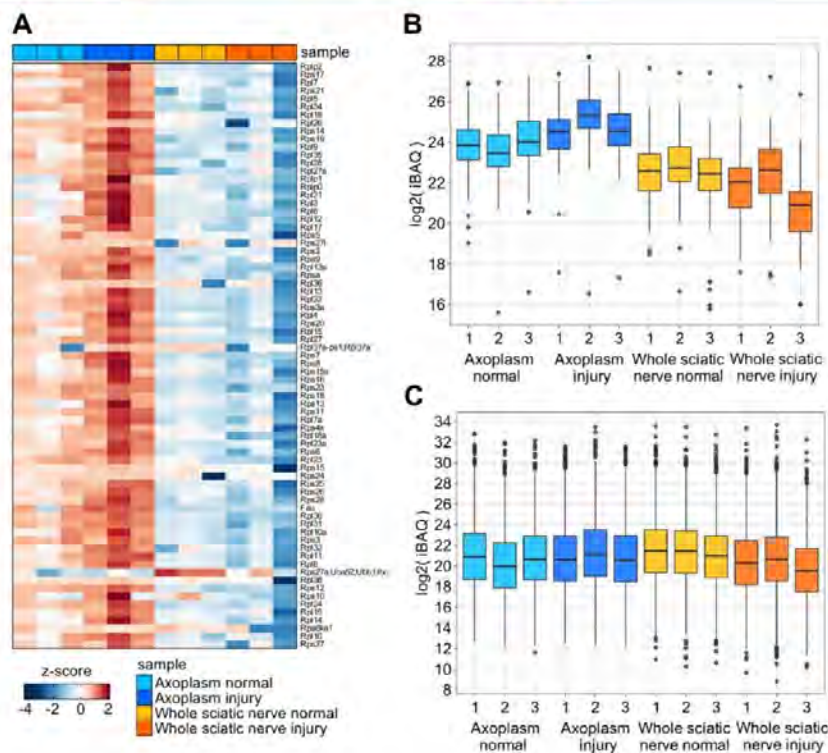
To reveal lists of significantly enriched proteins and to evaluate their overrepresented biological processes, we also studied the differential protein abundance by comparing different conditions (Figure 4A–D and Supplemental Table 8).

The preinjury axoplasm proteome relative to the preinjury whole-nerve proteome reveals a list of 330 significant enriched proteins with overrepresented biological processes including translation, secretory pathways, neuronal synapse assembly, ribonucleoprotein assembly, Golgi mediated transport, neuronal differentiation, development, and neurogenesis regulation (Figure 4E). Proteins reported to be involved with the axonal response, axonal guidance, and plasticity processes like netrin-1,<sup>82–86</sup> the metalloprotease TIMP-2,<sup>87–89</sup> calmodulin,<sup>90,91</sup> nestin,<sup>92,93</sup> and septin proteins 2, 5, 7, and 9<sup>94–97</sup> were present in this list. Interestingly, Golga2 protein, an element reported as part of the Golgi complex, was also enriched. In addition, previous reports showed the presence of typical Golgi markers in *in vitro* axons,<sup>43</sup> and here we detected Golgi proteins in adult *in vivo* axons, suggesting the presence of analog structures in the Golgi complex. Surprisingly we also detected 41 ribosomal proteins in this list (Supplemental Table 7).

The injured axoplasm proteome compared with whole-nerve proteome showed a list of 345 significantly enriched proteins, and the overrepresented biological processes included SMAD protein phosphorylation, proteins localized to stress granules, response to immunoglobulins, myoblast migration, and other

G

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00900>  
J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 5.** Ribosomal proteins are enriched specifically in injury axoplasm samples. (A) Heatmap for the 73 ribosomal proteins detected in whole-nerve and axoplasm samples under normal and injury conditions expressed in iBAQ values. Note the increased levels of ribosomal proteins in axoplasm samples, especially under the injury conditions, in relation to the whole-nerve samples. (B) Box plots showing the intensity of the detected ribosomal proteins in all sample types. (C) Box plots showing the intensity of all detected proteins in all sample types.

categories similarly also overrepresented in the preinjury comparison (Figure 4F). Surprisingly, histone proteins, including H2A1, H2AZ, H1.5, H1.1, H1.4, H1.0, H1.4, and H2B1, were in this list. Despite their canonical functions in the nucleus, histones were previously abundantly detected in axons *in vitro*<sup>43</sup> and *in vivo*,<sup>25,47</sup> and they may have other regulatory roles in axons.<sup>45</sup> Interestingly we also found 53 ribosomal proteins in this list, 12 more than in the noninjured axon (Supplemental Table 7).

To evaluate solely the effects of the injury, we compared the axonal and whole-nerve tissues under normal and injury conditions. Surprisingly, there were only 38 significantly enriched proteins for whole nerves (Figure 4C), but for the axoplasm comparison, this number rose to 143 (Figure 4D). These results may suggest that the initial changes in injury response may occur at the axonal level, at least in the first 18 h postinjury rather than the whole-nerve level. The overrepresented biological processes support this idea because most of the categories were related to injury response, wound healing, immune response, microglial activation, apoptosis, inflammatory response, and regeneration and also microtubule and actin organization with higher fold enrichments for the axonal comparison (Figure 4G,H). Interestingly, there was a

group of 75 proteins that were specifically upregulated in axons postinjury but not in the whole injured nerve.

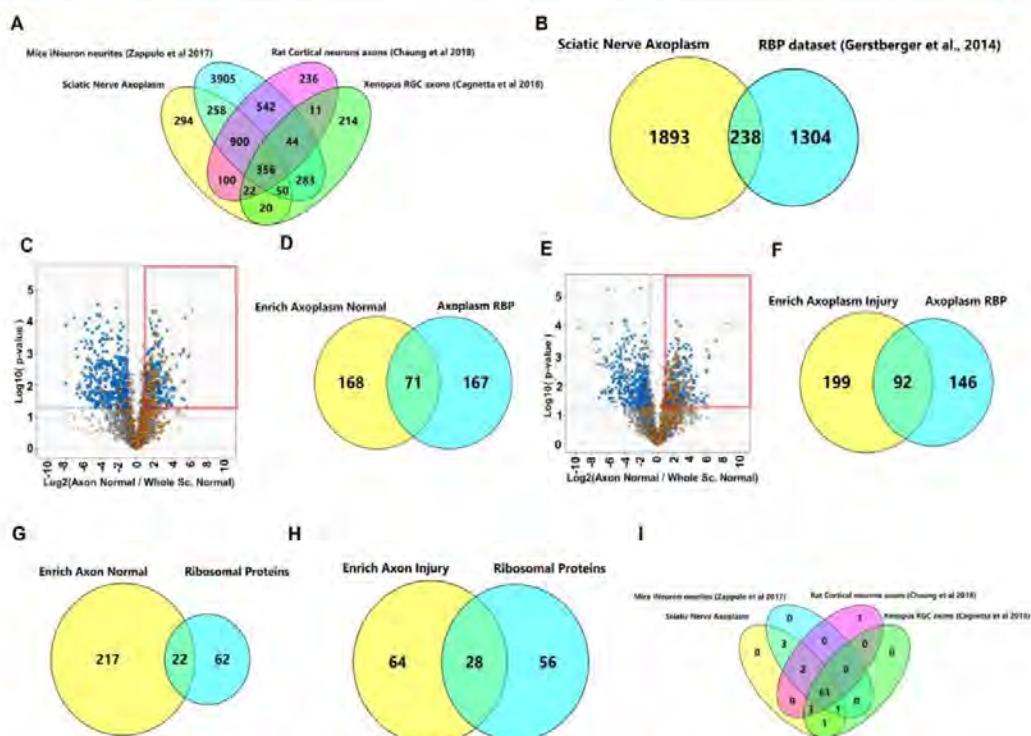
Included in this list were actin-related proteins like myosins, tropomyosins, the transcriptional repressor Ctcf, which is reported to be important in neuronal development,<sup>98</sup> and nine ribosomal proteins. (See Supplemental Table 9.)

#### Ribosomal Proteins Are Enriched in Axons Relative to the Whole Sciatic Nerve with Further Increased Expression in Injured Axons

The data described above show that ribosomal proteins are present in axons, but we were also interested in evaluating their global expression pattern upon injury in each type of sample. The heatmap and box plot analysis for all detected ribosomal proteins show a significant enrichment at the axonal level relative to the whole sciatic nerve. Interestingly, there is also an increase in the axonal injury level (Figure 5A,B), which also can be seen when clustering is performed on axoplasm extracts alone but is not as evident in the whole sciatic nerve comparison (Supplementary Figure 3). This effect is not observed when all detected protein groups are considered, suggesting a specific enrichment of ribosomal proteins in axoplasm samples (Figure 5C). Interestingly, the ribosomal protein RPL26, which was previously reported in sciatic nerve axons *in vivo* and increased postinjury,<sup>99</sup> is also one of the most

H

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00980>  
J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 6.** Comparison of axoplasm data with reported *in vitro* axonal proteomes and a human RBP data set. (A) Venn diagram showing the overlap between our axoplasm proteome data with the previous proteomes reported for axonal proteomes *in vitro*. Proteins were translated to human orthologs in all cases. (B) Venn diagram indicating the overlap between our axonal proteome with a human RBP data set. (C) Volcano plot of Figure 3A merged with the RBPs detected in our axoplasm samples. (D) Venn diagram showing the overlap between enriched axoplasm proteins under normal conditions relative to the whole sciatic nerve proteome. (E) Volcano plot of Figure 3B merged with the RBPs detected in our axoplasm samples. (F) Venn diagram showing the overlap between enriched injury axoplasm proteins relative to the injury whole sciatic nerve proteome and the RBPs detected in our axoplasm proteome. (G) Overlap between enriched axoplasm proteins under normal conditions and the axoplasm ribosomal proteins. (H) Overlap between the enriched axoplasm proteins under injury conditions and the axoplasm ribosomal proteins. (I) Venn diagram showing the overlap between the detected ribosomal proteins in our data set and the ribosomal proteins detected in *in vitro* axoplasm proteomes.

abundant in our axoplasm data under normal and injury conditions and is significantly enriched compared with whole-nerve tissue under both conditions ( $p$  value 0.04, FC > 5; see Supplemental Table 7). The presence of active ribosomes inside axons was always a point of scientific controversy because axonal polysomes are difficult to identify by electron microscopy.<sup>54</sup> A recent study using *in vitro* ribosome profiling suggests that axonal ribosomes are actively translating RNAs locally not as polysomes but as monosomes.<sup>55</sup> The authors also suggest that this could be the reason why ribosomes are so difficult to identify in axons by electron microscopy. Another independent study also demonstrates that newly synthesized axonal ribosomal proteins join ribosomes through a nucleolus-independent manner<sup>100</sup> supporting the idea of a highly dynamic ribosome assembly activity that is local to axons. Together, these results suggest that the ribosomal proteins detected as enriched in our axoplasm proteome could correspond to the reported active monosomes or perhaps

part of larger structures like periaxoplasmic ribosomal plaques.<sup>65–67</sup>

#### Detected Sciatic Nerve Axoplasm Proteins Were Previously Reported in Axonal Proteomes *in Vitro*

Because our proteomic dataset is one of the few reported for the *in vitro* peripheral axoplasm of adult rats, we compared it with *in vitro* axonal proteomes previously published: iNeurons from mice,<sup>8</sup> cortical neurons of rats,<sup>33</sup> and retinal ganglion cells from *Xenopus*.<sup>44</sup> To compare lists of proteins from different species, we translated all protein names to human orthologs using the BIOMART online tool from e!Ensembl. As shown in Figure 6A, 356 proteins were present in all of the proteomes analyzed (18% of our data set), 1706 were present at least in one of the other data sets (85% of our data set), and 294 were specific of our list, representing only 15% of our axoplasm proteome. (See Supplemental Table 10.) This list included the apolipoproteins A, B, C, D, and H, which are important for lipid transport and remyelination during nerve injury,<sup>101</sup> Caveolin 1, whose phosphorylation is essential for axonal

f

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00980>  
J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX

Table 1. Newly Synthesized Proteins Detected by the MS/MS BONCAT Approach<sup>a</sup>

UniProt code	gene name	gene symbol	reported in NSP proteomic articles	mRNA detected in rat mature axoplasm transcriptome (ref 42)
P02688-5; P02688-2; P02688; P02688-4; P02688-3	myelin basic protein	Mbp	no	yes
P02770	serum albumin	Alb	no	no
P06907	myelin protein P0	Mpz	no	yes
P07632	superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod1	refs 110 and 8 (pSILAC)	yes
P07943	aldose reductase	Akr1b1	no	no
P11598	protein disulfide-isomerase A3	Pdia3	refs 44 and 8 (pSILAC and QuaNCAT)	yes
P11762	galactin-1	Lgals1	ref 8 (QuaNCAT)	no
P15865; P06349	histone H1.4	Hist1h1c	no	yes
P16086	spectrin alpha chain, nonerythrocytic 1	Sptan1	no	no
P18418	calreticulin	Calr	ref 8 (pSILAC and QuaNCAT)	yes
P19132	ferritin heavy chain, N-terminally processed	Fth1	no	yes
P19527	neurofilament light polypeptide	Nefl	no	yes
P21807	peripherin	Prph	ref 44	no
P31232	transgelin	Tagln	ref 8 (QuaNCAT)	no
P47875	cysteine- and glycine-rich protein 1	Csrp1	no	no
P47942; Q62950	dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2	refs 44 and 8 (QuaNCAT)	no
P50503	Hsc70-interacting protein	Stt3	ref 44	no
P68255	14-3-3 protein theta	Ywhaq	ref 8 (pSILAC and QuaNCAT)	no
Q6AYZ1; Q6P9V9; P68370; Q68FR8; Q5XIF6	tubulin alpha-1C chain	Tuba1c; Tuba1b; Tuba1a; Tuba3a	ref 110	yes
P85108; Q3KRE8	tubulin beta-2A chain	Tubb2a; Tubb2b	ref 8 (QuaNCAT)	yes
Q00981	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Uchl1	ref 8 (QuaNCAT); ref 110	no
Q01129	decorin	Dcn	ref 44	no
Q5M7W5-2; Q5M7W5	microtubule-associated protein 4	Map4	no	yes
Q62658	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	Fkbp1a	no	yes
Q63425; Q63425-2	peroxin	Ppx	no	no
Q63716	peroxiredoxin-1	Prdx1	ref 8 (pSILAC and QuaNCAT)	no
Q64119	myosin light polypeptide 6	Myl6	ref 8 (QuaNCAT)	yes
Q6JE36	protein NDRG1	Ndr1	ref 8 (QuaNCAT)	no
Q9EQJ5	prolargin	Prep	no	yes
P12839	neurofilament medium polypeptide	Nefm	no	yes
P01946	hemoglobin subunit alpha-1/2	Hba1	no	yes
Q6P9T8; P69897-2	tubulin beta-4B chain	Tubb4b	ref 8 (pSILAC)	no
Q05982; P19804	nucleoside diphosphate kinase A; nucleoside diphosphate kinase B	Nme1; Nme2	no	yes
P62804	histone H4	Hist1h4b	no	no
P45392	cofilin-1	Cfl1	ref 8 (pSILAC, QuaNCAT)	yes
P48500	triosephosphate isomerase	Tpi1	no	yes
P06761	78 kDa glucose-regulated protein	Hspa5	refs 44 and 8 (pSILAC, QuaNCAT)	yes
P10111	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed	Ppia	ref 8 (QuaNCAT)	yes
P62329	thymosin beta-4	Tmsb4x	no	yes
P02454	collagen alpha-1(I) chain	Col1a1	no	no
P48679	prelamin-A/C; lamin-A/C	Lama	no	no
P31000; P48675; P23565	vimentin	Vim	ref 8 (pSILAC, QuaNCAT)	yes

<sup>a</sup>List of axonal proteins detected as newly synthesized in extruded sciatic nerve axoplasm samples combining MS/MS and BONCAT protocols. The proteins that were detected as newly synthesized through other studies are also indicated.

growth in human neurons derived from induced pluripotent stem cells<sup>102</sup> and promotes early neuronal maturation at cortical neurons,<sup>103</sup> and various myosin light and heavy chains,

which are the molecular motors of microtubule-related axonal transport. When we compare our axoplasm data with those detected by Fainzilber's group in extruded rat axoplasm

J

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00980>  
J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX

material,<sup>47</sup> 84% (151 protein groups) were detected in our axoplasm data. In another report by the same authors,<sup>25</sup> 83 and 77% of retrograde (113 protein groups) and anterograde (109 protein groups) transport-related proteins were detected in our axoplasm data set (Supplementary Figure 4).

Previous reports indicated that RNA-binding proteins (RBPs) are important for axonal function, growth, and RNA transport.<sup>103,105</sup> After comparing our axonal proteome with a data set of human-reported RBPs,<sup>106</sup> the results revealed that at least 10% of the axonal-detected protein groups were RBPs (Figure 6B). Interestingly, 30% of our axonal enriched proteins groups under preinjury conditions (Figure 6C,D) and 36% under postinjury conditions (Figure 6E,F) were classified as RBPs. (See Supplemental Table 11.) From these lists, 22 under the noninjured conditions and 28 in injured axons were ribosomal proteins (Figure 6G,H). These results suggest that almost a third of the axonal enriched proteins were RBPs, and a high proportion of them were ribosomal proteins. To validate our ribosomal protein data, we compared them with the ribosome proteins detected by *in vitro* axonal proteomics. All of the proteins detected in our axoplasm samples were present in other axonal proteomics, and 63 were common between all of the data sets from three different animals (Figure 6I).

#### Newly Synthesized Proteins Were Detected in Sciatic Nerve Axoplasm *in Vivo* by BONCAT Proteomics

The development of new biochemical techniques to reveal newly synthesized proteins (NSPs), like BONCAT<sup>107</sup> or fluorescence noncanonical amino acid tagging (FUNCAT) protocols,<sup>108</sup> combined with imaging techniques such as Puro-PLA (puromycin proximity ligation assay) is useful to know if a specific protein is newly translated in specific cytoplasmic domains of axons.<sup>109</sup> However, the techniques that reveal NSPs using genome-wide-scale proteomics are very recent and difficult to implement, especially from isolated axons *in vivo*.<sup>1</sup> In this work, we combine a BONCAT approach with proteomics in noninjured osmotic-extruded sciatic nerve axoplasms, detecting 42 NSPs. (See Table 1.) Whereas the number of proteins detected is lower compared with the axon NSPs reported *in vitro* (380 NSPs in mice *iNeuron* neurites<sup>7</sup> and 350 NSPs in *Xenopus* retinal ganglion cell (RGC) axons<sup>44</sup>), it is still a relevant result because no reports of NSPs at mature axons *in vivo* were developed using proteomic approaches. The small number of detected NSPs could be explained by the fact that we have a low amount of axoplasm material on which to perform the AHA enrichment protocol. (See the Experimental Section.) From our list of axonal NSPs, 24 of their coding mRNAs were present in the transcriptome of the VR axoplasm recently published by our group.<sup>42</sup> Moreover, 28 proteins were detected as NSPs in three other axonal proteomic reports: rat DRG axons analyzed by radiolabeling, 2D-gels, and MS/MS proteomics;<sup>110</sup> *in vitro* mice *iNeuron* neurites studied by pSILAC and QuaNCAT MS/MS proteomics;<sup>8</sup> and *in vitro* *Xenopus* RGC axons analyzed by pSILAC combined with single-pot solid-phase and MS/MS proteomics. Among the remaining 14 NSPs are the light and medium NF subunits (NEFL and NEFM). This is consistent with our previous data showing the neosynthesis of the three subunits in sciatic nerves<sup>53</sup> and results from the giant axon of the squid.<sup>111</sup> Additionally, the recent transcriptomic analysis of our group detected the mRNA of NEFL and NEFM in adult rat VRs axons *in vivo*.<sup>42</sup> Interestingly, the previously mentioned studies<sup>110,8,44</sup> do not describe the *de*

*nov* synthesis of NFs, although the mRNA is detected in ref 8. This may be consistent with the regulation of NF protein synthesis, as also suggested in ref 112. In addition, our data include the  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin subunits as axonal NSPs previously reported as locally synthesized by the Campanot group in rat sympathetic neuron axons cultured in compartment chambers.<sup>113</sup> We also detected the typical glial proteins MBP and MPZ as axonal NSPs. Notably, the intensity levels of these two proteins in our total axoplasm proteome are high, but by significantly smaller amount than in the whole-nerve proteome. (See Supplemental Table 5 and Figure 1E.) In line with these results, the mRNA of these two genes was also detected in the VR axoplasm transcriptome of adult rats recently reported by our group.<sup>42</sup> The subcellular distribution of MBP in the internal mesaxon, close to the axon–glial contact site, could explain the presence of this protein in our axon preparation but at reduced levels after the axoplasm isolation procedure. Refer to Table 1 for a list of the NSPs detected by our analysis and the details of their detection in other studies.

## CONCLUSIONS

In summary, we report a significant improvement to axonal proteomics *in vivo* using an LFQ-based proteomic protocols with limited axoplasm starting material. Our results demonstrate that cytoskeleton- and translation-related proteins are enriched in axons, with a subsequent upregulation of those categories upon injury. In particular, ribosomal proteins are specifically increased at the axonal level during the first 18 h after sciatic nerve injury and suggest a specific role for them during regenerative stages. Additionally, we combine proteomics with BONCAT labeling to detect a list of 42 newly synthesized proteins in axons, and most of them are confirmed as locally synthesized in axons by different methodologies.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.0c00980>.

Supplementary Figure 1. Heatmaps of axoplasm replicates and whole-nerve sample replicates plotted separately. Supplementary Figure 2. Pearson correlation coefficient for axon samples comparison. Supplementary Figure 3. Heatmap for the 73 ribosomal proteins detected in the axoplasm samples and whole sciatic nerve samples under normal and injury conditions expressed in iBAQ values. Supplementary Figure 4. Overlap between axoplasm sample and the proteomes detected by extruded axoplasm extraction in previous articles (PDF)

Supplemental Table 1. Sciatic samples raw data and statistical analysis (XLSX)

Supplemental Table 2. Ventral and dorsal roots raw data and statistical analysis (XLSX)

Supplemental Table 3. GO Biological Processes for each comparison (XLSX)

Supplemental Table 4. Heatmap clusters for axon-, mixed-, and whole-nerve-related protein groups (XLSX)

Supplemental Table 5. List of protein groups ordered by iBAQ values (XLSX)

Supplemental Table 6. Differential expressed proteins at ventral root versus dorsal root axoplasm proteomes (XLSX)

Supplemental Table 7. List of all ribosomal proteins detected in each comparison (XLSX)

Supplemental Table 8. List of enriched proteins for all different comparisons (XLSX)

Supplemental Table 9. Protein groups only enriched at injured axons (XLSX)

Supplemental Table 10. Lists of protein groups in common and only detected in our axoplasm data set (XLSX)

Supplemental Table 11. List of RBPs detected in axoplasm samples (XLSX)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

**José Sotelo Silveira** – Departamento de Genómica, IIBCE, 11600 Montevideo, Uruguay; Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, 11400 Montevideo, Uruguay; Phone: +59824871616;

Email: jsotelosilveira@iibce.edu.uy, sotelojos@gmail.com

**Thomas Kislinger** – Princess Margaret Cancer Centre, Toronto, Ontario MSG 1L7, Canada; Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario MSG 1L7, Canada; [orcid.org/0000-0003-3525-5540](https://orcid.org/0000-0003-3525-5540); Phone: 416-581-7627; Email: thomas.kislinger@utoronto.ca

### Authors

**Andres Di Paolo** – Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos and Departamento de Genómica, IIBCE, 11600 Montevideo, Uruguay; [orcid.org/0000-0001-5383-3151](https://orcid.org/0000-0001-5383-3151)

**Joaquina Farias** – Departamento de Genómica, IIBCE, 11600 Montevideo, Uruguay

**Joaquin Garat** – Departamento de Genómica, IIBCE, 11600 Montevideo, Uruguay

**Andrew Macklin** – Princess Margaret Cancer Centre, Toronto, Ontario MSG 1L7, Canada

**Vladimir Ignatchenko** – Princess Margaret Cancer Centre, Toronto, Ontario MSG 1L7, Canada

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jproteome.0c00980>

### Author Contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

All proteomic data have been deposited to the Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment (MassIVE) consortium with data set identifier MSV000086475 and are available at the following link: <http://massive.ucsd.edu/MSV000086475/>.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) for funding projects codes POS\_NAC\_2016\_1\_129865 and PEC\_2\_2018\_1\_152664, and MPI\_ID\_2020\_1\_1010120. We thank the PEDECIBA and the Comisión Académica de Posgrado (CAP) postgraduate

systems. This research was funded in part by the Ontario Ministry of Health and Long-Term Care. We thank Dr. José Sotelo Sosa for inspiring us to continue the study of protein synthesis in axons.

## ■ REFERENCES

- (1) Kim, E.; Jung, H. Local Protein Synthesis in Neuronal Axons: Why and How We Study. *BMB Rep.* **2015**, *48* (3), 139–146.
- (2) Canclini, L.; Kun, A.; Calliari, A.; Mercer, J. A.; Dotelo, J. R.; Sotelo-Silveira, J. R. The Axonal Transcriptome: RNA Localization and Function. *CCB* **2011**, *5* (2), 99–107.
- (3) Sahoo, P. K.; Smith, D. S.; Perrone-Bizzozero, N.; Twiss, J. L. Axonal mRNA Transport and Translation at a Glance. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, No. jcs196808.
- (4) Rangaraju, V.; tom Dieck, S.; Schuman, E. M. Local Translation in Neuronal Compartments: How Local Is Local? *EMBO Rep.* **2017**, *18* (5), 693–711.
- (5) Mahar, M.; Cavalli, V. Intrinsic Mechanisms of Neuronal Axon Regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2018**, *19* (6), 323–337.
- (6) Koley, S.; Rozenbaum, M.; Fainzilber, M.; Terenzio, M. Translating Regeneration: Local Protein Synthesis in the Neuronal Injury Response. *Neurosci. Res.* **2019**, *139*, 26–36.
- (7) Farias, J.; Sotelo, J. R.; Sotelo-Silveira, J. Toward Axonal System Biology: Genome Wide Views of Local mRNA Translation. *Proteomics* **2019**, *19* (16), No. 1900054.
- (8) Zappulo, A.; van den Bruck, D.; Ciolli Mattioli, C.; Franke, V.; Imami, K.; McShane, E.; Moreno-Estelles, M.; Calviello, L.; Filipchuk, A.; Peguero-Sanchez, E.; Müller, T.; Woehler, A.; Birchmeier, C.; Merino, E.; Rajewsky, N.; Ohler, U.; Mazzoni, E. O.; Selbach, M.; Akalin, A.; Chekulaeva, M. RNA Localization Is a Key Determinant of Neurite-Enriched Proteome. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 583.
- (9) Alvarez, J.; Torres, J. C. Slow Axoplasmic Transport: A Fiction? *J. Theor. Biol.* **1985**, *112* (3), 627–651.
- (10) Perry, R. B.; Fainzilber, M. Local Translation in Neuronal Processes-in Vivo Tests of a "Heretical Hypothesis. *Dev. Neurobiol.* **2014**, *74* (3), 210–217.
- (11) Sotelo, J. R.; Canclini, L.; Kun, A.; Sotelo-Silveira, J. R.; Calliari, A.; Cal, K.; Bresque, M.; Dipaolo, A.; Farias, J.; Mercer, J. A. Glia to Axon RNA Transfer. *Dev. Neurobiol.* **2014**, *74* (3), 292–302.
- (12) Court, F. A.; Hendriks, W. T. J.; MacGillavry, H. D.; Alvarez, J.; van Minnen, J. Schwann Cell to Axon Transfer of Ribosomes: Toward a Novel Understanding of the Role of Glia in the Nervous System. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (43), 11024–11029.
- (13) Sotelo, J. R.; Canclini, L.; Kun, A.; Sotelo-Silveira, J. R.; Xu, L.; Wallrabe, H.; Calliari, A.; Rosso, G.; Cal, K.; Mercer, J. A. Myosin-Va-Dependent Cell-To-Cell Transfer of RNA from Schwann Cells to Axons. *PLoS One* **2013**, *8*, No. e61905.
- (14) Lasek, R. J.; Gainer, H.; Barker, J. L. Cell-to-Cell Transfer of Glial Proteins to the Squid Giant Axon: The Glia-Neuron Protein Transfer Hypothesis. *J. Cell Biol.* **1977**, *74*, 501–523.
- (15) Buchheit, T. E.; Tytell, M. Transfer of Molecules from Glia to Axon in the Squid May Be Mediated by Glial Vesicles. *J. Neurobiol.* **1992**, *23*, 217–230.
- (16) Sheller, R. A.; Tytell, M.; Smyers, M.; Bittner, G. D. Glia-to-Axon Communication: Enrichment of Glial Proteins Transferred to the Squid Giant Axon. *J. Neurosci. Res.* **1995**, *41*, 324–334.
- (17) Lopez-Verrilli, M. A.; Court, F. A. Transfer of Vesicles from Schwann Cells to Axons: A Novel Mechanism of Communication in the Peripheral Nervous System. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 205.
- (18) Sotelo-Silveira, J. R.; Holt, C. E. Introduction to the Special Issue on Local Protein Synthesis in Axons. *Dev. Neurobiol.* **2014**, *74* (3), 207–209.
- (19) Twiss, J. L.; Kalinski, A. L.; Sachdeva, R.; Houle, J. D. Intra-Axonal Protein Synthesis - a New Target for Neural Repair? *Neural Regen. Res.* **2016**, *11* (9), 1365–1367.
- (20) Terenzio, M.; Koley, S.; Samra, N.; Rishal, I.; Zhao, Q.; Sahoo, P. K.; Urisman, A.; Marvaldi, L.; Osés-Prieto, J. A.; Forester, C.; Gomes, C.; Kalinski, A. L.; Di Prizio, A.; Doron-Mandel, E.; Perry, R.

L

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00980>  
J. Proteome Res. XXXX, XXX, XXX–XXX

- B.-T.; Koppel, I.; Twiss, J. L.; Burlingame, A. L.; Fainzilber, M. Locally Translated mTOR Controls Axonal Local Translation in Nerve Injury. *Science* **2018**, *359* (6382), 1416–1421.
- (21) Hanz, S.; Perlson, E.; Willis, D.; Zheng, J.-Q.; Massarwa, R.; Huerta, J. J.; Koltzenburg, M.; Kohler, M.; van-Minnen, J.; Twiss, J. L.; Fainzilber, M. Axoplasmic Importins Enable Retrograde Injury Signaling in Lesioned Nerve. *Neuron* **2003**, *40* (6), 1095–1104.
- (22) Perry, R. B.-T.; Doron-Mandel, E.; Iavnilovitch, E.; Rishal, I.; Dagan, S. Y.; Tsoory, M.; Coppola, G.; McDonald, M. K.; Gomes, C.; Geschwind, D. H.; Twiss, J. L.; Yaron, A.; Fainzilber, M. Subcellular Knockout of Importin  $\beta$  Perturbs Axonal Retrograde Signaling. *Neuron* **2012**, *75* (2), 294–305.
- (23) Ben-Yaakov, K.; Fainzilber, M. Retrograde Injury Signaling in Lesioned Axons. *Results Probl. Cell Differ.* **2009**, *48*, 327–338.
- (24) Hanz, S.; Fainzilber, M. Retrograde Signaling in Injured Nerve: The Axon Reaction Revisited. *J. Neurochem.* **2006**, *99* (1), 13–19.
- (25) Michaelevski, I.; Medzhradzky, K. F.; Lynn, A.; Burlingame, A. L.; Fainzilber, M. Axonal Transport Proteomics Reveals Mobilization of Translation Machinery to the Lesion Site in Injured Sciatic Nerve. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9* (5), 976–987.
- (26) Willis, D. E.; van Niekerk, E. A.; Sasaki, Y.; Mesngon, M.; Merianda, T. T.; Williams, G. G.; Kendall, M.; Smith, D. S.; Bassell, G. J.; Twiss, J. L. Extracellular Stimuli Specifically Regulate Localized Levels of Individual Neuronal mRNAs. *J. Cell Biol.* **2007**, *178* (6), 965–980.
- (27) Taylor, A. M.; Berchtold, N. C.; Perreau, V. M.; Tu, C. H.; Li Jeon, N.; Cotman, C. W. Axonal mRNA in Uninjured and Regenerating Cortical Mammalian Axons. *J. Neurosci.* **2009**, *29* (15), 4697–4707.
- (28) Andreassi, C.; Zimmermann, C.; Mitter, R.; Fusco, S.; De Vita, S.; Saiardi, A.; Riccio, A. An NGF-Responsive Element Targets Myo-Inositol Monophosphatase-1 mRNA to Sympathetic Neuron Axons. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13* (3), 291–301.
- (29) Zivraj, K. H.; Tung, Y. C. L.; Piper, M.; Gumy, L.; Fawcett, J. W.; Yeo, G. S. H.; Holt, C. E. Subcellular Profiling Reveals Distinct and Developmentally Regulated Repertoire of Growth Cone mRNAs. *J. Neurosci.* **2010**, *30* (46), 15464–15478.
- (30) Gumy, L. F.; Yeo, G. S. H.; Tung, Y.-C. L.; Zivraj, K. H.; Willis, D.; Coppola, G.; Lam, B. Y. H.; Twiss, J. L.; Holt, C. E.; Fawcett, J. W. Transcriptome Analysis of Embryonic and Adult Sensory Axons Reveals Changes in mRNA Repertoire Localization. *RNA* **2011**, *17* (1), 85–98.
- (31) Cajigas, I. J.; Tushev, G.; Will, T. J.; tom Dieck, S.; Fuerst, N.; Schuman, E. M. The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging. *Neuron* **2012**, *74* (3), 453–466.
- (32) Sasaki, Y.; Gross, C.; Xing, L.; Goshima, Y.; Bassell, G. J. Identification of Axon-Enriched microRNAs Localized to Growth Cones of Cortical Neurons. *Dev. Neurobiol.* **2014**, *74* (3), 397–406.
- (33) Minis, A.; Dahary, D.; Manor, O.; Leshkowitz, D.; Pilpel, Y.; Yaron, A. Subcellular Transcriptomics-Dissection of the mRNA Composition in the Axonal Compartment of Sensory Neurons. *Dev. Neurobiol.* **2014**, *74* (3), 365–381.
- (34) Baleriola, J.; Walker, C. A.; Jean, Y. Y.; Craty, J. F.; Troy, C. M.; Nagy, P. L.; Hengst, U. Axonally Synthesized ATF4 Transmits a Neurodegenerative Signal across Brain Regions. *Cell* **2014**, *158* (5), 1159–1172.
- (35) Saal, L.; Briese, M.; Kneitz, S.; Glinka, M.; Sendtner, M. Subcellular Transcriptome Alterations in a Cell Culture Model of Spinal Muscular Atrophy Point to Widespread Defects in Axonal Growth and Presynaptic Differentiation. *RNA* **2014**, *20*, 1789–1802.
- (36) Briese, M.; Saal, L.; Appenzeller, S.; Moradi, M.; Baluapuri, A.; Sendtner, M. Whole Transcriptome Profiling Reveals the RNA Content of Motor Axons. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (4), No. e33.
- (37) Talaferro, J. M.; Vidaki, M.; Oliveira, R.; Olson, S.; Zhan, L.; Saxena, T.; Wang, E. T.; Graveley, B. R.; Gertler, F. B.; Swanson, M. S.; Burge, C. B. Distal Alternative Last Exons Localize mRNAs to Neural Projections. *Mol. Cell* **2016**, *61* (6), 821–833.
- (38) Rotem, N.; Magen, I.; Ionescu, A.; Gershoni-Emek, N.; Altman, T.; Costa, C. J.; Gradus, T.; Pasmanik-Chor, M.; Willis, D. E.; Bendov, I. Z.; Hornstein, E.; Perlson, E. ALS Along the Axons: Expression of Coding and Noncoding RNA Differs in Axons of ALS Models. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44500.
- (39) Bigler, R. L.; Kamande, J. W.; Dumitru, R.; Niedringhaus, M.; Taylor, A. M. Messenger RNAs Localized to Distal Projections of Human Stem Cell Derived Neurons. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 611.
- (40) Tóth, E. N.; Lohith, A.; Mondal, M.; Guo, J.; Fukamizu, A.; Pourmand, N. Single-Cell Nanobiopsy Reveals Compartmentalization of mRNAs within Neuronal Cells. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293* (13), 4940–4951.
- (41) Mathur, C.; Johnson, K. R.; Tong, B. A.; Miranda, P.; Srikumar, D.; Basilio, D.; Latorre, R.; Bezanilla, F.; Holmgren, M. Demonstration of Ion Channel Synthesis by Isolated Squid Giant Axon Provides Functional Evidence for Localized Axonal Membrane Protein Translation. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 2207.
- (42) Farias, J.; Holt, C. E.; Sotelo, J. R.; Sotelo-Silveira, J. R. Axon Microdissection and Transcriptome Profiling Reveals the *In Vivo* RNA Content of Fully Differentiated Myelinated Motor Axons. *RNA* **2020**, *26*, 595–612.
- (43) Chuang, C.-F.; King, C.-E.; Ho, B.-W.; Chien, K.-Y.; Chang, Y.-C. Unbiased Proteomic Study of the Axons of Cultured Rat Cortical Neurons. *J. Proteome Res.* **2018**, *17* (5), 1953–1966.
- (44) Cagnetta, R.; Frese, C. K.; Shigeoka, T.; Krijgsveld, J.; Holt, C. E. Rapid Cue-Specific Remodeling of the Nascent Axonal Proteome. *Neuron* **2018**, *99* (1), 29–46.
- (45) Koppel, I.; Fainzilber, M. Omics Approaches for Subcellular Translation Studies. *Mol. Omics* **2018**, *14* (6), 380–388.
- (46) Perlson, E.; Hanz, S.; Ben-Yaakov, K.; Segal-Ruder, Y.; Seger, R.; Fainzilber, M. Vimentin-Dependent Spatial Translocation of an Activated MAP Kinase in Injured Nerve. *Neuron* **2005**, *45* (5), 715–726.
- (47) Rishal, I.; Michaelevski, I.; Rozenbaum, M.; Shinder, V.; Medzhradzky, K. F.; Burlingame, A. L.; Fainzilber, M. Axoplasm Isolation from Peripheral Nerve. *Dev. Neurobiol.* **2010**, *70* (2), 126–133.
- (48) Giuditta, A.; Dettbarn, W. D.; Brzin, M. Protein Synthesis in the Isolated Giant Axon of the Squid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *59* (4), 1284–1287.
- (49) Benech, C.; Sotelo, J. R., Jr.; Menéndez, J.; Correa-Luna, R. Autoradiographic Study of RNA and Protein Synthesis in Sectioned Peripheral Nerves. *Exp. Neurol.* **1982**, *76* (1), 72–82.
- (50) Alvarez, J.; Benech, C. R. Axoplasmic Incorporation of Amino Acids in a Myelinated Fiber Exceeds that of Its Soma: A Radioautographic Study. *Exp. Neurol.* **1983**, *82*, 25–42.
- (51) Sotelo, J. R.; Benech, C. R.; Kun, A. Local Radiolabeling of the 68 kDa Neurofilament Protein in Rat Sciatic Nerves. *Neurosci. Lett.* **1992**, *144* (1–2), 174–176.
- (52) Koenig, E.; Giuditta, A. Protein-Synthesizing Machinery in the Axon Compartment. *Neuroscience* **1999**, *89* (1), 5–15.
- (53) Sotelo-Silveira, J. R.; Calliari, A.; Kun, A.; Benech, J. C.; Sanguinetti, C.; Chalar, C.; Sotelo, J. R. Neurofilament mRNAs Are Present and Translated in the Normal and Severed Sciatic Nerve. *J. Neurosci. Res.* **2000**, *62* (1), 65–74.
- (54) Kun, A.; Otero, L.; Sotelo-Silveira, J. R.; Sotelo, J. R. Ribosomal Distributions in Axons of Mammalian Myelinated Fibers. *J. Neurosci. Res.* **2007**, *85* (10), 2087–2098.
- (55) Biever, A.; Glock, C.; Tushev, G.; Ciirdaeva, E.; Dalmay, T.; Langer, J. D.; Schuman, E. M. Monosomes Actively Translate Synaptic mRNAs in Neuronal Processes. *Science* **2020**, *367* (6477), eaay4991.
- (56) Canclini, L.; Farias, J.; Di Paolo, A.; Sotelo-Silveira, J. R.; Folle, G.; Kun, A.; Sotelo, J. R. Association of Microtubules and Axonal RNA Transferred from Myelinating Schwann Cells in Rat Sciatic Nerve. *PLoS One* **2020**, *15* (5), No. e0233651.
- (57) Di Paolo, A.; Eastman, G.; Mesquita-Ribeiro, R.; Farias, J.; Macklin, A.; Kislinger, T.; Colburn, N.; Munroe, D.; Sotelo Sosa, J. R.; Dajas-Bailador, F.; Sotelo-Silveira, J. R. PDCD4 Regulates Axonal



Growth by Translational Repression of Neurite Growth-Related Genes and Is Modulated during Nerve Injury Responses. *RNA* **2020**, *26* (11), 1637–1653.

(58) Kislinger, T.; Rahman, K.; Rádulović, D.; Cox, B.; Rossant, J.; Emili, A. PRISM, a Generic Large Scale Proteomic Investigation Strategy for Mammals. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2* (2), 96–106.

(59) Cox, J.; Hein, M. Y.; Lubner, C. A.; Paron, I.; Nagaraj, N.; Mann, M. Accurate Proteome-Wide Label-Free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13* (9), 2513–2526.

(60) Wójcicki, E. E.; Lechman, E. R.; Hermans, K. G.; Schoof, E. M.; Wienholds, E.; Isserlin, R.; van Veelen, P. A.; Broekhuis, M. J. C.; Janssen, G. M. C.; Trotman-Dickenson, A.; Dobson, S. M.; Krivdova, G.; Elzinga, J.; Kennedy, J.; Gan, O. I.; Sinha, A.; Ignatchenko, V.; Kislinger, T.; Dethmers-Ausema, B.; Weersing, E.; Alemdehy, M. F.; de Looper, H. W. J.; Bader, G. D.; Ritsema, M.; Erkeland, S. J.; Bystrykh, L. V.; Dick, J. E.; de Haan, G. Ectopic miR-125a Expression Induces Long-Term Repopulating Stem Cell Capacity in Mouse and Human Hematopoietic Progenitors. *Cell Stem Cell* **2016**, *19* (3), 383–396.

(61) Tyanova, S.; Cox, J. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1711*, 133–148.

(62) Ignatchenko, V.; Ignatchenko, A.; Sinha, A.; Boutros, P. C.; Kislinger, T. VennD1S: A JavaFX-Based Venn and Euler Diagram Software to Generate Publication Quality Figures. *Proteomics* **2015**, *15* (7), 1239–1244.

(63) Liu, Z.; Jin, Y.-Q.; Chen, L.; Wang, Y.; Yang, X.; Cheng, J.; Wu, W.; Qi, Z.; Shen, Z. Specific Marker Expression and Cell State of Schwann Cells during Culture in Vitro. *PLoS One* **2015**, *10* (4), e0123278.

(64) Donnelly, C. J.; Park, M.; Spillane, M.; Yoo, S.; Pacheco, A.; Gomes, C.; Vuppalachchi, D.; McDonald, M.; Kim, H. H.; Merienda, T. T.; Gallo, G.; Twiss, J. L. Axonally Synthesized  $\beta$ -Actin and GAP-43 Proteins Support Distinct Modes of Axonal Growth. *J. Neurosci.* **2013**, *33* (8), 3311–3322.

(65) Koenig, E.; Martin, R. Cortical Plaque-like Structures Identify Ribosome-Containing Domains in the Mauthner Cell Axon. *J. Neurosci.* **1996**, *16* (4), 1400–1411.

(66) Koenig, E.; Martin, R.; Titmus, M.; Sotelo-Silveira, J. R. Cryptic Peripheral Ribosomal Domains Distributed Intermittently along Mammalian Myelinated Axons. *J. Neurosci.* **2000**, *20* (22), 8390–8400.

(67) Sotelo-Silveira, J. R.; Calliari, A.; Cárdenas, M.; Koenig, E.; Sotelo, J. R. Myosin Va and Kinesin II Motor Proteins Are Concentrated in Ribosomal Domains (periaxoplasmic Ribosomal Plaques) of Myelinated Axons. *J. Neurobiol.* **2004**, *60* (2), 187–196.

(68) Sotelo-Silveira, J. R.; Calliari, A.; Kun, A.; Koenig, E.; Sotelo, J. R. RNA Trafficking in Axons. *Traffic* **2006**, *7*, 508–515.

(69) Sotelo-Silveira, J.; Crispino, M.; Puppo, A.; Sotelo, J. R.; Koenig, E. 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.* **2008**, *104* (2), 545–557.

(70) Calliari, A.; Farias, J.; Puppo, A.; Canclini, L.; Mercer, J. A.; Munroe, D.; Sotelo, J. R.; Sotelo-Silveira, J. R. Myosin Va Associates with mRNA in Ribonucleoprotein Particles Present in Myelinated Peripheral Axons and in the Central Nervous System. *Dev. Neurobiol.* **2014**, *74* (3), 382–396.

(71) Hadzic, A. *Textbook of Regional Anesthesia and Acute Pain Management*, 2nd ed.; McGraw Hill Professional, 2009; Part 2, Section 1, Chapter 4.

(72) Cheng, H.; Jiang, X.; Han, X. Alterations in Lipid Homeostasis of Mouse Dorsal Root Ganglia Induced by Apolipoprotein E Deficiency: A Shotgun Lipidomics Study. *J. Neurochem.* **2007**, *101* (1), 57–76.

(73) Naziroglu, M.; Özgül, C.; Çiğ, B.; Doğan, S.; Uğur, A. C. Glutathione Modulates Ca<sup>2+</sup> Influx and Oxidative Toxicity through

TRPM2 Channel in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Membr. Biol.* **2011**, *242* (3), 109–118.

(74) Zhao, J.; Wang, Y.; Xu, H.; Fu, Y.; Qian, T.; Bo, D.; Lu, Y.-X.; Xiong, Y.; Wan, J.; Zhang, X.; Dong, Q.; Chen, X.-J. Dync1h1 Mutation Causes Proprioceptive Sensory Neuron Loss and Impaired Retrograde Axonal Transport of Dorsal Root Ganglion Neurons. *CNS Neurosci. Ther.* **2016**, *22* (7), 593–601.

(75) He, K.; Sakai, T.; Tsukasaki, Y.; Watanabe, T. M.; Ikebe, M. Myosin X Is Recruited to Nascent Focal Adhesions at the Leading Edge and Induces Multi-Cycle Filopodial Elongation. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 13685–13696.

(76) He, K.; Sakai, T.; Watanabe, T.; Ikebe, M. Myosin X Is Recruited to Focal Adhesion and Induces Filopodia Initiation. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 179a.

(77) Wool, L. G.; Chan, Y.-L.; Glück, A. Structure and Evolution of Mammalian Ribosomal Proteins. *Biochem. Cell Biol.* **1995**, *73*, 933–947.

(78) Melemedjian, O. K.; Yassine, H. N.; Shy, A.; Price, T. J. Proteomic and Functional Annotation Analysis of Injured Peripheral Nerves Reveals ApoE as a Protein Upregulated by Injury That Is Modulated by Metformin Treatment. *Mol. Pain* **2013**, *9*, 14.

(79) Rozenbaum, M.; Rajman, M.; Rishal, I.; Koppel, I.; Koley, S.; Medzhradzky, K. P.; Oses-Prieto, J. A.; Kawaguchi, R.; Amieux, P. S.; Burlingame, A. L.; Coppola, G.; Fainzilber, M. Translational Regulation in Neuronal Injury and Axon Regrowth. *eNeuro* **2018**, *5* (2), ENEURO.0276-17.2018.

(80) Mandal, A.; Drerup, C. M. Axonal Transport and Mitochondrial Function in Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 373.

(81) Amri, M.; Hollenbeck, P. J. Mitochondrial Biogenesis in the Axons of Vertebrate Peripheral Neurons. *Dev. Neurobiol.* **2008**, *68* (11), 1348–1361.

(82) Dun, X.-P.; Parkinson, D. B. Role of Netrin-1 Signaling in Nerve Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (3), 491–513.

(83) Madison, R. D.; Zomorodi, A.; Robinson, G. A. Netrin-1 and Peripheral Nerve Regeneration in the Adult Rat. *Exp. Neurol.* **2000**, *161* (2), 563–570.

(84) Dun, X.-P.; Parkinson, D. B. Classic Axon Guidance Molecules Control Correct Nerve Bridge Tissue Formation and Precise Axon Regeneration. *Neural Regen. Res.* **2020**, *15* (1), 6–9.

(85) Serafini, T.; Colamarino, S. A.; Leonardo, E. D.; Wang, H.; Beddington, R.; Skarnes, W. C.; Tessier-Lavigne, M. Netrin-1 Is Required for Commissural Axon Guidance in the Developing Vertebrate Nervous System. *Cell* **1996**, *87* (6), 1001–1014.

(86) Matsumoto, H.; Nagashima, M. Shift in the Function of Netrin-1 from Axon Outgrowth to Axon Branching in Developing Cerebral Cortical Neurons. *BMC Neurosci.* **2017**, *18* (1), 74.

(87) Jaworski, D. M.; Soloway, P.; Caterina, J.; Falls, W. A. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2)-Deficient Mice Display Motor Deficits. *J. Neurobiol.* **2006**, *66* (1), 82–94.

(88) Pérez-Martínez, L.; Jaworski, D. M. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Promotes Neuronal Differentiation by Acting as an Anti-Mitogenic Signal. *J. Neurosci.* **2005**, *25* (20), 4917–4929.

(89) Miller, C. M.; Page-McCaw, A.; Broihier, H. T. Matrix Metalloproteinases Promote Motor Axon Fasciculation in the *Drosophila* Embryo. *Development* **2007**, *135* (1), 95–109.

(90) Wayman, G. A.; Kaeche, S.; Grant, W. F.; Davare, M.; Impey, S.; Tokumitsu, H.; Nozaki, N.; Banker, G.; Soderling, T. R. Regulation of Axonal Extension and Growth Cone Motility by Calmodulin-Dependent Protein Kinase I. *J. Neurosci.* **2004**, *24* (15), 3786–3794.

(91) Xi, F.; Xu, R.-J.; Xu, J.-H.; Ma, J.-J.; Wang, W.-H.; Wang, F.; Ma, Y.-X.; Qi, S.-B.; Zhang, H.-C.; Zhang, H.-N.; Qiu, X.-Z.; Chen, J.-Q.; Li, B.; Liu, C.-M.; Yang, H.-L.; Meng, B.; Sajjilafu. Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Regulates Mammalian Axon Growth by Affecting F-Actin Length in Growth Cone. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234* (12), 23053–23065.

(92) Bott, C. J.; Johnson, C. G.; Yap, C. C.; Dwyer, N. D.; Litwa, K. A.; Winckler, B. Nestin in Immature Embryonic Neurons Affects

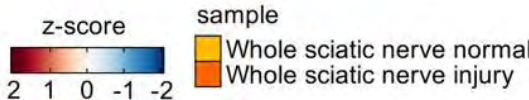
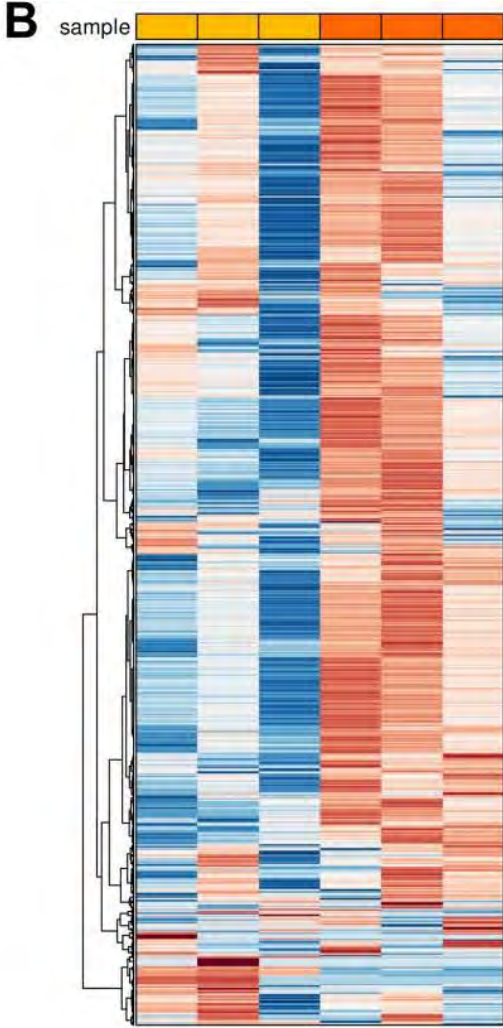
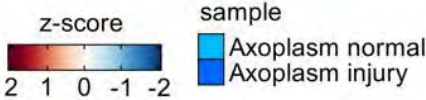
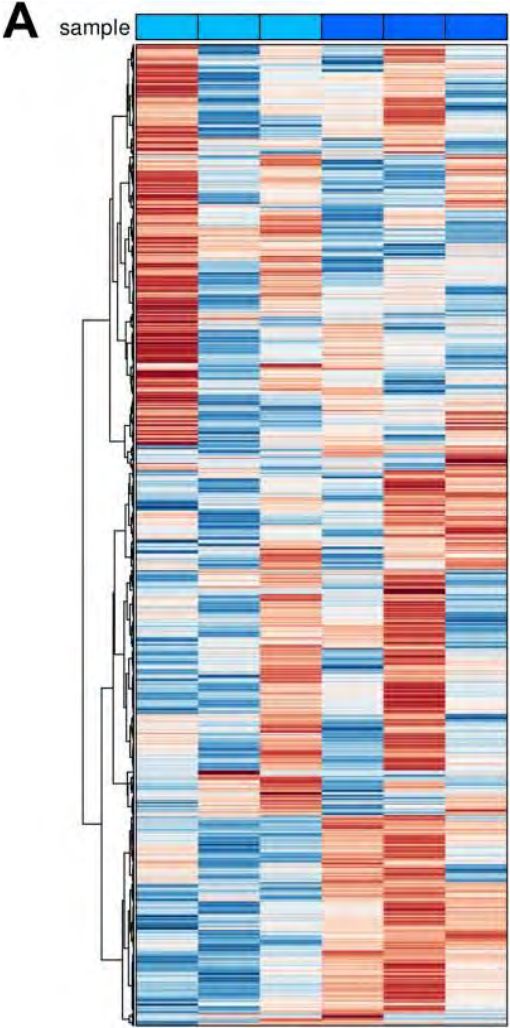
N

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00980>  
*J. Proteome Res.* XXXX, XXX, XXX–XXX

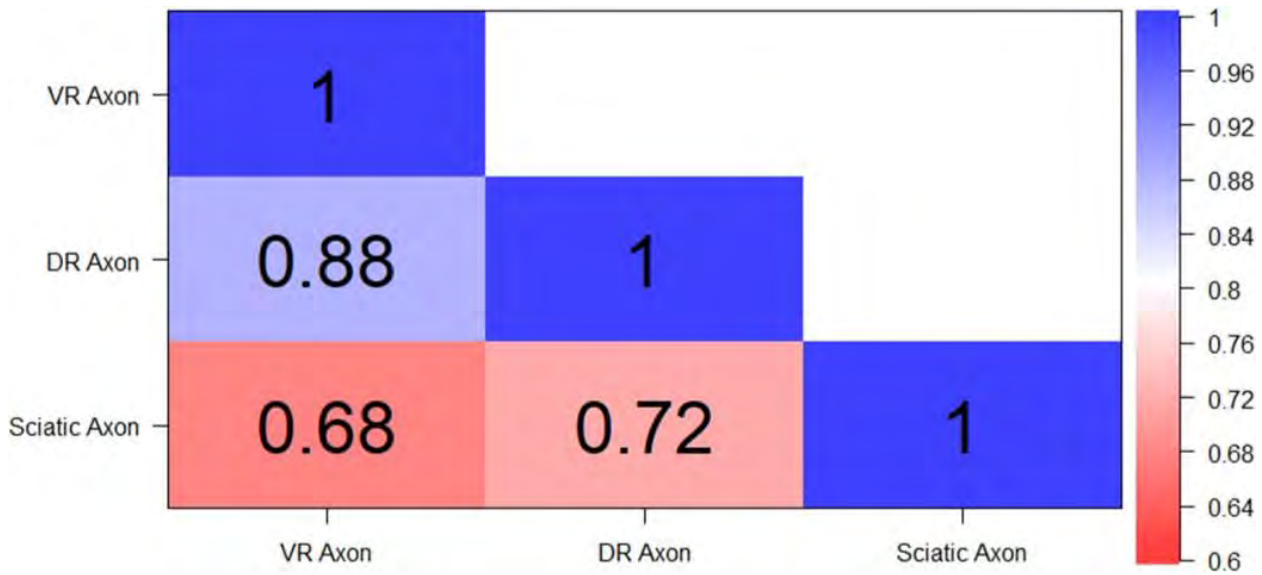
- Axon Growth Cone Morphology and Semaphorin3a Sensitivity. *Mol. Biol. Cell* **2019**, *30* (10), 1214–1229.
- (93) Mii, S.; Uehara, F.; Yano, S.; Tran, B.; Miwa, S.; Hiroshima, Y.; Amoh, Y.; Katsuoka, K.; Hoffman, R. M. Nestin-Expressing Stem Cells Promote Nerve Growth in Long-Term 3-Dimensional Gelfoam®-Supported Histoculture. *PLoS One* **2013**, *8* (6), No. e67153.
- (94) Neubauer, K.; Zieger, B. The Mammalian Septin Interactome. *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *5*, 3.
- (95) Ageta-Ishihara, N.; Miyata, T.; Ohshima, C.; Watanabe, M.; Sato, Y.; Hamamura, Y.; Higashiyama, T.; Mazitschek, R.; Bito, H.; Kinoshita, M. Septins Promote Dendrite and Axon Development by Negatively Regulating Microtubule Stability via HDAC6-Mediated Deacetylation. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2532.
- (96) Hu, J.; Bai, X.; Bowen, J. R.; Dolat, L.; Korobova, F.; Yu, W.; Baas, P. W.; Svitkina, T.; Gallo, G.; Spiliotis, E. T. Septin-Driven Coordination of Actin and Microtubule Remodeling Regulates the Collateral Branching of Axons. *Curr. Biol.* **2012**, *22* (12), 1109–1115.
- (97) Roth, A. D.; Liazoghli, D.; Perez De Arce, F.; Colman, D. R. Septin 7: Actin Cross-Organization Is Required for Axonal Association of Schwann Cells. *Biol. Res.* **2013**, *46* (3), 243–249.
- (98) Hirayama, T.; Tarusawa, E.; Yoshimura, Y.; Galjart, N.; Yagi, T. CTCF Is Required for Neural Development and Stochastic Expression of Clustered Pcdh Genes in Neurons. *Cell Rep.* **2012**, *2* (2), 345–357.
- (99) Müller, K.; Schnatz, A.; Schillner, M.; Woertge, S.; Müller, C.; von Graevenitz, I.; Waisman, A.; van Minnen, J.; Vogelaar, C. F. A Predominantly Glial Origin of Axonal Ribosomes after Nerve Injury. *Glia* **2018**, *66* (8), 1591–1610.
- (100) Shigeoka, T.; Koppers, M.; Wong, H. H.-W.; Lin, J. Q.; Cagnetta, R.; Dwivedy, A.; de Freitas Nascimento, J.; van Tartwijk, P. W.; Strohl, F.; Cioni, J.-M.; Schaeffer, J.; Carrington, M.; Kaminski, C. F.; Jung, H.; Harris, W. A.; Holt, C. E. On-Site Ribosome Remodeling by Locally Synthesized Ribosomal Proteins in Axons. *Cell Rep.* **2019**, *29* (11), 3605–3619.e10.
- (101) Boyles, J. K.; Zoellner, C. D.; Anderson, L. J.; Kosik, L. M.; Pitas, R. E.; Weisgraber, K. H.; Hui, D. Y.; Mahley, R. W.; Gebicke-Haerter, P. J.; Ignatius, M. J. A Role for Apolipoprotein E, Apolipoprotein A-I, and Low Density Lipoprotein Receptors in Cholesterol Transport during Regeneration and Remyelination of the Rat Sciatic Nerve. *J. Clin. Invest.* **1989**, *83* (3), 1015–1031.
- (102) Wang, S.; Zhang, Z.; Almenar-Queralto, A.; Leem, J.; DerMardirossian, C.; Roth, D. M.; Patel, P. M.; Patel, H. H.; Head, B. P. Caveolin-1 Phosphorylation Is Essential for Axonal Growth of Human Neurons Derived From iPSCs. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 324.
- (103) Shikanai, M.; Nishimura, Y. V.; Sakurai, M.; Nabeshima, Y.-I.; Yuzaki, M.; Kawachi, T. Caveolin-1 Promotes Early Neuronal Maturation via Caveolae-Independent Trafficking of N-Cadherin and L1. *iScience* **2018**, *7*, 53–67.
- (104) Thelen, M. P.; Kye, M. J. The Role of RNA Binding Proteins for Local mRNA Translation: Implications in Neurological Disorders. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *6*, 161.
- (105) Hörnberg, H.; Holt, C. RNA-Binding Proteins and Translational Regulation in Axons and Growth Cones. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*, 81.
- (106) Gerstberger, S.; Hafner, M.; Tuschl, T. A Census of Human RNA-Binding Proteins. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15* (12), 829–845.
- (107) Landgraf, P.; Antileo, E. R.; Schuman, E. M.; Dieterich, D. C. BONCAT: Metabolic Labeling, Click Chemistry, and Affinity Purification of Newly Synthesized Proteomes. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1266*, 199–215.
- (108) tom Dieck, S.; Müller, A.; Nehring, A.; Hinz, F. I.; Bartnik, I.; Schuman, E. M.; Dieterich, D. C. Metabolic Labeling with Noncanonical Amino Acids and Visualization by Chemoselective Fluorescent Tagging. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2012**, *56* (1), 7.11.1–7.11.29.
- (109) tom Dieck, S.; Kochen, L.; Hanus, C.; Heumüller, M.; Bartnik, I.; Nassim-Assit, B.; Merk, K.; Mosler, T.; Garg, S.; Bunse, S.; Tirrell,
- D. A.; Schuman, E. M. Direct Visualization of Newly Synthesized Target Proteins in Situ. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 411–414.
- (110) Willis, D.; Li, K. W.; Zheng, J.-Q.; Chang, J. H.; Smit, A. B.; Kelly, T.; Merianda, T. T.; Sylvester, J.; van Minnen, J.; Twiss, J. L. Differential Transport and Local Translation of Cytoskeletal, Injury-Response, and Neurodegeneration Protein mRNAs in Axons. *J. Neurosci.* **2005**, *25* (4), 778–791.
- (111) Crispino, M.; Capano, C. P.; Kaplan, B. B.; Giuditta, A. Neurofilament Proteins Are Synthesized in Nerve Endings from Squid Brain. *J. Neurochem.* **1993**, *61* (3), 1144–1146.
- (112) Gainer, H.; House, S.; Kim, D. S.; Chin, H.; Pant, H. C. Squid Giant Axon Contains Neurofilament Protein mRNA but Does Not Synthesize Neurofilament Proteins. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2017**, *37*, 475–486.
- (113) Eng, H.; Lund, K.; Campenot, R. B. Synthesis of Beta-Tubulin, Actin, and Other Proteins in Axons of Sympathetic Neurons in Compartmented Cultures. *J. Neurosci.* **1999**, *19* (1), 1–9.

Supplemental Figures and Figure Legends.

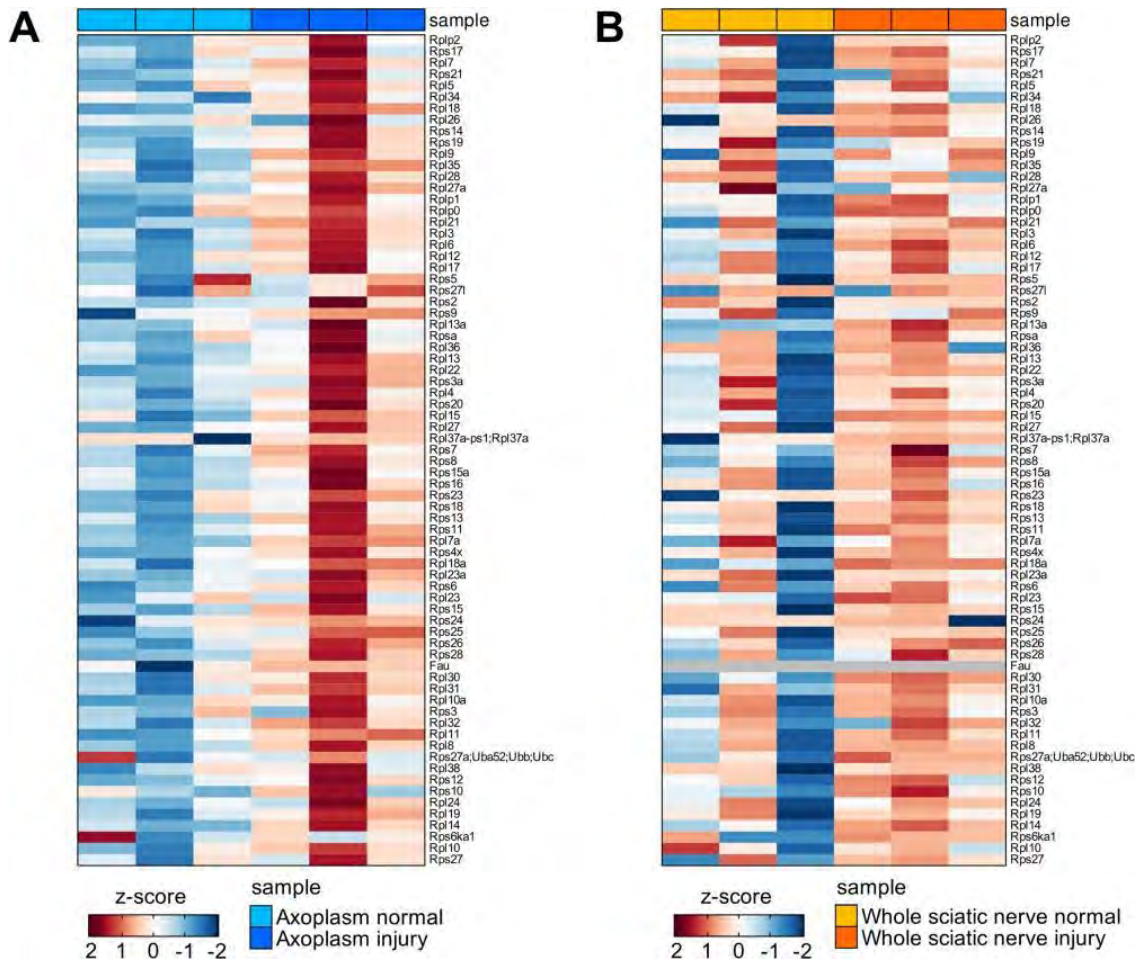
Supplemental Figure 1.



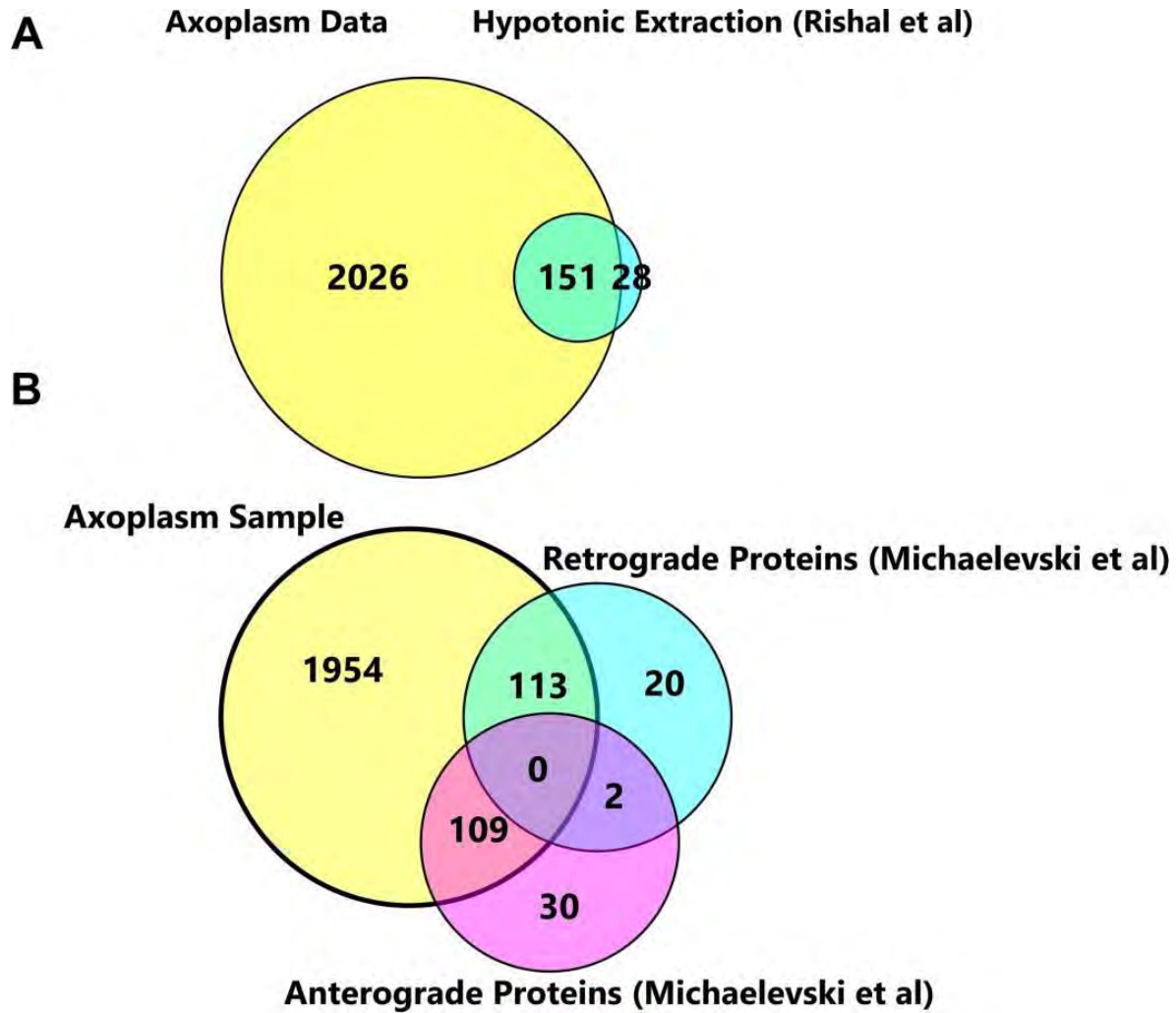
Supplemental Figure 2.



Supplemental Figure 3.



Supplemental Figure 4.



Supplementary Figure Legends.

Figure S1. Heatmaps of axoplasm replicates (A) and whole nerve sample replicates (B) plotted separately.

Figure S2. Pearson correlation coefficient for axon samples comparison.

Figure S3. (A) Heatmap for the 73 ribosomal proteins detected in the axoplasm samples at normal and injury conditions expressed in *IBAQ* values. (B) The same as (A) but for whole sciatic nerve samples.

Figure S4. Overlap between the axoplasm sample and the proteomes detected by extruded axoplasm extraction in previous articles.

### 6.3.3) Resultados Capítulo III.

#### 6.3.3.1. El protocolo para extracción de material axoplásmico muestra un enriquecimiento en la detección de proteínas axonales y una disminución de las mielínicas.

El material axoplásmico obtenido de un único nervio ciático por réplica fue suficiente para detectar un número mayor de grupos de proteínas respecto a trabajos anteriores empleando estrategias similares (Michaevlevski *et al.*, 2010a). Detectamos un promedio de 2087 grupos de proteínas axonales y el coeficiente de Spearman entre réplicas fue de al menos 0.80 (Figura 1C del artículo, página 126). Esto significa un aumento en la capacidad de detección respecto a estudios previos también desarrollados en nervio ciático en los cuales la variabilidad entre réplicas fue elevada debido a la necesidad de utilizar el material axoplásmico correspondiente a 100 animales por réplica para obtener suficiente cantidad de proteína total (Michaevlevski *et al.*, 2010a). Por otra parte, dado que en nuestro análisis contamos con el nervio entero contralateral del mismo animal sometido al mismo tratamiento (con o sin lesión), es posible analizar qué proteínas están enriquecidas en los axones con mayor confianza estadística producto de una disminución en las fuentes de variabilidad inherentes al uso de un pool de material axoplásmico proveniente de varios animales.

En relación a la identidad de los grupos de proteínas detectadas, existe un enriquecimiento en aquellas relacionadas con funciones axonales y una disminución en las proteínas mielínicas (Figura 1E del artículo, página 126) y también de aquellas relacionadas con el citoplasma de las células de Schwann. Sin embargo, es importante destacar que, si bien otras proteínas características de axones tales como las subunidades liviana, mediana y pesada de los neurofilamentos no se encontraron enriquecidos en las muestras axonales, sí están entre las primeras proteínas detectadas en las muestras axonales ordenados por el ranking de intensidad de detección por *IBAQ*.

### **6.3.3.2. El método de extracción de axoplasmas en buffer hipotónico puede ser utilizado en diferentes grupos de nervios periféricos.**

Axones de diversos tipos neuronales presentan variaciones en las proteínas que contienen y ello influye en sus funciones y/o respuestas a estímulos, por lo cual conocer sus proteomas es un punto importante, por ejemplo para entender el desarrollo de patologías neurológicas. En este contexto decidimos testear nuestro protocolo de proteómica axonal no solo para el nervio ciático sino también para las raíces ventral y dorsal de las vértebras L5 y L6, las cuales corresponden a los segmentos proximales motor y sensorial que dan origen a gran parte del nervio ciático en la rata (ver esquema en Figura 2A del artículo, página 128). Para estos tejidos obtuvimos proteomas más pequeños respecto a los del nervio ciático, tanto para las muestras de axoplasma como para las de tejido entero. Este resultado podría explicarse en parte por problemas técnicos durante la extracción de las proteínas, especialmente para la obtención de proteínas presentes en regiones del tejido con alto contenido lipídico que son de difícil acceso al no utilizar detergentes en el buffer de lisis. Para el caso de los nervios ciáticos, realizamos un paso previo de retirar el epineuro lo cual disminuye la presencia de colágeno y otras estructuras que podrían dificultar la obtención de proteínas. Esta extracción no es posible en las raíces ventrales y dorsales ya que no presentan una organización fascicular. Por ello, a efectos de poder comparar los proteomas de raíces ventral y dorsal con los de nervio ciático, analizamos únicamente las primeras 750 proteínas detectadas para todas las muestras rankeadas por valor de intensidad *IBAQ*. Un 75% del proteoma detectado para cada nervio entero corresponde a grupos de proteínas comunes (Figura 2B del artículo, página 128) y un 65% para los axoplasmas (Figura 2C de artículo) indicando que los tejidos son similares, pero no idénticos. Los gráficos de correlación entre muestra pareadas muestran una mayor similitud entre los proteomas correspondientes a las raíces ventral y dorsal que los de éstos últimos respecto al nervio ciático, tanto para el tejido entero como para los axoplasmas (Figura 2C-2E del artículo). Al analizar las proteínas significativamente enriquecidas entre los axoplasmas de raíz ventral o dorsal, sólo se encontraron 35 proteínas para la raíz dorsal y 14 en la ventral, por lo cual ambos tipos axonales son muy similares y homogéneos en cuanto a las proteínas que presentan.

### **6.3.3.3. El proteoma axonal del nervio ciático está enriquecido con proteínas relacionadas con el citoesqueleto y proteínas ribosomales que aumentan tras la injuria.**

Al analizar las listas de proteínas de axoplasma y tejido entero para cada condición se observa que dentro de las primeras 400 detectadas con valores de intensidad más altos (ordenadas por ranking de *IBAQ*) las categorías de ontología sobrerrepresentadas en los axones incluyen aquellas relacionadas con el ensamblado y biogénesis de ribosomas, regulación de la traducción y ensamblaje del citoesqueleto (Figura 3 del artículo, página 129). Un dato muy relevante es que detectamos 72 proteínas ribosomales en el proteoma axonal. De éstas, 48 están en la lista de las 400 más expresadas en axón y sólo 7 en la misma lista, pero del ciático entero. Estos números aumentan a 61 y 15 respectivamente en condiciones de injuria.

Paralelamente, los análisis de enriquecimiento entre los grupos de proteínas axonales respecto al tejido entero revela una lista de 330 proteínas significativamente enriquecidas en axón en condición basal y 345 en condiciones de injuria (Figura 4A-4B del artículo, página 130). Además de repetirse la sobrerrepresentación de procesos biológicos relacionados con traducción, surgen otros tales como el ensamblado de la sinapsis neuronal y de gránulos de ARN, diferenciación neuronal y procesos asociados con el transporte en el aparato de Golgi. Además de estas categorías, el análisis en axones sometidos a injuria respecto al tejido entero en la misma condición muestra un enriquecimiento en proteínas relacionadas con la localización de gránulos de estrés y un enriquecimiento en varias histonas (Figura 4E-4F). A pesar de las funciones canónicas en el núcleo de éstas últimas, estudios previos ya las han reportado en axón tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (Michaelevski *et al.*, 2010a; Rishal *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2013; Chuang *et al.*, 2018).

Como forma de evaluar únicamente el efecto que tiene la injuria sobre nuestro sistema, también comparamos los proteomas axonales y de tejido entero entre sí en condición basal y post lesión. Un primer dato interesante es que sólo 34 proteínas están enriquecidas tras la injuria en tejidos enteros (Figura 4C del artículo, página 130) y 143 surgen de la comparativa axonal (Figura 4D del artículo, página 130), lo que sugiere que en las primeras horas post lesión es en el axón donde se producen la mayoría de los cambios. El análisis de ontología



de este grupo de proteínas apoya esta hipótesis ya que se distinguen procesos biológicos tales como respuesta a la cicatrización, respuesta inmune, inflamatoria y apoptosis. Otro dato interesante es que, de la mencionada lista de 143 proteínas, 75 se encuentran específicamente reguladas por la lesión a nivel axonal ya que no están enriquecidas en el tejido entero lesionado respecto al normal. Estas proteínas incluyen motores moleculares de transporte axonal de la familia de las miosinas, el factor represor de la transcripción Ctcf reportado como regulador del desarrollo neuronal (Finger *et al.*, 2003) y 9 proteínas ribosomales.

Analizando específicamente las proteínas ribosomales detectadas, vemos que éstas aumentan sus niveles de detección tras el evento de injuria (Figura 5A del artículo, página 131) pero sorpresivamente solamente a nivel axonal ya que este aumento no es tan claro en la comparativa entre los nervios ciáticos enteros (Figura 5B del artículo). Además, estos cambios son específicos de ese grupo de proteínas ya que los análisis de los proteomas a nivel global no muestran este nivel de variación en las señales de detección (Figura 5C del artículo).

#### **6.3.3.4. Los grupos de proteínas detectados en axón han sido previamente reportados en proteomas axonales *in vitro*.**

Dado la escasez de reportes de proteómica axonal, y como forma adicional de validar los datos obtenidos de muestras *in vivo*, comparamos la lista de grupos de proteínas detectados en axón con los reportados en axones *in vitro* de ratón correspondiente a neuronas diferenciadas de células pluripotentes conocidas como “*iNeurons*” (Zappulo *et al.*, 2017); neuronas corticales de ratas adultas (Chuang *et al.*, 2018) y RGC de *Xenopus Laevis* (Cagnetta *et al.*, 2018), utilizando la conversión a genes ortólogos de humano. Este análisis revela que un 18% de nuestro set de datos, lo cual corresponde a unas 356 proteínas, son detectables en todas las listas a pesar del origen diferente de las muestras, tanto a nivel de las especies como del tipo neuronal analizado. Por esta razón es esperable que el número anterior pudiera ser bajo. Sin embargo, el 85% de nuestro set, unas 1706 proteínas, son detectadas en al menos uno de los otros sets de datos y solo un 15% es único de nuestro proteoma axonal *in vivo*. Además, el análisis de las proteínas ribosomales muestra que todas

ellas son detectadas en al menos uno de los datasets de proteomas axonales *in vitro*. Todos estos resultados se resumen en la Figura 6 del artículo (página 132).

Por otra parte, al comparar nuestro proteoma axonal con las proteínas reportadas por Fainzilber y colaboradores en axones del nervio ciático *in vivo* muestran un 84 % de coincidencias entre ambos sets de datos (Figura Suplementaria 4, página 141). Un estudio posterior desarrollado por los mismos autores reporta dos listas de proteínas relacionadas con el transporte retrógrado y anterógrado, y en este caso nosotros detectamos coincidencias de 83% para el primer set de datos y 77% para el segundo.

#### **6.3.3.5. Se detectaron 42 proteínas neo-sintetizadas en axones mediante un protocolo de *BONCAT* combinado con proteómica cuantitativa basada en el sistema *LFQ*.**

Hasta el momento los protocolos de proteómica que han sido exitosos en reportar las proteínas que son neo-sintetizadas en axón han sido muy pocos y desarrollados únicamente en modelos *in vitro* (Zappulo *et al.*, 2017; Cagnetta *et al.*, 2018). En este contexto es que decidimos combinar el protocolo de extruido de axoplasmas con el marcado de proteínas mediante el aminoácido ortólogo *AHA*, seguido de una purificación de las proteínas que incorporan el mismo en un pulso de 4 horas (ver materiales y métodos del artículo, sección “*BONCAT Protocol*”, página 125) para revelar las proteínas con tasa traduccional más alta en axones maduros *in vivo*. Detectamos una lista de 42 proteínas en las muestras incubadas con *AHA*, de las cuales 28 no son detectables en el control sin *AHA* y el resto lo hacen con un fold change significativamente menor. La Tabla 1 del artículo resume esta información. En la misma están incluidos la subunidad menor y mediana de los neurofilamentos (NefL y NefM) lo cual valida los resultados obtenidos en el Capítulo I donde evidenciamos la neosíntesis de NEFI en axones de nervio ciático en estado basal y de regeneración (Sección 6.2.2. página 66).

#### **6.3.4) Discusión Capítulo III.**

Los proteomas axonales reportados en la bibliografía son pocos hasta el momento y gran parte de ellos desarrollados en modelos *in vitro* y principalmente en etapas del desarrollo

embrionario, por lo cual estos análisis no necesariamente revelan todas las proteínas que están presentes en axones de animales maduros. Este último punto es importante ya que los axones cultivados *in vitro* presentan características de axones regenerantes y carecen de interacciones con las células gliales, por lo cual no reflejan todas las propiedades de los axones *in vivo* de animales adultos (Sotelo *et al.*, 2014; Al-Ali *et al.*, 2017). En este contexto, el protocolo de extracción de axoplasma a partir de nervios periféricos de animales adultos reportado por Fainzilber y colaboradores es un paso importante ya que es compatible con ensayos de proteómica y otros protocolos de biología molecular. Sin embargo, el proteoma axonal publicado utilizando esta metodología presentaba problemas en cuanto a las coincidencias detectadas entre réplicas biológicas (con valores de correlaciones inferiores a 0.20 en los triplicados biológicos), el bajo número de grupos de proteínas detectadas (942) y la necesidad de utilizar un gran número de animales para obtener una cantidad suficiente de material axoplásmico (100 animales por réplica biológica) para alcanzar la cantidad de material necesario para el protocolo de proteómica cuantitativa utilizado (“*iTRAQ*”) (Michaevlevski *et al.*, 2010a). Como forma de aportar nueva información entorno a estos puntos, decidimos emplear el mismo sistema de aislamiento de material axonal a partir de nervio ciático, pero utilizando el sistema de proteómica *LFQ* y un espectrómetro de masas de última generación (Orbitrap Fusion Quadrupole) asociados con un experto a nivel mundial en proteómica como lo es el Dr. Thomas Kislinger. De esta forma alcanzamos un aumento significativo en la capacidad de detección, identificando más del doble de grupos de proteínas axonales en nervio ciático respecto a la publicación de Fainzilber y colaboradores del año 2010 (Michaevlevski *et al.*, 2010a) - 2077 grupos de proteínas en axoplasma extruido - y utilizando el material axonal correspondiente a un único animal por réplica biológica, lo cual aumentó la replicabilidad (con un índice de correlación de Spearman superior a 0.8 entre cada grupo, Figura 1C del artículo, página 126). Esto nos permitió realizar comparativas dentro de los mismos animales entre el material axoplásmico y el nervio entero contralateral, tanto en condiciones basales como de regeneración, 18 horas post injuria.

Como forma de validar la pureza del material axonal obtenido, analizamos los niveles de detección de proteínas típicas de axones y las relacionadas con la mielina y/o el citoplasma de las células de Schwann, encontrando un enriquecimiento en las primeras y una disminución

en las segundas siempre relativo a los niveles detectados en el nervio entero. Además, al observar el heatmap de la Figura 1 es posible identificar 3 clusters: uno de proteínas con altos niveles de detección en axón (cluster 1) otras en el tejido entero (cluster 3) y una región donde los niveles de detección son similares entre ambos tipos de muestra (cluster 2). Varias proteínas típicas de mielina (como MPZ y P0) y otras reportadas como marcadores del citoplasma de la célula de Schwann en modelos *in vivo* como las S100 y Ncam1 (Liu *et al.*, 2015) están presentes en el cluster 3, de acuerdo a lo esperado. Sin embargo, los neurofilamentos, para los cuales existen numerosos reportes que validan su presencia en altos niveles en axón (Yuan *et al.*, 2017), no los encontramos enriquecidos respecto al proteoma del nervio entero aunque si están entre los primeros 30 grupos de proteínas con mayores niveles de detección en la muestra axonal. Si bien esto no estaría dentro de los resultados esperados, es posible que se deba a características propias del sistema de extracción del material axoplásmico. En línea con esta hipótesis, nuestro grupo pudo constatar mediante un análisis de proteómica realizado a partir del protocolo de microdissección de axoplasmas diseñado por Koenig y colaboradores (Koenig *et al.*, 2000) en raíces ventrales que los neurofilamentos liviano y mediano son las 2 primeras proteínas axonales detectadas incluso con un orden de magnitud mayor respecto a todos otros grupos detectados (manuscrito en preparación). Es posible que el paso de fijación del sistema de microdissección de axoplasmas genere un enriquecimiento mucho mayor de las proteínas del citoesqueleto que lo que se logra en el método de extracción por buffer hipotónico de Fainzilber y colaboradores en donde es esperable exista un sesgo hacia la detección de la fracción soluble de estas proteínas y no de la insoluble. Es esperable que la misma se encuentre en altas proporciones dado que la mayoría de los neurofilamentos en axones maduros están conformando grandes clusters inmóviles que no son posibles de solubilizar en ausencia de detergentes (Yuan *et al.*, 2000, 2003).

Confirmamos además la capacidad de utilizar este sistema de extracción de axoplasma en raíces ventrales (RV) y dorsales (RD) las cuales dan origen a más del 95% de las fibras correspondientes al nervio ciático de ratas adultas (Schmalbruch, 1986). Los gráficos de correlación pareados muestran una mayor similaridad entre las RV y RD enteras ( $R^2$  de 0.90) que respecto a éstas últimas con el nervio ciático entero ( $R^2$  de 0.62 y 0.64, respectivamente).

Estos valores son esperables dada la similitud en cuanto a la organización de las fibras en las RV y RD las cuáles están en la interfase entre el SNC y el SNP (Hadzic, 2007) y carecen de la típica conformación del tejido conectivo multi fascicular de los nervios periféricos - como lo es el nervio ciático - con un epineuro, perineuro y endoneuro definidos y una alta proporción de fibras de colágeno (Schmalbruch, 1986). En cuanto al proteoma axonal, las diferencias encontradas son mayores que para el tejido entero, aunque el coeficiente de correlación revela mayor similitud entre los axones de RV y RD ( $R^2$  de 0.77) que éstos con los del nervio ciático ( $R^2$  de 0.45 y 0.51, respectivamente). Las grandes diferencias entre los axones de RV y RD con los del nervio ciático posiblemente se explique por los diferentes tipos axonales tanto motores como sensoriales del ciático respecto a la mayoría de amielínicos sensoriales de la RD y motores mielínicos de la RV, aunque también pueda explicarse por diferencias en la eficiencia del protocolo de extruido de axoplasmas en cada tipo de tejido. El alto valor de correlación entre los proteomas de los axones de RV y RD puede significar que, a pesar de sus diferencias funcionales, axones de neuronas motoras y sensoriales presentan un mismo core de proteínas con funciones en principio aún no definidas. En línea con esta hipótesis en un trabajo reciente - donde se estudia el proteoma de nervio ciático manteniendo sólo axones de fibras sensoriales o solo de fibras motoras utilizando un novedoso protocolo de lesión selectiva en las raíces dorsales o las motoras de las lumbares L3 a L6 - muestra que solamente 176 grupos de proteínas están diferencialmente expresadas entre fibras sensoriales y motoras, por lo cual es esperable que sus axones sean similares (He *et al.*, 2021).

También verificamos que el 85% de los grupos de proteínas detectados en nuestro set de datos están presentes en al menos uno de los proteomas axonales *in vitro* previamente reportados, lo cual sugiere que más allá de las diferencias, existe un grupo de proteínas que son comunes a grupos diferentes de axones. Además, un 10% de las proteínas axonales corresponden a proteínas de unión al ARN, lo cual es esperable considerando que una función esencial del axón es el transporte de moléculas de ARN desde y hacia el cuerpo celular.

El análisis del proteoma axonal del nervio ciático comparado con el proteoma del nervio entero muestra un enriquecimiento en proteínas relacionadas con elementos del citoesqueleto, traducción y en particular un marcado aumento en la detección de proteínas ribosomales en los axones. Además, y tras analizar el efecto que presenta la injuria,

observamos un aumento de los niveles de detección de proteínas ribosomales en los axones, pero sorprendentemente dicho aumento no es tan evidente en las muestras de tejido entero (ver Figura 5 del artículo, página 131). Estos resultados sugieren que las proteínas ribosomales pueden estar jugando un rol importante en el axón maduro, tanto en condiciones basales como de injuria, posiblemente relacionados con el aumento en la síntesis de proteínas. En línea con esta hipótesis, pudimos comprobar el aumento en la SPL axonal mediante el sistema de Click iT combinado con microscopía confocal en axones de nervio ciático *in vivo* en los mismos tiempos post injuria - 18 horas - (consultar el Anexo 2 de la tesis, página 208). El dato de que este aumento en proteínas ribosomales sea significativo únicamente en las muestras axonales y no en el tejido entero sugiere también que, al menos en las primeras horas post injuria, la respuesta a la lesión comienza en el axón en forma independiente al cuerpo celular (posiblemente involucrando un aumento en la síntesis local de proteínas) y no comenzaría aún en las células gliales circundantes. Como se mencionó en la introducción general, la presencia de ribosomas activos en axones siempre ha sido un punto de controversia debido a las dificultades para hallar polisomas en este compartimento mediante microscopía electrónica. Sin embargo, un estudio reciente de Schuman y colaboradores muestra mediante *Ribosome Profiling* en axones *in vitro* la presencia de ribosomas activos pero no formando polisomas sino como monosomas activos (Biever *et al.*, 2020). Los autores incluso sugieren que esta puede ser la razón principal por la cual ha sido históricamente difícil detectar ribosomas activos en el dominio axonal ya que los monosomas son muy difíciles de evidenciar por microscopía electrónica. Otro estudio en forma independiente ha demostrado la neosíntesis de proteínas ribosomales en axones y su ensamblado en ribosomas independientemente al nucleolo (Shigeoka *et al.*, 2019). Es posible que las proteínas ribosomales que detectamos en nuestro estudio se correspondan con estos monosomas activos.

Los resultados del proteoma axonal mostraron una alta sensibilidad a la hora de la detección partiendo de muestras con muy baja cantidad de proteína total. Considerando este punto es que decidimos testear un protocolo de enriquecimiento en proteínas neo-sintetizadas (*BONCAT*) en axones del nervio ciático *in vivo* en estado basal durante un pulso de 4 horas con *AHA*, un aminoácido ortólogo de la metionina (por detalles ver la sección “*BONCAT*”).

*Protocol*” de los materiales y métodos del artículo). A pesar de estar más de 1000 veces por debajo del input sugerido de cantidad de proteína total para el kit de enriquecimiento de las proteínas que hayan incorporado el aminoácido *AHA* (partimos de 7 ug y se solicita comenzar con al menos 20 mg de proteína total), logramos detectar 42 proteínas que estarían siendo neo-sintetizadas en el axón (ver Tabla 1 del artículo, página 133). De esta lista de proteínas, el ARNm de 24 de ellas es detectado en el transcriptoma axonal *in vivo* reportado por nuestro grupo para raíces ventrales de rata (Farias *et al.*, 2020) y 28 están presentes en otros sets de datos de proteínas neo-sintetizadas reportadas en axones *in vitro* de ratón (Zappulo *et al.*, 2017) y *Xenopus Laevis* (Cagnetta *et al.*, 2018) y de radiomarcado combinado con espectrometría de masas en axones de neuronas *DRG* de rata (Willis *et al.*, 2005). Dentro de las 14 proteínas no presentes en los otros conjuntos de datos se encuentran las subunidades del NefL y NefM, cuya síntesis local ha sido reportada por nuestro grupo en nervio ciático (Sotelo-Silveira *et al.*, 2000), por el grupo de Giuditta en axón gigante de calamar (Crispino *et al.*, 1993), así como su mensajero en el transcriptoma de raíz ventral de rata adulta (Farias *et al.*, 2020). Además, en el Capítulo I de esta tesis se muestran evidencias *in situ* de la síntesis local del NefL en axones de nervio ciático en las mismas condiciones experimentales (estado basal y 18 horas post-injuria) que los presentados en el Capítulo III.

## **Conclusiones Capítulo III.**

Los resultados aquí obtenidos muestran una mejora significativa en la detección de proteínas mediante ensayos de proteómica cuantitativa en axones aislados de modelos *in vivo*, en estadios maduros y con escaso material de partida, lo cual es novedoso ya que la mayoría de los proteomas axonales reportados han sido desarrollados *in vitro*. Respecto a la significancia biológica de los resultados obtenidos, la presencia de un número importante de proteínas ribosomales y su aumento específico en axones tras la injuria es uno de los datos que consideramos más destacados ya que sugieren un rol de los mismos en la respuesta temprana post-lesión, posiblemente relacionado con fenómenos de síntesis proteica local axonal. Por último, los datos de proteínas neo-sintetizadas muestran la posibilidad de aplicar en el futuro protocolos similares para detectar cuáles proteínas están siendo neo-sintetizadas *in vivo* en axones durante diferentes escenarios metabólicos o como respuesta a diferentes estímulos.

## 7) DISCUSIÓN GENERAL y PERSPECTIVAS

### 7.1. Localización *in situ* de proteínas neo-sintetizadas en axón.

Las neuronas presentan un alto grado de polarización por lo cual la compartimentalización subcelular es un aspecto crucial, tanto desde un punto de vista estructural como funcional. Es así que tanto dendritas como axones cumplen funciones específicas donde es posible identificar ARNs, microARNs y proteínas que se encuentran enriquecidos respecto al transcriptoma y proteoma del soma neuronal. En lo que respecta al axón, los mecanismos de transporte selectivo desde y hacia el cuerpo celular son cruciales para la homeostasis neuronal, asegurando la localización específica de ARNm, ribosomas, complejos proteicos y organelos en tiempos compatibles con las necesidades metabólicas y los mecanismos de comunicación neuronal. Esto presenta un desafío importante, ya que las distancias a recorrer pueden ser muy extensas, especialmente cuando se consideran zonas distales de axones periféricos, que pueden ser varios órdenes de magnitud mayor respecto al diámetro promedio de un cuerpo neuronal. A modo de ejemplo, la respuesta a señales extrínsecas como una axotomía o la capacidad de respuesta producto de una sinapsis química con otra neurona o célula efectora, requiere de la presencia de gran cantidad de proteínas, incluyendo aquellas portadoras del mensaje, proteínas reguladoras y sistemas que aseguren su reposición a grandes distancias del soma. En este contexto la localización específica de ARNs y de proteínas estructurales, de señalización y de regulación junto a la capacidad de traducción local son cruciales para la vida neuronal, tanto en etapas del desarrollo como en axones ya maduros. Considerando el estrecho contacto de estos últimos con las células de Schwann en axones mielínicos de nervios periféricos, se ha reportado también la transferencia de ARNs y ribosomas como fuente alternativa a aquellos provenientes del soma. Esta íntima relación entre ambos tipos celulares dificulta analizar en modelos *in vivo* si las proteínas neosintetizadas son efectivamente axonales o si fueron neo-sintetizadas en las células de Schwann y transferidas al dominio axonal. Si bien existen herramientas de traducción como el “*Axon-TRAP*” que permiten analizar los mensajeros que están siendo traducidos por un tipo neuronal, diferenciándolos de los mensajeros traducidos por las células de Schwann (ver Figura 2C del Anexo 1, página 188), estas metodologías no permiten localizar *in situ* los sitios



axonales de traducción local. Para responder a esta última interrogante es que en esta tesis adaptamos el sistema de Puro-PLA para criocortes de nervio ciático, identificando *in situ* los sitios de SPL axonal de dos proteínas de interés: una estructural como lo es el NefL (Capítulo I) y otra de regulación del crecimiento axonal como es Pdc4 (Capítulo II). Mediante esta metodología es posible no solo localizar sino también cuantificar el número de centros traduccionales en diversos escenarios metabólicos. A modo de ejemplo, pueden estudiarse el aumento o disminución en el número de centros traduccionales de una proteína de interés a diferentes tiempos post injuria y no solo a las 18 horas posteriores a la misma como se hizo en esta tesis. Es esperable que a mayores tiempos se detecte un aumento en los niveles de neosíntesis del NefL, ya que estudios previos han evidenciado que a las 48 horas post-lesión del nervio ciático se observa un aumento en la incorporación de aminoácidos radiactivos en spots de geles bidimensionales correspondientes a los neurofilamentos (Sotelo-Silveira *et al.*, 2000). Si bien estos trabajos junto con otros desarrollados en axón gigante de calamar (Crispino *et al.*, 1993) sugieren la SPL axonal de los neurofilamentos, hasta lo que nosotros sabemos solo con el sistema de Puro-PLA presentado en el Capítulo I ha sido posible localizar los sitios de neosíntesis axonal de neurofilamentos *in vivo* y separar con alta resolución óptica la señal de SPL axonal de aquella que podría provenir de las células de Schwann, un problema de muy difícil resolución mediante otras metodologías, al menos en axones maduros.

Estos sistemas de localización a alta resolución óptica aportan información respecto a la neosíntesis de proteínas de interés en compartimentos axonales tanto desde un punto de vista cualitativo como cuantitativo, como se mostró en los Capítulos I y II a través de dos posibles sistemas de cuantificación semi-automáticos. En el futuro estas herramientas permitirán analizar de una forma diferente la SPL axonal ya que podrían ser aplicados a diversos problemas biológicos. Por ejemplo, se podría responder si las *PARPs* u otros dominios axonales con presencia de ARNs y ribosomas se corresponden con centros traduccionales activos. En este sentido, la combinación del sistema de Puro-PLA con protocolos de microdissección de axoplasmas o de transparentación de nervios periféricos enteros (mencionados en la Introducción General) podrían aportar valiosa información al respecto que difícilmente pueda llevarse a cabo utilizando otras metodologías. Por otra parte, la utilización del sistema de *FUNCAT-PLA* (Tom Dieck *et al.*, 2015), en donde se utiliza un aminoácido

ortólogo de la metionina (*AHA*) en lugar de puromicina, podría ser una técnica adicional al PURO-PLA de gran interés para optimizar en criocortes de nervio ciático. Mediante el sistema *FUNCAT* no se generan péptidos truncos sino proteínas funcionales que incorporan el aminoácido *AHA*. Por tanto, pueden detectarse con kits comerciales en geles de poliacrilamida para chequear neosíntesis general, con técnicas de “western blot” para evidenciar proteínas neosintetizadas específicas o combinarlo con el sistema de “PLA” y microscopía confocal de fluorescencia para “seguir” en el tiempo y espacio la neosíntesis de una proteína de interés. De esta forma se podría utilizar el *FUNCAT*-PLA y chequear a diferentes tiempos de incubación con *AHA* en raíces ventrales si proteínas candidato que se conocen de la bibliografía que están presentes en las *PARPs* como la miosina Va (Sotelo-Silveira *et al.*, 2004, Calliari *et al.*, 2014), KIF11b (Sotelo Silveira *et al.*, 2004), o los ARNm de la beta actina y ZBP1 (Sotelo-Silveira *et al.*, 2008) se neo-sintetizan y concentran en dichas estructuras, observables en axoplasmas micro-disecionados por el método de Koenig y colaboradores (detallado en la Figura 1F del artículo III en el Anexo 1, página 184). Adicionalmente y también utilizando el sistema de *FUNCAT*-PLA pero con el NefL u otras subunidades de los neurofilamentos, sería posible demostrar si estas proteínas se incorporan a los agregados de neurofilamentos carentes de movimientos y altamente fosforilados ubicados en zonas distales de axones periféricos. Dado la alta concentración de estas proteínas en axones maduros, se debería combinar técnicas que permitan visualizar por inmunofluorescencia polímeros individuales de neurofilamentos como el protocolo de explayado del citoesqueleto axonal en neuronas *in vitro* (Brown *et al.*, 1997) o conjugar una subunidad de los neurofilamentos a GFP (Uchida and Brown., 2021, BioRxiv) para visualizar grupos de neurofilamentos y analizar su co-localización con la señal de *FUNCAT*-PLA en modelos axonales tanto *in vitro* como *in vivo*.

## **7.2. Regulación de la traducción local en axones periféricos.**

La localización axonal de las proteínas neo-sintetizadas, el transporte de los ARNm hacia los sitios donde serán traducidos, la movilización de la maquinaria traduccional asociada y los mecanismos de degradación local de proteínas son procesos que deben estar finamente regulados. Si bien se conoce que el complejo mTORC1 es capaz de regular parte de estos procesos modulando los niveles de neosíntesis producidos tras un evento de injuria, así como los mecanismos de degradación necesarios para responder a procesos de regeneración local

(Verma *et al.*, 2005, Terenzio *et al.*, 2018), poco se conoce respecto al rol específico de los componentes río abajo de la vía mTORC1 (ver Figura 2, página 26), quienes posiblemente expliquen la modulación fina de estos procesos. En esta tesis de doctorado demostramos que la proteína Pdc4, reportada como un represor traduccional en modelos de cáncer que forma parte de la vía mTORC1, es capaz de modular el crecimiento axonal *in vitro*. Además, confirmamos que los niveles de expresión de Pdc4 descienden localmente tras un evento de injuria y aumentan su SPL en axones del nervio ciático regenerantes. Una posible explicación del descenso en los niveles de esta proteína en axones lesionados puede ser por la activación de la vía mTORC1, como ya ha sido reportada en diversos modelos neuronales (Abe *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2008, 2010; Donnelly *et al.*, 2013; Ohtake *et al.*, 2015; Terenzio *et al.*, 2018). Además, y en línea con los datos de la bibliografía, nosotros detectamos en nuestro modelo de injuria un aumento de la forma fosforilada de p70S6K, lo cual no solo evidencia una activación de la vía mTORC1, sino que sugiere un aumento en la fosforilación de PDCD4 por parte de p70S6K (ver Figura 2 de la tesis, página 26), lo que desencadenaría su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma, como ya se ha reportado en modelos de cáncer (Dorrello *et al.*, 2006). Una manera de confirmar esta hipótesis es cuantificando la señal de PDCD4 fosforilado en la Ser 67 (la forma fosforilada por la vía mTORC1/p70S6K) en lugar de estudiar únicamente los niveles de proteína total. En este caso esperamos exista un aumento de la forma fosforilada de Pdc4 en los axones regenerantes respecto a los grupos control sin lesión en las etapas previas a la degradación de la proteína.

Si bien se estudió la capacidad regulatoria de Pdc4 en el crecimiento axonal y se sugieren mecanismos de modulación de su expresión a través de la activación de la vía mTORC1 en axones regenerantes, diversas interrogantes permanecen aún sin responder. Dentro de ellas podemos destacar: ¿Por qué Pdc4 aumenta su neosíntesis en las primeras horas post injuria? Una explicación podría ser que su SPL se corresponde con mecanismos para asegurar su reposición local para las etapas posteriores a la injuria, donde ya hipotetizamos sobre su posible degradación a nivel axonal. Sería interesante evaluar estos niveles de neosíntesis a diferentes tiempos post injuria, ver si existen diferencias entre ellos y si ello se correlaciona con los aumentos de neosíntesis general en cada etapa. Por otra parte Pdc4 es modulado en estos modelos y es un represor traduccional por tanto una pregunta que surge

es ¿qué mensajeros tienen su tasa de traducción regulada por Pdc4 en los somas de neuronas DRG y en los axones de nervio ciático en estado basal? y ¿cuáles ARNm regulados por Pdc4 aumentan su traducción local durante las etapas de regeneración? Una forma de responder estas preguntas es realizando experimentos similares a los presentados en el artículo I del Capítulo II, donde se llevó a cabo un silenciamiento de PDCD4 combinados con un ensayo de *Ribosome Profiling* en células PC12 diferenciadas a neuronas, revelando los genes que serían regulados traduccionalmente por esta proteína (Figura 4 del Artículo II, página 83). Se podría entonces emplear el protocolo de extrusión de material axoplásmico (utilizado en el capítulo III) en nervios ciáticos de ratones *knockout* y control para el gen PDCD4 combinado con protocolos de *Ribosome Profiling*, para así obtener una lista de los genes potencialmente regulados localmente en el axón por PDCD4 a nivel traduccional. Posteriormente, se podría confirmar si estos mensajeros modulan su traducción local en estos procesos mediante el sistema de PURO-PLA, protocolo que ya fue puesto a punto en los capítulos I y II de esta tesis.

### **7.3. Identificación de las proteínas totales y las neo-sintetizadas localmente en axones periféricos.**

Los estudios de localización mediante el sistema de PURO-PLA presentan una limitante ya que solo es posible analizar la neosíntesis de proteínas candidatas en forma individual. Es en este contexto y otros similares que los ensayos omicos surgen como herramientas cuya sensibilidad permitiría identificar las proteínas totales y neo-sintetizadas presentes en el dominio axonal. Ello representa un desafío quizás impensado hace 15 años, pero que hoy es viable gracias a los avances en las técnicas de secuenciación masiva, de proteómica y en las altas capacidades de cómputo. En el capítulo III de esta tesis se determinó el proteoma total de axones del nervio ciático en estado basal y regenerante obtenidos por extrusión del material axoplásmico en buffer hipotónico. Los datos obtenidos representan una valiosa base de datos, ya que la mayoría de los proteomas axonales publicados en la bibliografía corresponden a modelos axonales *in vitro* (Zappulo *et al.*, 2017, Chuang *et al.*, 2018, Cagnetta *et al.*, 2018) los cuales no reflejan la complejidad de interacciones que si presentan los axones maduros *in vivo*. Dentro de los principales hallazgos se encuentra el enriquecimiento de las proteínas ribosomales en el axoplasma respecto al ciático total y su aumento en condiciones de injuria

a nivel axonal. Dados los tiempos post lesión y la lejanía con respecto a los somas, es posible que parte de las proteínas ribosomales detectadas en el axón sean transferidas desde las células de Schwann como ya ha sido reportado en modelos similares (Court *et al.*, 2009, Court *et al.*, 2012) o que sean neosintetizadas en el dominio axonal. Respecto a este último punto, trabajos recientes han demostrado la neosíntesis de estas proteínas en axones de neuronas del ganglio de la retina en embriones de *Xenopus* (Shigeoka *et al.*, 2019) y en dendritas de cultivos primarios de hipocampo de ratas recién nacidas (Fusco *et al.*, 2021, BioRxiv). Estos dos últimos estudios también han reportado la incorporación de algunas de estas proteínas en ribosomas preexistentes en el axón (Shigeoka *et al.*, 2019) y dendritas (Fusco *et al.*, 2021, BioRxiv) en forma independiente del ensamblado canónico de los mismos en el nucleolo, evidenciando cambios en las probabilidades de incorporación frente a estrés oxidativo (Fusco *et al.*, 2021, BioRxiv) y cumpliendo funciones importantes para el axón, como por ejemplo en la ramificación axonal terminal (Shigeoka *et al.*, 2019). En este contexto es válido preguntarse si en axones maduros *in vivo* existe neosíntesis de proteínas ribosomales, si pueden incorporarse localmente a ribosomas ya presentes en el axón y si estos factores están condicionados en eventos de injuria axonal. Para ello pueden realizarse experimentos de PURO-PLA como los descritos en el capítulo I, pero para proteínas ribosomales y verificar su neosíntesis axonal. Adicionalmente, pueden realizarse experimentos de *Ribosome Profiling* en material axoplásmico obtenido por extrusión en buffer hipotónico de nervios previamente incubados con aminoácidos marcados por el sistema *BONCAT* y/o *pSILAC* para evidenciar las proteínas ribosomales neosintetizadas en las fracciones polisomal y monosomal. Esta última es importante que sea considerada ya que recientemente se ha descrito que existe una importante proporción de monosomas activos traduccionalmente en axones *in vitro* (Biever *et al.*, 2020). Parte de estos estudios están actualmente siendo desarrollados por nuestro grupo y cuentan con financiamiento de un proyecto de colaboración entre ANII y el laboratorio de la PhD Erin Schuman del Instituto Max Planck, experta en el sistema de PLA aplicado a dendritas en hipocampo.

En esta tesis también se combinó el sistema *BONCAT* con ensayos de proteómica y un sistema de enriquecimiento en las proteínas neosintetizadas que incorporaron el aminoácido *AHA*. Si bien este sistema de enriquecimiento está diseñado para partir de un input de unos

20 mg de proteína total (lo cual está muy por debajo de los 6 ug de proteína total de axoplasma del cual partimos para los experimentos de *BONCAT*), pudimos detectar las proteínas con altos niveles de neosíntesis axonal (42). Estudios de proteómica en axones *in vitro* han reportado 350 proteínas neosintetizadas en axones de células del ganglio de la retina en embriones de *Xenopus Laevis* (Cagnetta *et al.*, 2018) y 380 en neuritas de “i-Neurons”, un modelo celular de ratón diferenciado a neuronas (Zappulo *et al.*, 2017). En base a estos datos es esperable que el número de proteínas neo-sintetizadas en axón del nervio ciático en animales adultos sea mayor al obtenido, por lo cual repetir el protocolo de *BONCAT*-MS/MS pero aumentando el número de animales (para así obtener una mayor cantidad de proteína total y por tanto un mayor rendimiento del kit de enriquecimiento de las proteínas axonales que incorporan *AHA*) permitirá con seguridad detectar aquellas proteínas que son neosintetizadas en el axón pero con tasas de traducción menor. Además, estos ensayos pueden ir acompañados de análisis de *Ribosome Profiling* para correlacionar datos de traducción con los de proteómica, ya que es esperable que con los primeros se alcancen rangos de sensibilidad mayor que en los segundos. Por otra parte, los experimentos de *BONCAT*-MS/MS fueron desarrollados únicamente en axones no injuriados, por lo cual se podría repetir estos protocolos en axones regenerantes para identificar qué proteínas presentan altos niveles de neosíntesis en estas condiciones. Si bien la limitante de la cantidad de proteínas neosintetizadas en axones siempre será un reto para los estudios de proteómica y traducción axonal, el avance exponencial en estas técnicas en los últimos 5 años augura un futuro prometedor en este campo. A modo de ejemplo se han publicado recientemente protocolos de célula única en ensayos de proteómica (Specht *et al.* 2021) e incluso de western blot (Hughes *et al.* 2014; Kang *et al.* 2016; Grist *et al.* 2020), por lo cual si es posible trasladar estos sistemas a modelos axonales *in vivo* los resultados pueden ser muy valiosos.

#### **7.4. Futuro de la temática estudiada.**

Las primeras evidencias experimentales de la SPL axonal datan de los años sesenta lideradas por un grupo reducido de investigadores y fueron muy resistidas por la comunidad científica. Sin embargo, este escenario fue cambiando con el paso de los años y en las últimas dos décadas el número de artículos en esta temática en revistas de alto impacto aumentó exponencialmente. Los avances tecnológicos no solo ponen en clara evidencia la existencia

e importancia de la SPL axonal, sino que han dado lugar al planteo de nuevos paradigmas de estudio en la temática. Es así que el axón pasó de ser considerado un compartimento especializado únicamente en el transporte de biomoléculas a ser una estructura con respuesta semi-independiente del soma neuronal, con sus propios elementos estructurales, regulatorios y de respuesta a los cambios internos o de su entorno. Los métodos de localización (como el PURO-PLA, *FUNCAT-PLA* y su combinación con ensayos de molécula única y microscopía de superresolución), de purificación (por ejemplo mediante cámaras compartimentalizadas en modelos *in vitro* y la microdissección o extrusión de axoplasmas en nervios *in vivo*) e identificación (por ensayos de translómica como el *Axon-TRAP* o incluso de proteómica) de proteínas neosintetizadas en axones han alcanzado niveles de sensibilidad superlativos, permitiendo el desarrollo de experimentos cada vez más desafiantes y prácticamente impensados décadas atrás. Ejemplos de ello son los numerosos transcriptomas, translatomas, proteomas y más recientemente proteomas neo-sintetizados de varios tipos axonales (ver el artículo III del Anexo 1, página 182), el hallazgo de monosomas activos traduccionalmente en axones de hipocampo (Biever *et al.*, 2020), la reposición de subunidades ribosomales en ribosomas ensamblados en axones independientemente de la maquinaria nucleolar (Shigeoka *et al.*, 2019) y la demostración *in situ* de la SPL en las pre-sinapsis de neuronas del cerebro de ratón (Hafner *et al.*, 2019). Esto último fue una interrogante que estuvo en debate por muchos años en la comunidad científica ya que se consideraba que la misma solo ocurría en la postsinapsis, dejando en evidencia la complejidad y plasticidad funcional de ambos lados de las sinapsis neuronales (como se discute en el artículo III del Anexo 1). En el futuro cercano la adaptación de tecnologías de punta para el estudio de los axones como la transcriptómica espacial (Lein *et al.*, 2017; Mu *et al.*, 2019; Miedema *et al.*, 2020; Waylen *et al.*, 2020; Armand *et al.*, 2021) - para identificar *in situ* cientos de mensajeros en dominios de difícil aislamiento como los axones *in vivo* - los ensayos de transcriptómica de célula única - los cuales ya han sido aplicados en dendritas (Perez *et al.* 2021) e incluso en bacterias individuales (Kuchina *et al.* 2021; Blattman *et al.* 2020) - así como los protocolos de proteómica de célula única (Specht *et al.*, 2021) aparecen como posibles sistemas con niveles de sensibilidad muy altos que, con seguridad, podrán aplicarse también para el estudio de la síntesis proteica local en axones.

## 8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES.

- Abe, N., Borson, S. H., Gambello, M. J., Wang, F., and Cavalli, V. (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR) activation increases axonal growth capacity of injured peripheral nerves. *J. Biol. Chem.* 285, 28034–28043.
- Al-Ali, H., Beckerman, S. R., Bixby, J. L., and Lemmon, V. P. (2017). *In vitro* models of axon regeneration. *Exp. Neurol.* 287, 423–434.
- Alami, N. H., Smith, R. B., Carrasco, M. A., Williams, L. A., Winborn, C. S., Han, S. S. W., *et al.* (2014). Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* 81, 536–543.
- Alvarez, J., and Benech, C. R. (1983). Axoplasmic incorporation of amino acids in a myelinated fiber exceeds that of its soma: A radioautographic study. *Experimental Neurology* 82, 25–42. doi:10.1016/0014-4886(83)90240-6.
- Alvarez, J., Giuditta, A., and Koenig, E. (2000). Protein synthesis in axons and terminals: significance for maintenance, plasticity and regulation of phenotype. With a critique of slow transport theory. *Prog. Neurobiol.* 62, 1–62.
- Alvarez, J., and Torres, J. C. (1985). Slow axoplasmic transport: a fiction? *J. Theor. Biol.* 112, 627–651.
- Ambrozkiwicz, M. C., Schwark, M., Kishimoto-Suga, M., Borisova, E., Hori, K., Salazar-Lázaro, A., *et al.* (2018). Polarity Acquisition in Cortical Neurons Is Driven by Synergistic Action of Sox9-Regulated Wwp1 and Wwp2 E3 Ubiquitin Ligases and Intronic miR-140. *Neuron* 100, 1097–1115.e15.
- Andreassi, C., Zimmermann, C., Mitter, R., Fusco, S., De Vita, S., Saiardi, A., *et al.* (2010). An NGF-responsive element targets myo-inositol monophosphatase-1 mRNA to sympathetic neuron axons. *Nat. Neurosci.* 13, 291–301.
- Angelides, K. J., Smith, K. E., and Takeda, M. (1989). Assembly and exchange of intermediate filament proteins of neurons: neurofilaments are dynamic structures. *Journal of Cell Biology* 108, 1495–1506. doi:10.1083/jcb.108.4.1495.
- An, J. J., Gharami, K., Liao, G.-Y., Woo, N. H., Lau, A. G., Vanevski, F., *et al.* (2008). Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 134, 175–187.
- Armand, E. J., Li, J., Xie, F., Luo, C., and Mukamel, E. A. (2021). Single-Cell Sequencing of Brain Cell Transcriptomes and Epigenomes. *Neuron* 109, 11–26.
- Asamitsu, S., Takeuchi, M., Ikenoshita, S., Imai, Y., Kashiwagi, H., and Shioda, N. (2019). Perspectives for Applying G-Quadruplex Structures in Neurobiology and Neuropharmacology. *Int. J. Mol. Sci.* 20. doi:10.3390/ijms20122884.
- Aviner, R. (2020). The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 1074–1083.



- Baleriola, J., Walker, C. A., Jean, Y. Y., Crary, J. F., Troy, C. M., Nagy, P. L., *et al.* (2014). Axonally synthesized ATF4 transmits a neurodegenerative signal across brain regions. *Cell* 158, 1159–1172.
- Banker, G. (2018). The Development of Neuronal Polarity: A Retrospective View. *J. Neurosci.* 38, 1867–1873.
- Bareyre, F. M., Garzorz, N., Lang, C., Misgeld, T., Büning, H., and Kerschensteiner, M. (2011). *In vivo* imaging reveals a phase-specific role of STAT3 during central and peripheral nervous system axon regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6282–6287.
- Barker, S. J., and Tsai, L.-H. (2017). MethyLock: DNA Demethylation Is the Epigenetic Key to Axon Regeneration. *Neuron* 94, 221–223.
- Baskaran, P., Shaw, C., and Guthrie, S. (2018). TDP-43 causes neurotoxicity and cytoskeletal dysfunction in primary cortical neurons. *PLoS One* 13, e0196528.
- Bassell, G. J., Zhang, H., Byrd, A. L., Femino, A. M., Singer, R. H., Taneja, K. L., *et al.* (1998). Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J. Neurosci.* 18, 251–265.
- Batish, M., van den Bogaard, P., Kramer, F. R., and Tyagi, S. (2012). Neuronal mRNAs travel singly into dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 4645–4650.
- Batista, A. F. R., and Hengst, U. (2016). Intra- axonal protein synthesis in development and beyond. *International Journal of Developmental Neuroscience* 55, 140–149. doi:10.1016/j.ijdevneu.2016.03.004.
- Batista, A. F. R., Martínez, J. C., and Hengst, U. (2017). Intra-axonal Synthesis of SNAP25 Is Required for the Formation of Presynaptic Terminals. *Cell Rep.* 20, 3085–3098.
- Bauer, N. C., Doetsch, P. W., and Corbett, A. H. (2015). Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic* 16, 1039–1061. doi:10.1111/tra.12310.
- Bellon, A., Iyer, A., Bridi, S., Lee, F. C. Y., Ovando-Vázquez, C., Corradi, E., *et al.* (2017). miR-182 Regulates Slit2-Mediated Axon Guidance by Modulating the Local Translation of a Specific mRNA. *Cell Rep.* 18, 1171–1186.
- Benech, C., Sotelo, J. R., Jr, Menéndez, J., and Correa-Luna, R. (1982). Autoradiographic study of RNA and protein synthesis in sectioned peripheral nerves. *Exp. Neurol.* 76, 72–82.
- Ben-Yaakov, K., Dagan, S. Y., Segal-Ruder, Y., Shalem, O., Vuppalachchi, D., Willis, D. E., *et al.* (2012). Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *EMBO J.* 31, 1350–1363.
- Ben-Yaakov, K., and Fainzilber, M. (2009). Retrograde injury signaling in lesioned axons. *Results Probl. Cell Differ.* 48, 327–338.
- Biever, A., Donlin-Asp, P. G., and Schuman, E. M. (2019). Local translation in neuronal processes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 57, 141–148.
- Biever, A., Glock, C., Tushev, G., Ciirdaeva, E., Dalmay, T., Langer, J. D., *et al.* (2020). Monosomes actively translate synaptic mRNAs in neuronal processes. *Science* 367.

doi:10.1126/science.aay4991.

- Bigler, R. L., Kamande, J. W., Dumitru, R., Niedringhaus, M., and Taylor, A. M. (2017). Messenger RNAs localized to distal projections of human stem cell derived neurons. *Sci. Rep.* 7, 611.
- Biyanee, A., Ohnheiser, J., Singh, P., and Klempnauer, K.-H. (2015). A novel mechanism for the control of translation of specific mRNAs by tumor suppressor protein Pcd4: inhibition of translation elongation. *Oncogene* 34, 1384–1392.
- Black, M. M., Keyser, P., and Sobel, E. (1986). Interval between the synthesis and assembly of cytoskeletal proteins in cultured neurons. *J. Neurosci.* 6, 1004–1012.
- Blattman, S. B., Jiang, W., Oikonomou, P., and Tavazoie, S. (2020). Prokaryotic single-cell RNA sequencing by *in situ* combinatorial indexing. *Nat Microbiol* 5, 1192–1201.
- Bodian, D. (1965). A SUGGESTIVE RELATIONSHIP OF NERVE CELL RNA WITH SPECIFIC SYNAPTIC SITES. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 53, 418–425.
- Bo, X. (2018). Is ATP a key player in conditioning neurons to support axonal regeneration? *Neural Regeneration Res.* 13, 2077–2079.
- Briese, M., Saal, L., Appenzeller, S., Moradi, M., Baluapuri, A., and Sendtner, M. (2016). Whole transcriptome profiling reveals the RNA content of motor axons. *Nucleic Acids Res.* 44, e33.
- Brown, A. (1997). Visualization of single neurofilaments by immunofluorescence microscopy of splayed axonal cytoskeletons. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38, 133–145.
- Buchheit, T. E., and Tytell, M. (1992). Transfer of molecules from glia to axon in the squid may be mediated by glial vesicles. *Journal of Neurobiology* 23, 217–230.  
doi:10.1002/neu.480230303.
- Buffington, S. A., Huang, W., and Costa-Mattioli, M. (2014). Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annu. Rev. Neurosci.* 37, 17–38.
- Bunge, M. B. (1973). Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. *J. Cell Biol.* 56, 713–735.
- Burton, P. R., and Wentz, M. A. (1992). Neurofilaments are prominent in bullfrog olfactory axons but are rarely seen in those of the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *J. Comp. Neurol.* 317, 396–406.
- Buxbaum, A. R., Wu, B., and Singer, R. H. (2014). Single  $\beta$ -actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability. *Science* 343, 419–422.
- Cáceres, A., Busciglio, J., Ferreira, A., and Steward, O. (1988). An immunocytochemical and biochemical study of the microtubule-associated protein MAP-2 during post-lesion dendritic remodeling in the central nervous system of adult rats. *Brain Res.* 427, 233–246.
- Cagnetta, R., Frese, C. K., Shigeoka, T., Krijgsveld, J., and Holt, C. E. (2018). Rapid Cue-Specific Remodeling of the Nascent Axonal Proteome. *Neuron* 99, 29–46.e4.

- Cajigas, I. J., Tushev, G., Will, T. J., tom Dieck, S., Fuerst, N., and Schuman, E. M. (2012a). The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron* 74, 453–466.
- Cajigas, I. J., Tushev, G., Will, T. J., tom Dieck, S., Fuerst, N., and Schuman, E. M. (2012b). The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron* 74, 453–466.
- Calliari, A., Farías, J., Puppo, A., Canclini, L., Mercer, J. A., Munroe, D., *et al.* (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.
- Campenot, R. B. (1977). Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 4516–4519. doi:10.1073/pnas.74.10.4516.
- Canclini, L., Farias, J., Di Paolo, A., Sotelo-Silveira, J. R., Folle, G., Kun, A., *et al.* (2020). Association of microtubules and axonal RNA transferred from myelinating Schwann cells in rat sciatic nerve. *PLoS One* 15, e0233651.
- Canclini, L., Wallrabe, H., Di Paolo, A., Kun, A., Calliari, A., Sotelo-Silveira, J. R., *et al.* (2014). Association of Myosin Va and Schwann cells-derived RNA in mammal myelinated axons, analyzed by immunocytochemistry and confocal FRET microscopy. *Methods* 66, 153–161.
- Capano, C. P., Giuditta, A., Castigli, E., and Kaplan, B. B. (1987). Occurrence and sequence complexity of polyadenylated RNA in squid axoplasm. *J. Neurochem.* 49, 698–704.
- Cestra, G., Rossi, S., Di Salvio, M., and Cozzolino, M. (2017). Control of mRNA Translation in ALS Proteinopathy. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 85.
- Chédotal, A., Kerjan, G., and Moreau-Fauvarque, C. (2005). The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. *Cell Death Differ.* 12, 1044–1056.
- Chen, Q., Lu, H., Duan, C., Zhu, X., Zhang, Y., Li, M., *et al.* (2021). PDCD4–MAPK–NF-κB Positive Loop Simultaneously Promotes Microglia Activation and Neuron Apoptosis During Neuroinflammation. *Research Square*. doi:10.21203/rs.3.rs-348335/v1.
- Chen, X., Wei, S., Ji, Y., Guo, X., and Yang, F. (2015). Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics* 15, 3175–3192.
- Cho, Y., Di Liberto, V., Carlin, D., Abe, N., Li, K. H., Burlingame, A. L., *et al.* (2014). Syntaxin13 expression is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR) in injured neurons to promote axon regeneration. *J. Biol. Chem.* 289, 15820–15832.
- Chuang, C.-F., King, C.-E., Ho, B.-W., Chien, K.-Y., and Chang, Y.-C. (2018). Unbiased Proteomic Study of the Axons of Cultured Rat Cortical Neurons. *J. Proteome Res.* 17, 1953–1966.
- Chung, K., Wallace, J., Kim, S.-Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A. S., Davidson, T. J., *et al.* (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332–337.
- Cohen, L. D., Zuchman, R., Sorokina, O., Müller, A., Dieterich, D. C., Armstrong, J. D., *et al.*

- (2013). Metabolic turnover of synaptic proteins: kinetics, interdependencies and implications for synaptic maintenance. *PLoS One* 8, e63191.
- Costa, C. J., and Willis, D. E. (2018). To the end of the line: Axonal mRNA transport and local translation in health and neurodegenerative disease. *Dev. Neurobiol.* 78, 209–220.
- Cotterill, E., Hall, D., Wallace, K., Mundy, W. R., Eglen, S. J., and Shafer, T. J. (2016). Characterization of Early Cortical Neural Network Development in Multiwell Microelectrode Array Plates. *J. Biomol. Screen.* 21, 510–519.
- Court, F. A., Hendriks, W. T. J., MacGillavry, H. D., Alvarez, J., and van Minnen, J. (2008). Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *J. Neurosci.* 28, 11024–11029.
- Court, F. A., Midha, R., Cisterna, B. A., Grochmal, J., Shakhbazau, A., Hendriks, W. T., *et al.* (2011). Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons. *Glia* 59, 1529–1539.
- Cox, L. J., Hengst, U., Gurskaya, N. G., Lukyanov, K. A., and Jaffrey, S. R. (2008). Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat. Cell Biol.* 10, 149–159.
- Cremisi, F. (2013). MicroRNAs and cell fate in cortical and retinal development. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7. doi:10.3389/fncel.2013.00141.
- Crispino, M., Capano, C. P., Kaplan, B. B., and Giuditta, A. (1993). Neurofilament proteins are synthesized in nerve endings from squid brain. *J. Neurochem.* 61, 1144–1146.
- Crispino, M., Chun, J. T., and Giuditta, A. (2018). Squid Giant Axons Synthesize NF Proteins. *Mol. Neurobiol.* 55, 3079–3084.
- Dajas-Bailador, F., Bonev, B., Garcez, P., Stanley, P., Guillemot, F., and Papalopulu, N. (2012). microRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 697–699.
- Dalla Costa, I., Buchanan, C. N., Zdradzinski, M. D., Sahoo, P. K., Smith, T. P., Thames, E., *et al.* (2021). The functional organization of axonal mRNA transport and translation. *Nat. Rev. Neurosci.* 22, 77–91.
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y. S., Mele, A., Fraser, C. E., *et al.* (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* 146, 247–261.
- Das, S., Singer, R. H., and Yoon, Y. J. (2019). The travels of mRNAs in neurons: do they know where they are going? *Curr. Opin. Neurobiol.* 57, 110–116.
- Deglincerti, A., and Jaffrey, S. R. (2012). Insights into the roles of local translation from the axonal transcriptome. *Open Biol.* 2, 120079.
- Deglincerti, A., Liu, Y., Colak, D., Hengst, U., Xu, G., and Jaffrey, S. R. (2015). Coupled local translation and degradation regulate growth cone collapse. *Nat. Commun.* 6, 6888.
- Dennis, M. D., Jefferson, L. S., and Kimball, S. R. (2012). Role of p70S6K1-mediated

- phosphorylation of eIF4B and PDCD4 proteins in the regulation of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 287, 42890–42899.
- de Waegh, S. M., Lee, V. M., and Brady, S. T. (1992). Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68, 451–463.
- Dictenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H., and Bassell, G. J. (2008). A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev. Cell* 14, 926–939.
- Di Liberto, V., and Cavalli, V. (2012). Ready, STAT, go: transcription factors on the move. *EMBO J.* 31, 1331–1333.
- Donnelly, C. J., Park, M., Spillane, M., Yoo, S., Pacheco, A., Gomes, C., *et al.* (2013). Axonally synthesized  $\beta$ -actin and GAP-43 proteins support distinct modes of axonal growth. *J. Neurosci.* 33, 3311–3322.
- Donnelly, C. J., Willis, D. E., Xu, M., Tep, C., Jiang, C., Yoo, S., *et al.* (2011). Limited availability of ZBP1 restricts axonal mRNA localization and nerve regeneration capacity. *EMBO J.* 30, 4665–4677.
- Dörrbaum, A. R., Kochen, L., Langer, J. D., and Schuman, E. M. (2018). Local and global influences on protein turnover in neurons and glia. *Elife* 7. doi:10.7554/eLife.34202.
- Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N. H., Sherman, N. E., and Pagano, M. (2006). S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 314, 467–471.
- Dowle, A. A., Wilson, J., and Thomas, J. R. (2016). Comparing the Diagnostic Classification Accuracy of *i*TRAQ, Peak-Area, Spectral-Counting, and emPAI Methods for Relative Quantification in Expression Proteomics. *J. Proteome Res.* 15, 3550–3562.
- Du, H., Hou, P., Zhang, W., and Li, Q. (2018). Advances in CLARITY-based tissue clearing and imaging. *Exp. Ther. Med.* 16, 1567–1576.
- Edström, A., and Sjöstrand, J. (1969). Protein synthesis in the isolated Mauthner nerve fibre of goldfish. *J. Neurochem.* 16, 67–81.
- Enam, S. U., Zinshteyn, B., Goldman, D. H., Cassani, M., Livingston, N. M., Seydoux, G., *et al.* (2020). Puromycin reactivity does not accurately localize translation at the subcellular level. *Elife* 9. doi:10.7554/eLife.60303.
- Endo, R., Takashima, N., and Tanaka, M. (2020). Abnormal Local Translation in Dendrites Impairs Cognitive Functions in Neuropsychiatric Disorders. *Make Life Visible*, 179–186. doi:10.1007/978-981-13-7908-6\_18.
- Eng, H., Lund, K., and Campenot, R. B. (1999). Synthesis of beta-tubulin, actin, and other proteins in axons of sympathetic neurons in compartmented cultures. *J. Neurosci.* 19, 1–9.
- Epple, R., Krüger, D., Berulava, T., Brehm, G., Islam, R., Köster, S., *et al.* (2021). The Coding and Small Non-coding Hippocampal Synaptic RNAome. *Mol. Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-021-02296-y.

- Farias, J., Holt, C. E., Sotelo, J. R., and Sotelo-Silveira, J. R. (2020). Axon micro-dissection and transcriptome profiling reveals the *in vivo* RNA content of fully differentiated myelinated motor axons. *RNA*, rna.073700.119.
- Farias, J., Sotelo, J. R., and Sotelo-Silveira, J. (2019). Toward Axonal System Biology: Genome Wide Views of Local mRNA Translation. *Proteomics* 19, e1900054.
- Fernandopulle, M. S., Lippincott-Schwartz, J., and Ward, M. E. (2021). RNA transport and local translation in neurodevelopmental and neurodegenerative disease. *Nat. Neurosci.* doi:10.1038/s41593-020-00785-2.
- Finger, F. P., Kopish, K. R., and White, J. G. (2003). A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. *Developmental Biology* 261, 220–234. doi:10.1016/s0012-1606(03)00296-3.
- Gainer, H., House, S., Kim, D. S., Chin, H., and Pant, H. C. (2017). Squid Giant Axon Contains Neurofilament Protein mRNA but does not Synthesize Neurofilament Proteins. *Cellular and Molecular Neurobiology* 37, 475–486. doi:10.1007/s10571-016-0382-z.
- Gebert, L. F. R., and MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20, 21–37. doi:10.1038/s41580-018-0045-7.
- Ge, J., Zhang, C.-W., Ng, X. W., Peng, B., Pan, S., Du, S., *et al.* (2016). Puromycin Analogues Capable of Multiplexed Imaging and Profiling of Protein Synthesis and Dynamics in Live Cells and Neurons. *Angewandte Chemie* 128, 5017–5021. doi:10.1002/ange.201511030.
- Giuditta, A., Cupello, A., and Lazzarini, G. (1980). Ribosomal RNA in the axoplasm of the squid giant axon. *J. Neurochem.* 34, 1757–1760.
- Giuditta, A., Dettbarn, W. D., and Brzin, M. (1968). Protein synthesis in the isolated giant axon of the squid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 59, 1284–1287.
- Giuditta, A., Hunt, T., and Santella, L. (1986). Rapid important paper Messenger RNA in squid axoplasm. *Neurochem. Int.* 8, 435–442.
- Giuditta, A., Menichini, E., Perrone Capano, C., Langella, M., Martin, R., Castigli, E., *et al.* (1991). Active polysomes in the axoplasm of the squid giant axon. *J. Neurosci. Res.* 28, 18–28.
- Glock, C., Biever, A., Tushev, G., Bartnik, I., Nassim-Assir, B., Dieck, S. T., *et al.* (2020). The mRNA translation landscape in the synaptic neuropil. doi:10.1101/2020.06.09.141960.
- Göke, A., Göke, R., Knolle, A., Trusheim, H., Schmidt, H., Wilmen, A., *et al.* (2002). DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 78–82.
- Gomes, C., Lee, S. J., Gardiner, A. S., Smith, T., Sahoo, P. K., Patel, P., *et al.* (2017). Axonal localization of neuritin/CPG15 mRNA is limited by competition for HuD binding. *J. Cell Sci.* 130, 3650–3662.
- Gong, X., Zhang, L., Huang, T., Lin, T. V., Miyares, L., Wen, J., *et al.* (2015). Activating the translational repressor 4E-BP or reducing S6K-GSK3 $\beta$  activity prevents accelerated axon growth induced by hyperactive mTOR *in vivo*. *Hum. Mol. Genet.* 24, 5746–5758.

- Grist, S. M., Mourdoukoutas, A. P., and Herr, A. E. (2020). 3D projection electrophoresis for single-cell immunoblotting. *Nat. Commun.* 11, 6237.
- Grollman, A. P. (1967). Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin. *J. Biol. Chem.* 242, 3226–3233.
- Gumy, L. F., Tan, C. L., and Fawcett, J. W. (2010). The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Exp. Neurol.* 223, 28–37.
- Gumy, L. F., Yeo, G. S. H., Tung, Y.-C. L., Zivraj, K. H., Willis, D., Coppola, G., *et al.* (2011). Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA* 17, 85–98.
- Gutierrez, H., Hale, V. A., Dolcet, X., and Davies, A. (2005). NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* 132, 1713–1726.
- Hadzic, A. (2007). *Textbook of Regional Anesthesia and Acute Pain Management*. McGraw-Hill Education.
- Hafner, A.-S., Donlin-Asp, P. G., Leitch, B., Herzog, E., and Schuman, E. M. (2019). Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments. *Science* 364. doi:10.1126/science.aau3644.
- Hanz, S., and Fainzilber, M. (2006). Retrograde signaling in injured nerve--the axon reaction revisited. *J. Neurochem.* 99, 13–19.
- Hanz, S., Perlson, E., Willis, D., Zheng, J.-Q., Massarwa, R. 'ada, Huerta, J. J., *et al.* (2003). Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron* 40, 1095–1104.
- Heine, P., Ehrlicher, A., and Käs, J. (2015). Neuronal and metastatic cancer cells: Unlike brothers. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 3126–3131.
- He, Q., Yu, F., Cong, M., Ji, Y., Zhang, Q., and Ding, F. (2021). Comparative Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins between Injured Sensory and Motor Nerves after Peripheral Nerve Transection. *J. Proteome Res.* 20, 1488–1508.
- He, Z., and Jin, Y. (2016). Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron* 90, 437–451.
- Heo, S., Diering, G. H., Na, C. H., Nirujogi, R. S., Bachman, J. L., Pandey, A., *et al.* (2018). Identification of long-lived synaptic proteins by proteomic analysis of synaptosome protein turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E3827–E3836.
- Herrmann, H., and Aebi, U. (2016). Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8. doi:10.1101/cshperspect.a018242.
- Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68, 610–638.
- Holt, C. E., Martin, K. C., and Schuman, E. M. (2019). Local translation in neurons: visualization and function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 557–566.

- Hörnberg, H., and Holt, C. (2013). RNA-binding proteins and translational regulation in axons and growth cones. *Front. Neurosci.* 7, 81.
- Hsieh, S. T., Kidd, G. J., Crawford, T. O., Xu, Z., Lin, W. M., Trapp, B. D., *et al.* (1994). Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J. Neurosci.* 14, 6392–6401.
- Hu, X.-P., Dourado, H., Schubert, P., and Lercher, M. J. (2020). The protein translation machinery is expressed for maximal efficiency in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* 11, 5260.
- Hughes, A. J., Spelke, D. P., Xu, Z., Kang, C.-C., Schaffer, D. V., and Herr, A. E. (2014). Single-cell western blotting. *Nat. Methods* 11, 749–755.
- Jarlstedt, J., and -O. Karlsson, J. (1973). Evidence for axonal transport of RNA in mammalian neurons. *Experimental Brain Research* 16, 501–506. doi:10.1007/bf00234476.
- Jiang, Y., Zhao, S., Ding, Y., Nong, L., Li, H., Gao, G., *et al.* (2017). MicroRNA-21 promotes neurite outgrowth by regulating PDCD4 in a rat model of spinal cord injury. *Mol. Med. Rep.* 16, 2522–2528.
- Jiménez-Díaz, L., Géranton, S. M., Passmore, G. M., Leith, J. L., Fisher, A. S., Berliocchi, L., *et al.* (2008). Local translation in primary afferent fibers regulates nociception. *PLoS One* 3, e1961.
- Jobert, L., Argentini, M., and Tora, L. (2009). PRMT1 mediated methylation of TAF15 is required for its positive gene regulatory function. *Exp. Cell Res.* 315, 1273–1286.
- Jung, H., and Holt, C. E. (2011). Local translation of mRNAs in neural development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2, 153–165. doi:10.1002/wrna.53.
- Jung, H., O'Hare, C. M., and Holt, C. E. (2011). Translational regulation in growth cones. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 458–464.
- Jung, H., Yoon, B. C., and Holt, C. E. (2012). Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 308–324.
- Kang, C.-C., Yamauchi, K. A., Vlassakis, J., Sinkala, E., Duncombe, T. A., and Herr, A. E. (2016). Single cell-resolution western blotting. *Nat. Protoc.* 11, 1508–1530.
- Kapeli, K., Martinez, F. J., and Yeo, G. W. (2017). Genetic mutations in RNA-binding proteins and their roles in ALS. *Human Genetics* 136, 1193–1214. doi:10.1007/s00439-017-1830-7.
- Kar, A. N., Lee, S.-J., Sahoo, P. K., Thames, E., Yoo, S., Houle, J. D., *et al.* (2021). MicroRNAs 21 and 199a-3p regulate axon growth potential through modulation of Pten and mTor mRNAs. *eneuro*, ENEURO.0155–21.2021. doi:10.1523/eneuro.0155-21.2021.
- Khalil, B., Morderer, D., Price, P. L., Liu, F., and Rossoll, W. (2018). mRNP assembly, axonal transport, and local translation in neurodegenerative diseases. *Brain Res.* 1693, 75–91.
- Kim, E., and Jung, H. (2015). Local protein synthesis in neuronal axons: why and how we study. *BMB Rep.* 48, 139–146.



- Kim, J. H., and Richter, J. D. (2006). Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol. Cell* 24, 173–183.
- Kindler, S., and Kreienkamp, H.-J. (2012). Dendritic mRNA Targeting and Translation. *Synaptic Plasticity*, 285–305. doi:10.1007/978-3-7091-0932-8\_13.
- Koenig, E. (1965a). SYNTHETIC MECHANISMS IN THE AXON. II. RNA IN MYELIN-FREE AXONS OF THE CAT. *J. Neurochem.* 12, 357–361.
- Koenig, E. (1965b). SYNTHETIC MECHANISMS IN THE AXON. I. LOCAL AXONAL SYNTHESIS OF ACETYLCHOLINESTERASE. *J. Neurochem.* 12, 343–355.
- Koenig, E. (1967a). Synthetic mechanisms in the axon. 3. Stimulation of acetylcholinesterase synthesis by actinomycin-D in the hypoglossal nerve. *J. Neurochem.* 14, 429–435.
- Koenig, E. (1967b). SYNTHETIC MECHANISMS IN THE AXON?IV. *IN VITRO* INCORPORATION OF [3H]PRECURSORS INTO AXONAL PROTEIN AND RNA. *Journal of Neurochemistry* 14, 437–446. doi:10.1111/j.1471-4159.1967.tb09542.x.
- Koenig, E. (1991). Evaluation of local synthesis of axonal proteins in the goldfish Mauthner cell axon and axons of dorsal and ventral roots of the rat *in vitro*. *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 384–394.
- Koenig, E., and Giuditta, A. (1999). Protein-synthesizing machinery in the axon compartment. *Neuroscience* 89, 5–15.
- Koenig, E., and Koelle, G. B. (1960). Acetylcholinesterase regeneration in peripheral nerve after irreversible inactivation. *Science* 132, 1249–1250.
- Koenig, E., and Martin, R. (1996). Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *J. Neurosci.* 16, 1400–1411.
- Koenig, E., Martin, R., Titmus, M., and Sotelo-Silveira, J. R. (2000). Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J. Neurosci.* 20, 8390–8400.
- Koley, S., Rozenbaum, M., Fainzilber, M., and Terenzio, M. (2019). Translating regeneration: Local protein synthesis in the neuronal injury response. *Neurosci. Res.* 139, 26–36.
- Kos, A., de Mooij-Malsen, A. J., van Bokhoven, H., Kaplan, B. B., Martens, G. J., Kolk, S. M., *et al.* (2017a). MicroRNA-338 modulates cortical neuronal placement and polarity. *RNA Biol.* 14, 905–913.
- Kos, A., Klein-Gunnewiek, T., Meinhardt, J., Loohuis, N. F. M. O., van Bokhoven, H., Kaplan, B. B., *et al.* (2017b). MicroRNA-338 Attenuates Cortical Neuronal Outgrowth by Modulating the Expression of Axon Guidance Genes. *Mol. Neurobiol.* 54, 3439–3452.
- Kosik, K. S. (2016). Life at Low Copy Number: How Dendrites Manage with So Few mRNAs. *Neuron* 92, 1168–1180.
- Krichevsky, A. M., and Kosik, K. S. (2001). Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32, 683–696.

- Kuchina, A., Brettner, L. M., Paleologu, L., Roco, C. M., Rosenberg, A. B., Carignano, A., *et al.* (2021). Microbial single-cell RNA sequencing by split-pool barcoding. *Science* 371. doi:10.1126/science.aba5257.
- Kun, A., Otero, L., Sotelo-Silveira, J. R., and Sotelo, J. R. (2007). Ribosomal distributions in axons of mammalian myelinated fibers. *J. Neurosci. Res.* 85, 2087–2098.
- Laloux, G., and Jacobs-Wagner, C. (2014). How do bacteria localize proteins to the cell pole? *Journal of Cell Science* 127, 11–19. doi:10.1242/jcs.138628.
- Landgraf, P., Antileo, E. R., Schuman, E. M., and Dieterich, D. C. (2015). BONCAT: metabolic labeling, click chemistry, and affinity purification of newly synthesized proteomes. *Methods Mol. Biol.* 1266, 199–215.
- Lankat-Buttgereit, B., and Göke, R. (2009). The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol. Cell* 101, 309–317.
- Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149, 274–293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
- Lasek, R. J., Dabrowski, C., and Nordlander, R. (1973). Analysis of axoplasmic RNA from invertebrate giant axons. *Nat. New Biol.* 244, 162–165.
- Lasek, R. J., Gainer, H., and Barker, J. L. (1977). Cell-to-cell transfer of glial proteins to the squid giant axon: The glia- neuron protein transfer hypothesis. *The Journal of Cell Biology* 74, 501–523. doi:10.1083/jcb.74.2.501.
- Latosinska, A., Vougas, K., Makridakis, M., Klein, J., Mullen, W., Abbas, M., *et al.* (2015). Comparative Analysis of Label-Free and 8-Plex *iTRAQ* Approach for Quantitative Tissue Proteomic Analysis. *PLoS One* 10, e0137048.
- Lein, E., Borm, L. E., and Linnarsson, S. (2017). The promise of spatial transcriptomics for neuroscience in the era of molecular cell typing. *Science* 358, 64–69.
- Lindwall, C., and Kanje, M. (2005). Retrograde axonal transport of JNK signaling molecules influence injury induced nuclear changes in p-c-Jun and ATF3 in adult rat sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 269–282.
- Liu, Z., Jin, Y.-Q., Chen, L., Wang, Y., Yang, X., Cheng, J., *et al.* (2015). Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture *in vitro*. *PLoS One* 10, e0123278.
- Li, Y., Jia, Y., Wang, D., Zhuang, X., Li, Y., Guo, C., *et al.* (2020). Programmed Cell Death 4 as an endogenous suppressor of BDNF translation is involved in stress-induced depression. *Mol. Psychiatry*. doi:10.1038/s41380-020-0692-x.
- Li, Y., Jung, P., and Brown, A. (2012). Axonal transport of neurofilaments: a single population of intermittently moving polymers. *J. Neurosci.* 32, 746–758.
- Loh, P. G., Yang, H.-S., Walsh, M. A., Wang, Q., Wang, X., Cheng, Z., *et al.* (2009). Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor Pcd4. *EMBO J.* 28, 274–285.
- López-Erauskin, J., Tadokoro, T., Baughn, M. W., Myers, B., McAlonis-Downes, M., Chillón-Marinas, C., *et al.* (2018). ALS/FTD-Linked Mutation in FUS Suppresses Intra-axonal

- Protein Synthesis and Drives Disease Without Nuclear Loss-of-Function of FUS. *Neuron* 100, 816–830.e7. doi:10.1016/j.neuron.2018.09.044.
- Lopez-Verrilli, M. A., and Court, F. A. (2012). Transfer of vesicles from schwann cells to axons: a novel mechanism of communication in the peripheral nervous system. *Front. Physiol.* 3, 205.
- Lucci, C., Mesquita-Ribeiro, R., Rathbone, A., and Dajas-Bailador, F. (2020). Spatiotemporal regulation of GSK3 $\beta$  levels by miRNA-26a controls axon development in cortical neurons. *Development* 147. doi:10.1242/dev.180232.
- Luo, X., Ribeiro, M., Bray, E. R., Lee, D.-H., Yungger, B. J., Mehta, S. T., *et al.* (2016). Enhanced Transcriptional Activity and Mitochondrial Localization of STAT3 Co-induce Axon Regrowth in the Adult Central Nervous System. *Cell Rep.* 15, 398–410.
- Maday, S., Twelvetrees, A. E., Moughamian, A. J., and Holzbaur, E. L. F. (2014). Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron* 84, 292–309.
- MAHAr, M., and Cavalli, V. (2018). Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 323–337.
- Manecka, D.-L., Mahmood, S. F., Grumolato, L., Lihmann, I., and Anouar, Y. (2013). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) promotes both survival and neuritogenesis in PC12 cells through activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway: involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK), calcium, and c-REL. *J. Biol. Chem.* 288, 14936–14948.
- Mathieson, T., Franken, H., Kosinski, J., Kurzawa, N., Zinn, N., Sweetman, G., *et al.* (2018). Systematic analysis of protein turnover in primary cells. *Nat. Commun.* 9, 689.
- Mathur, C., Johnson, K. R., Tong, B. A., Miranda, P., Srikumar, D., Basilio, D., *et al.* (2018). Demonstration of ion channel synthesis by isolated squid giant axon provides functional evidence for localized axonal membrane protein translation. *Sci. Rep.* 8, 2207.
- Matsushashi, S., Manirujjaman, M., Hamajima, H., and Ozaki, I. (2019). Control Mechanisms of the Tumor Suppressor PDCD4: Expression and Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 20. doi:10.3390/ijms20092304.
- McClintock, M. A., Dix, C. I., Johnson, C. M., McLaughlin, S. H., Maizels, R. J., Hoang, H. T., *et al.* (2018). RNA-directed activation of cytoplasmic dynein-1 in reconstituted transport RNPs. *Elife* 7. doi:10.7554/eLife.36312.
- Mehta, S. T., Luo, X., Park, K. K., Bixby, J. L., and Lemmon, V. P. (2016). Hyperactivated Stat3 boosts axon regeneration in the CNS. *Exp. Neurol.* 280, 115–120.
- Michaelevski, I., Medzihradzky, K. F., Lynn, A., Burlingame, A. L., and 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., Medzihradzky, K. F., Lynn, A., Burlingame, A. L., and Fainzilber, M. (2010b). Axonal transport proteomics reveals mobilization of translation machinery to the lesion site in injured sciatic nerve. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 976–987.

- Miedema, A., Wijering, M. H. C., Eggen, B. J. L., and Kooistra, S. M. (2020). High-Resolution Transcriptomic and Proteomic Profiling of Heterogeneity of Brain-Derived Microglia in Multiple Sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 583811.
- Millecamps, S., Gowing, G., Corti, O., Mallet, J., and Julien, J.-P. (2007). Conditional NF-L transgene expression in mice for *in vivo* analysis of turnover and transport rate of neurofilaments. *J. Neurosci.* 27, 4947–4956.
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J. K., Jones, Y., Martone, M. E., and Mayford, M. (2002). Disruption of dendritic translation of CaMKII $\alpha$  impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36, 507–519.
- Minis, A., DAHary, D., Manor, O., Leshkowitz, D., Pilpel, Y., and Yaron, A. (2014). Subcellular transcriptomics-dissection of the mRNA composition in the axonal compartment of sensory neurons. *Dev. Neurobiol.* 74, 365–381.
- Mofatteh, M., and Bullock, S. L. (2017). SnapShot: Subcellular mRNA Localization. *Cell* 169, 178–178.e1.
- Moon, S. L., Morisaki, T., Khong, A., Lyon, K., Parker, R., and Stasevich, T. J. (2019). Multicolour single-molecule tracking of mRNA interactions with RNP granules. *Nat. Cell Biol.* 21, 162–168.
- Moradi, M., Sivadasan, R., Saal, L., Lüningschrör, P., Dombert, B., Rathod, R. J., *et al.* (2017). Differential roles of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -actin in axon growth and collateral branch formation in motoneurons. *J. Cell Biol.* 216, 793–814.
- Mu, Q., Chen, Y., and Wang, J. (2019). Deciphering Brain Complexity Using Single-cell Sequencing. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 17, 344–366.
- Müller, K., Schnatz, A., Schillner, M., Woertge, S., Müller, C., von Graevenitz, I., *et al.* (2018). A predominantly glial origin of axonal ribosomes after nerve injury. *Glia* 66, 1591–1610.
- Murray, J. T., and Tee, A. R. (2018). Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) in the Cancer Setting. *Cancers* 10. doi:10.3390/cancers10060168.
- Nalavadi, V. C., Griffin, L. E., Picard-Fraser, P., Swanson, A. M., Takumi, T., and Bassell, G. J. (2012). Regulation of zipcode binding protein 1 transport dynamics in axons by myosin Va. *J. Neurosci.* 32, 15133–15141.
- Narasimhan, M., Rathinam, M., Riar, A., Patel, D., Mummidi, S., Yang, H.-S., *et al.* (2013). *Programmed Cell Death 4* (PDCD4): a novel player in ethanol-mediated suppression of protein translation in primary cortical neurons and developing cerebral cortex. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 37, 96–109.
- Natera-Naranjo, O., Aschrafi, A., Gioio, A. E., and Kaplan, B. B. (2010). Identification and quantitative analyses of microRNAs located in the distal axons of sympathetic neurons. *RNA* 16, 1516–1529.
- Nédelec, S., Peljto, M., Shi, P., Amoroso, M. W., Kam, L. C., and Wichterle, H. (2012). Concentration-dependent requirement for local protein synthesis in motor neuron subtype-specific response to axon guidance cues. *J. Neurosci.* 32, 1496–1506.

- Nevo-Dinur, K., Nussbaum-Shochat, A., Ben-Yehuda, S., and Amster-Choder, O. (2011). Translation-independent localization of mRNA in *E. coli*. *Science* 331, 1081–1084.
- Nixon, R. A., Lewis, S. E., Mercken, M., and Sihag, R. K. (1994a). [32P]orthophosphate and [35S]methionine label separate pools of neurofilaments with markedly different axonal transport kinetics in mouse retinal ganglion cells *in vivo*. *Neurochem. Res.* 19, 1445–1453.
- Nixon, R. A., and Logvinenko, K. B. (1986). Multiple fates of newly synthesized neurofilament proteins: evidence for a stationary neurofilament network distributed nonuniformly along axons of retinal ganglion cell neurons. *J. Cell Biol.* 102, 647–659.
- Nixon, R. A., Paskevich, P. A., Sihag, R. K., and Thayer, C. Y. (1994b). Phosphorylation on carboxyl terminus domains of neurofilament proteins in retinal ganglion cell neurons *in vivo*: influences on regional neurofilament accumulation, interneurofilament spacing, and axon caliber. *J. Cell Biol.* 126, 1031–1046.
- Nixon, R., and Sihag, R. (1991). Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends in Neurosciences* 14, 501–506. doi:10.1016/0166-2236(91)90062-y.
- Obara, I., Géranton, S. M., and Hunt, S. P. (2012). Axonal protein synthesis: a potential target for pain relief? *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 42–48.
- Ohtake, Y., Hayat, U., and Li, S. (2015). PTEN inhibition and axon regeneration and neural repair. *Neural Regeneration Res.* 10, 1363–1368.
- Ostroff, L. E., Santini, E., Sears, R., Deane, Z., Kanadia, R. N., LeDoux, J. E., *et al.* (2019). Axon TRAP reveals learning-associated alterations in cortical axonal mRNAs in the lateral amygdala. *Elife* 8. doi:10.7554/eLife.51607.
- Ouwenga, R., Lake, A. M., O'Brien, D., Mogha, A., Dani, A., and Dougherty, J. D. (2017). Transcriptomic Analysis of Ribosome-Bound mRNA in Cortical Neurites. *J. Neurosci.* 37, 8688–8705.
- Palay, S. L., and Palade, G. E. (1955). THE FINE STRUCTURE OF NEURONS. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1, 69–88. doi:10.1083/jcb.1.1.69.
- Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Kanter, J. L., and He, Z. (2010). PTEN/mTOR and axon regeneration. *Exp. Neurol.* 223, 45–50.
- Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P. D., Wang, C., Cai, B., *et al.* (2008). Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* 322, 963–966.
- Patrón, L. A., and Zinsmaier, K. E. (2016). Mitochondria on the Road to Power Axonal Regeneration. *Neuron* 92, 1152–1154.
- Perez, J. D., Dieck, S. T., Alvarez-Castelao, B., Tushev, G., Chan, I. C., and Schuman, E. M. (2021). Subcellular sequencing of single neurons reveals the dendritic transcriptome of GABAergic interneurons. *Elife* 10. doi:10.7554/eLife.63092.
- Perlson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R., and Fainzilber, M. (2005). Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 45, 715–726.

- Perry, R. B., and Fainzilber, M. (2014). Local translation in neuronal processes--*in vivo* tests of a "heretical hypothesis." *Dev. Neurobiol.* 74, 210–217.
- Perry, R. B.-T., Doron-Mandel, E., Iavnilovitch, E., Rishal, I., Dagan, S. Y., Tsoory, M., *et al.* (2012). Subcellular *knockout* of importin  $\beta$ 1 perturbs axonal retrograde signaling. *Neuron* 75, 294–305.
- Pfeiffer, B. E., and Huber, K. M. (2006). Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 26, 7147–7150.
- Pushpalatha, K. V., and Besse, F. (2019). Local Translation in Axons: When Membraneless RNP Granules Meet Membrane-Bound Organelles. *Front Mol Biosci* 6, 129.
- Rangaraju, V., Tom Dieck, S., and Schuman, E. M. (2017). Local translation in neuronal compartments: how local is local? *EMBO Rep.* 18, 693–711.
- Rao, M. V., Yuan, A., Campbell, J., Kumar, A., and Nixon, R. A. (2012). The C-terminal domains of NF-H and NF-M subunits maintain axonal neurofilament content by blocking turnover of the stationary neurofilament network. *PLoS One* 7, e44320.
- Rauniyar, N., McClatchy, D. B., and Yates, J. R., 3rd (2013). Stable isotope labeling of mammals (SILAM) for *in vivo* quantitative proteomic analysis. *Methods* 61, 260–268.
- Ravanidis, S., Kattan, F.-G., and Doxakis, E. (2018). Unraveling the Pathways to Neuronal Homeostasis and Disease: Mechanistic Insights into the Role of RNA-Binding Proteins and Associated Factors. *Int. J. Mol. Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19082280.
- Reshetniak, S., Ußling, J.-E., Perego, E., Rammner, B., Schikorski, T., Fornasiero, E. F., *et al.* (2020). A comparative analysis of the mobility of 45 proteins in the synaptic bouton. *EMBO J.* 39, e104596.
- Riar, A. K., Narasimhan, M., Rathinam, M. L., Vedpathak, D., Mummidi, S., Henderson, G. I., *et al.* (2014). Ethanol-induced transcriptional activation of *Programmed Cell Death 4* (*Pdcd4*) is mediated by GSK-3 $\beta$  signaling in rat cortical neuroblasts. *PLoS One* 9, e98080.
- Rishal, I., Michaelevski, I., Rozenbaum, M., Shinder, V., Medzihradzky, K. F., Burlingame, A. L., *et al.* (2010). Axoplasm isolation from peripheral nerve. *Dev. Neurobiol.* 70, 126–133.
- Rotem, N., Magen, I., Ionescu, A., Gershoni-Emek, N., Altman, T., Costa, C. J., *et al.* (2017). ALS Along the Axons - Expression of Coding and Noncoding RNA Differs in Axons of ALS models. *Sci. Rep.* 7, 44500.
- Roth, A. D., Liazoghli, D., Perez De Arce, F., and Colman, D. R. (2013). Septin 7: actin cross-organization is required for axonal association of Schwann cells. *Biol. Res.* 46, 243–249.
- Saal, L., Briese, M., Kneitz, S., Glinka, M., and 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.
- Sahoo, P. K., Smith, D. S., Perrone-Bizzozero, N., and Twiss, J. L. (2018). Axonal mRNA transport and translation at a glance. *Journal of Cell Science* 131, jcs196808. doi:10.1242/jcs.196808.

- Sánchez, I., Hassinger, L., Sihag, R. K., Cleveland, D. W., Mohan, P., and Nixon, R. A. (2000). Local control of neurofilament accumulation during radial growth of myelinating axons *in vivo*. Selective role of site-specific phosphorylation. *J. Cell Biol.* 151, 1013–1024.
- Sasaki, Y. (2020). Local Translation in Growth Cones and Presynapses, Two Axonal Compartments for Local Neuronal Functions. *Biomolecules* 10. doi:10.3390/biom10050668.
- Sasaki, Y., Gross, C., Xing, L., Goshima, Y., and Bassell, G. J. (2014). Identification of axon-enriched microRNAs localized to growth cones of cortical neurons. *Dev. Neurobiol.* 74, 397–406.
- Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C., and Mandel, J. L. (2001). A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8844–8849.
- Schlaepfer, W. W., and Bruce, J. (1990). Neurofilament Proteins Are Distributed in a Diminishing Proximodistal Gradient Along Rat Sciatic Nerve. *Journal of Neurochemistry* 55, 453–460. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb04157.x.
- Schmalbruch, H. (1986). Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat. Rec.* 215, 71–81.
- Schofield, J. P. R., Cowan, J. L., and Coldwell, M. J. (2015). G-quadruplexes mediate local translation in neurons. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 338–342.
- Schuman, E. M. (1999). mRNA Trafficking and Local Protein Synthesis at the Synapse. *Neuron* 23, 645–648. doi:10.1016/s0896-6273(01)80023-4.
- Sheller, R. A., Tytell, M., Smyers, M., and Bittner, G. D. (1995). Glia-to-axon communication: Enrichment of glial proteins transferred to the squid giant axon. *Journal of Neuroscience Research* 41, 324–334. doi:10.1002/jnr.490410305.
- Sherman, D. L., Krols, M., Wu, L.-M. N., Grove, M., Nave, K.-A., Gangloff, Y.-G., *et al.* (2012). Arrest of myelination and reduced axon growth when Schwann cells lack mTOR. *J. Neurosci.* 32, 1817–1825.
- ShibAHara, K., Asano, M., Ishida, Y., Aoki, T., Koike, T., and Honjo, T. (1995). Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death. *Gene* 166, 297–301.
- Shigeoka, T., Jung, H., Jung, J., Turner-Bridger, B., Ohk, J., Lin, J. Q., *et al.* (2016). Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits. *Cell* 166, 181–192.
- Shigeoka, T., Koppers, M., Wong, H. H.-W., Lin, J. Q., Cagnetta, R., Dwivedy, A., *et al.* (2019). On-Site Ribosome Remodeling by Locally Synthesized Ribosomal Proteins in Axons. *Cell Rep.* 29, 3605–3619.e10.
- Shin, J. E., and Cho, Y. (2017). Epigenetic Regulation of Axon Regeneration after Neural Injury. *Mol. Cells* 40, 10–16.
- Singh, P., Wedeken, L., Waters, L. C., Carr, M. D., and Klempnauer, K.-H. (2011). Pcd4 directly binds the coding region of c-myc mRNA and suppresses its translation. *Oncogene* 30, 4864–4873.

- Sleigh, J. N., Tosolini, A. P., Gordon, D., Devoy, A., Fratta, P., Fisher, E. M. C., *et al.* (2020). Mice Carrying ALS Mutant TDP-43, but Not Mutant FUS, Display *In vivo* Defects in Axonal Transport of Signaling Endosomes. *Cell Rep.* 30, 3655–3662.e2.
- Sotelo, J. R., Benech, C. R., and Kun, A. (1992). Local radiolabeling of the 68 kDa neurofilament protein in rat sciatic nerves. *Neurosci. Lett.* 144, 174–176.
- Sotelo, J. R., Canclini, L., Kun, A., Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Cal, K., *et al.* (2014). Glia to axon RNA transfer. *Dev. Neurobiol.* 74, 292–302.
- Sotelo, J. R., Canclini, L., Kun, A., Sotelo-Silveira, J. R., Xu, L., Wallrabe, H., *et al.* (2013). Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from Schwann cells to axons. *PLoS One* 8, e61905.
- Sotelo-Silveira, J., Crispino, M., Puppo, A., Sotelo, J. R., and 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, 545–557.
- Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Cárdenas, M., Koenig, E., and Sotelo, J. R. (2004). Myosin Va and kinesin II motor proteins are concentrated in ribosomal domains (*Periaxoplasmic Ribosomal Plaques*) of myelinated axons. *J. Neurobiol.* 60, 187–196.
- Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Kun, A., Benech, J. C., Sanguinetti, C., Chalar, C., *et al.* (2000). Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve. *J. Neurosci. Res.* 62, 65–74.
- Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Kun, A., Elizondo, V., Canclini, L., and Sotelo, J. R. (2011). Localization of mRNA in vertebrate axonal compartments by *in situ* hybridization. *Methods Mol. Biol.* 714, 125–138.
- Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Kun, A., Koenig, E., and Sotelo, J. R. (2006). RNA Trafficking in Axons. *Traffic* 7, 508–515. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00405.x.
- Sotelo-Silveira, J. R., and Holt, C. E. (2014). Introduction to the *special issue* on local protein synthesis in axons. *Dev. Neurobiol.* 74, 207–209.
- Spaulding, E. L., and Burgess, R. W. (2017). Accumulating Evidence for Axonal Translation in Neuronal Homeostasis. *Front. Neurosci.* 11, 312.
- Specht, H., Emmott, E., Petelski, A. A., Huffman, R. G., Perlman, D. H., Serra, M., *et al.* (2021). Single-cell proteomic and transcriptomic analysis of macrophage heterogeneity using SCoPE2. *Genome Biol.* 22, 50.
- Spillane, M., Ketschek, A., Donnelly, C. J., Pacheco, A., Twiss, J. L., and Gallo, G. (2012). Nerve growth factor-induced formation of axonal filopodia and collateral branches involves the intra-axonal synthesis of regulators of the actin-nucleating Arp2/3 complex. *J. Neurosci.* 32, 17671–17689.
- Spillane, M., Ketschek, A., Merianda, T. T., Twiss, J. L., and Gallo, G. (2013). Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis. *Cell Rep.* 5, 1564–1575.



- Steward, O., and Falk, P. M. (1986). Protein-synthetic machinery at postsynaptic sites during synaptogenesis: a quantitative study of the association between polyribosomes and developing synapses. *J. Neurosci.* 6, 412–423.
- Steward, O., and Levy, W. B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 2, 284–291.
- Steward, O., and Schuman, E. M. (2001). Protein Synthesis at Synaptic Sites on Dendrites. *Annual Review of Neuroscience* 24, 299–325. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.299.
- Strickland, I. T., Richards, L., Holmes, F. E., Wynick, D., Uney, J. B., and Wong, L.-F. (2011). Axotomy-induced miR-21 promotes axon growth in adult dorsal root ganglion neurons. *PLoS One* 6, e23423.
- Subramanian, M., Rage, F., Tabet, R., Flatter, E., Mandel, J.-L., and Moine, H. (2011). G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Rep.* 12, 697–704.
- Sutton, M. A., and Schuman, E. M. (2005). Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J. Neurobiol.* 64, 116–131.
- Suzuki, C., Garces, R. G., Edmonds, K. A., Hiller, S., Hyberts, S. G., Marintchev, A., *et al.* (2008). PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3274–3279.
- Taliaferro, J. M., Vidaki, M., Oliveira, R., Olson, S., Zhan, L., Saxena, T., *et al.* (2016). Distal Alternative Last Exons Localize mRNAs to Neural Projections. *Mol. Cell* 61, 821–833.
- Taylor, A. M., Berchtold, N. C., Perreau, V. M., Tu, C. H., Li Jeon, N., and Cotman, C. W. (2009). Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. *J. Neurosci.* 29, 4697–4707.
- Taylor, A. M., Blurton-Jones, M., Rhee, S. W., Cribbs, D. H., Cotman, C. W., and Jeon, N. L. (2005). A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods* 2, 599–605.
- Taylor, A. M., and Jeon, N. L. (2011). Microfluidic and compartmentalized platforms for neurobiological research. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 39, 185–200.
- Terenzio, M., Koley, S., Samra, N., Rishal, I., Zhao, Q., Sahoo, P. K., *et al.* (2018). Locally translated mTOR controls axonal local translation in nerve injury. *Science* 359, 1416–1421.
- Thelen, M. P., and Kye, M. J. (2019). The Role of RNA Binding Proteins for Local mRNA Translation: Implications in Neurological Disorders. *Front Mol Biosci* 6, 161.
- Tom Dieck, S., Hanus, C., and Schuman, E. M. (2014). SnapShot: local protein translation in dendrites. *Neuron* 81, 958–958.e1.
- tom Dieck, S., Kochen, L., Hanus, C., Heumüller, M., Bartnik, I., Nassim-Assir, B., *et al.* (2015). Direct visualization of newly synthesized target proteins *in situ*. *Nat. Methods* 12, 411–414.
- Torre, E. R., and Steward, O. (1992). Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from

- their cell bodies. *J. Neurosci.* 12, 762–772.
- Tóth, E. N., Lohith, A., Mondal, M., Guo, J., Fukamizu, A., and Pourmand, N. (2018). Single-cell nanobiopsy reveals compartmentalization of mRNAs within neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 293, 4940–4951.
- Turner-Bridger, B., Caterino, C., and Cioni, J.-M. (2020). Molecular mechanisms behind mRNA localization in axons. *Open Biol.* 10, 200177.
- Twiss, J. L., Kalinski, A. L., Sachdeva, R., and Houle, J. D. (2016). Intra-axonal protein synthesis - a new target for neural repair? *Neural Regeneration Res.* 11, 1365–1367.
- Twiss, J. L., Smith, D. S., Chang, B., and Shooter, E. M. (2000). Translational control of ribosomal protein L4 mRNA is required for rapid neurite regeneration. *Neurobiol. Dis.* 7, 416–428.
- Uchida, A., and Brown, A. (2021). Regulation of neurofilament length and transport by a dynamic cycle of polymer severing and annealing. *bioRxiv*. doi:10.1101/2021.01.17.427018.
- Urbanska, A. S., Janusz-Kaminska, A., Switon, K., Hawthorne, A. L., Perycz, M., Urbanska, M., *et al.* (2017). ZBP1 phosphorylation at serine 181 regulates its dendritic transport and the development of dendritic trees of hippocampal neurons. *Sci. Rep.* 7, 1876.
- Verma, P., Chierzi, S., Codd, A. M., Campbell, D. S., Meyer, R. L., Holt, C. E., *et al.* (2005). Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J. Neurosci.* 25, 331–342.
- Wang, B., and Bao, L. (2017). Axonal microRNAs: localization, function and regulatory mechanism during axon development. *J. Mol. Cell Biol.* 9, 82–90.
- Wang, Q., Zhu, J., Wang, Y.-W., Dai, Y., Wang, Y.-L., Wang, C., *et al.* (2017). Tumor suppressor Pdc4 attenuates Sin1 translation to inhibit invasion in colon carcinoma. *Oncogene* 36, 6225–6234.
- Wang, X., Chen, Q., Yi, S., Liu, Q., Zhang, R., Wang, P., *et al.* (2019). Correction: The microRNAs let-7 and miR-9 down-regulate the axon-guidance genes Ntn1 and Dcc during peripheral nerve regeneration. *Journal of Biological Chemistry* 294, 6695–6695. doi:10.1074/jbc.aac119.008724.
- Wang, X., and Proud, C. G. (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology* 21, 362–369.
- Waylen, L. N., Nim, H. T., Martelotto, L. G., and Ramialison, M. (2020). From whole-mount to single-cell spatial assessment of gene expression in 3D. *Commun Biol* 3, 602.
- Wedeken, L., Singh, P., and Klempnauer, K.-H. (2011). Tumor suppressor protein Pdc4 inhibits translation of p53 mRNA. *J. Biol. Chem.* 286, 42855–42862.
- Weiss, P., and Hiscoe, H. B. (1948). Experiments on the mechanism of nerve growth. *Journal of Experimental Zoology* 107, 315–395. doi:10.1002/jez.1401070302.
- Welshhans, K., and Bassell, G. J. (2011). Netrin-1-induced local  $\beta$ -actin synthesis and growth

- cone guidance requires zipcode binding protein 1. *J. Neurosci.* 31, 9800–9813.
- Willis, D. E., and Twiss, J. L. (2011). Profiling axonal mRNA transport. *Methods Mol. Biol.* 714, 335–352.
- Willis, D. E., van Niekerk, E. A., Sasaki, Y., Mesngon, M., Merianda, T. T., Williams, G. G., *et al.* (2007). Extracellular stimuli specifically regulate localized levels of individual neuronal mRNAs. *J. Cell Biol.* 178, 965–980.
- Willis, D., Li, K. W., Zheng, J.-Q., Chang, J. H., Smit, A. B., Kelly, T., *et al.* (2005). Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J. Neurosci.* 25, 778–791.
- Wu, D., Lee, S., Luo, J., Xia, H., Gushchina, S., Richardson, P. M., *et al.* (2018). Intraneural Injection of ATP Stimulates Regeneration of Primary Sensory Axons in the Spinal Cord. *J. Neurosci.* 38, 1351–1365.
- Yang, H.-S., Jansen, A. P., Komar, A. A., Zheng, X., Merrick, W. C., Costes, S., *et al.* (2003). The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 26–37.
- Yasuda, K., and Mili, S. (2016). Dysregulated axonal RNA translation in amyotrophic lateral sclerosis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 7, 589–603.
- Yoo, S., van Niekerk, E. A., Merianda, T. T., and Twiss, J. L. (2010). Dynamics of axonal mRNA transport and implications for peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 223, 19–27.
- Yuan, A., Mills, R. G., Chia, C. P., and Bray, J. J. (2000). Tubulin and neurofilament proteins are transported differently in axons of chicken motoneurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20, 623–632.
- Yuan, A., Rao, M. V., Kumar, A., Julien, J.-P., and Nixon, R. A. (2003). Neurofilament transport *in vivo* minimally requires hetero-oligomer formation. *J. Neurosci.* 23, 9452–9458.
- Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, and Nixon, R. A. (2017). Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9. doi:10.1101/cshperspect.a018309.
- Yuan, A., Sasaki, T., Rao, M. V., Kumar, A., Kanumuri, V., Dunlop, D. S., *et al.* (2009). Neurofilaments Form a Highly Stable Stationary Cytoskeleton after Reaching a Critical Level in Axons. *Journal of Neuroscience* 29, 11316–11329. doi:10.1523/jneurosci.1942-09.2009.
- Yudin, D., Hanz, S., Yoo, S., Iavnilovitch, E., Willis, D., Gradus, T., *et al.* (2008). Localized regulation of axonal RanGTPase controls retrograde injury signaling in peripheral nerve. *Neuron* 59, 241–252.
- Zahr, S. K., Yang, G., Kazan, H., Borrett, M. J., Yuzwa, S. A., Voronova, A., *et al.* (2018). A Translational Repression Complex in Developing Mammalian Neural Stem Cells that Regulates Neuronal Specification. *Neuron* 97, 520–537.e6.
- Zappulo, A., van den Bruck, D., Ciolli Mattioli, C., Franke, V., Imami, K., McShane, E., *et al.* (2017). RNA localization is a key determinant of neurite-enriched proteome. *Nat. Commun.* 8, 583.

- Zhang, K. X., Tan, L., Pellegrini, M., Zipursky, S. L., and McEwen, J. M. (2016). Rapid Changes in the Translatome during the Conversion of Growth Cones to Synaptic Terminals. *Cell Rep.* 14, 1258–1271.
- Zheng, J. Q., Kelly, T. K., Chang, B., Ryazantsev, S., Rajasekaran, A. K., Martin, K. C., *et al.* (2001). A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. *J. Neurosci.* 21, 9291–9303.
- Zivraj, K. H., Tung, Y. C. L., Piper, M., Gumy, L., Fawcett, J. W., Yeo, G. S. H., *et al.* (2010). Subcellular profiling reveals distinct and developmentally regulated repertoire of growth cone mRNAs. *J. Neurosci.* 30, 15464–15478.

## **9) ANEXOS**

### **9.1) Anexo 1.**

#### **ARTÍCULO III. Functional Genomics of Axons and Synapses to Understand Neurodegenerative Diseases.**

*Contribuciones Específicas. Esta revisión forma parte de un special issue de la revista Frontiers in Cellular Neuroscience (para el cual fue invitado nuestro grupo) cuya temática central es los mecanismos moleculares detrás de los procesos que gobiernan la degeneración sináptica y axonal en enfermedades neurodegenerativas. El editor de esta publicación fue el PhD. Nicolas Unsain del Medical Research Institute Mercedes and Martín Ferreyra (INIMEC) en Córdoba, Argentina. La búsqueda de bibliografía en torno al tema tratado en el artículo se realizó junto al Lic. Joaquín Garat. El manuscrito fue escrito por mi, corregido por el PhD. José Sotelo Silveira y con aportes del resto de los co-autores, cada uno en sus áreas de expertise específicas. Las Figuras 1 y 2 fueron realizadas por mi y las Tablas 1-4 fueron confeccionadas junto al Lic. Joaquín Garat.*



# Functional Genomics of Axons and Synapses to Understand Neurodegenerative Diseases

Andres Di Paolo<sup>1,2</sup>, Joaquin Garat<sup>1</sup>, Guillermo Eastman<sup>1</sup>, Joaquina Farias<sup>1,3</sup>, Federico Dajas-Bailador<sup>4</sup>, Pablo Smircich<sup>1,5</sup> and José Roberto Sotelo-Silveira<sup>1,6\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay, <sup>2</sup>Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay, <sup>3</sup>Polo de Desarrollo Universitario "Espacio de Biología Vegetal del Noreste", Centro Universitario Regional Noreste, Universidad de la República (UdelaR), Tacuarembó, Uruguay, <sup>4</sup>School of Life Sciences, Medical School Building, University of Nottingham, Nottingham, United Kingdom, <sup>5</sup>Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay, <sup>6</sup>Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Nicolas Unsain,  
Medical Research Institute Mercedes  
and Martin Ferreyra (INIMEC),  
Argentina

### Reviewed by:

Michael J. Gandal,  
University of Pennsylvania,  
United States  
Bogdan O. Popescu,  
Carol Davila University of Medicine  
and Pharmacy, Romania  
Etienne Herzog,  
Centre National de la Recherche  
Scientifique (CNRS), France

### \*Correspondence:

José Roberto Sotelo-Silveira  
jsotelosilveira@iibce.edu.uy;  
sotelajos@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cellular Neuropathology,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 27 March 2021

Accepted: 02 June 2021

Published: 25 June 2021

### Citation:

Di Paolo A, Garat J, Eastman G,  
Farias J, Dajas-Bailador F, Smircich P  
and Sotelo-Silveira JR (2021)  
Functional Genomics of Axons  
and Synapses to Understand  
Neurodegenerative Diseases.  
Front. Cell. Neurosci. 15:686722.  
doi: 10.3389/fncel.2021.686722

Functional genomics studies through transcriptomics, translomics and proteomics have become increasingly important tools to understand the molecular basis of biological systems in the last decade. In most cases, when these approaches are applied to the nervous system, they are centered in cell bodies or somatodendritic compartments, as these are easier to isolate and, at least *in vitro*, contain most of the mRNA and proteins present in all neuronal compartments. However, key functional processes and many neuronal disorders are initiated by changes occurring far away from cell bodies, particularly in axons (axopathologies) and synapses (synaptopathies). Both neuronal compartments contain specific RNAs and proteins, which are known to vary depending on their anatomical distribution, developmental stage and function, and thus form the complex network of molecular pathways required for neuron connectivity. Modifications in these components due to metabolic, environmental, and/or genetic issues could trigger or exacerbate a neuronal disease. For this reason, detailed profiling and functional understanding of the precise changes in these compartments may thus yield new insights into the still intractable molecular basis of most neuronal disorders. In the case of synaptic dysfunctions or synaptopathies, they contribute to dozens of diseases in the human brain including neurodevelopmental (i.e., autism, Down syndrome, and epilepsy) as well as neurodegenerative disorders (i.e., Alzheimer's and Parkinson's diseases). Histological, biochemical, cellular, and general molecular biology techniques have been key in understanding these pathologies. Now, the growing number of omics approaches can add significant extra information at a high and wide resolution level and, used effectively, can lead to novel and insightful interpretations of the biological processes at play. This review describes current approaches that use transcriptomics, translomics and proteomic related methods to analyze the axon and presynaptic elements, focusing on the relationship that axon and synapses have with neurodegenerative diseases.

**Keywords:** axon, presynaptic compartment, transcriptomics, translomics, proteomics, axopathologies, synaptopathies, neurodegenerative diseases

## INTRODUCTION

Neurons are considered the most diverse class of cells known in nature (Terenzio et al., 2017), having specialized and polarized morphologies where at least five compartments can be found: cell body, dendrites, axon, presynaptic and postsynaptic domains. In addition, and although in the extracellular space, the narrow space between the pre and postsynapses defines the synaptic cleft which is also focus of major interest in order to understand the plasticity process involved in neuronal communications (Burch et al., 2017).

Particularly in the case of axons, the most evident feature is their length, which in mammal neurons could be up to five orders of magnitude larger than cell body diameters (Terenzio et al., 2017). This extraordinary characteristic requires specific and highly specialized molecular mechanisms to maintain functionality and communication with the cell body and its surrounding environment. It is known that the passive diffusion transport, which has a distance range limited to tens of micrometers at most (Kholodenko, 2003; Wiegert et al., 2007; Maday et al., 2014), and the fast and slow transport -which are the axonal main supply mechanisms- are not sufficient to ensure communication and maintenance in regions far away from cell bodies (Alvarez and Torres, 1985). Instead, pioneering studies (Koenig, 1967; Giuditta et al., 1968) and subsequent ones to the present have confirmed that axonal local protein synthesis (LPS) (Tobias and Koenig, 1975; Bassell et al., 1998; Twiss et al., 2000; Zheng et al., 2001; Verma et al., 2005; Willis et al., 2005; Shigeoka et al., 2016; Hafner et al., 2019) and *glia to axon* RNA and protein transfer (Lasek et al., 1977; Buchheit and Tytell, 1992; Sheller et al., 1995; Court et al., 2008; Lopez-Verrilli and Court, 2012; Sotelo et al., 2013, 2014; Canclini et al., 2020) are additional mechanisms relevant for axon growth (Campbell and Holt, 2001; Willis et al., 2007), injury response (Leung et al., 2006; Donnelly et al., 2010; Sotelo et al., 2013) and axonal regeneration (Zheng et al., 2001; Verma et al., 2005; Willis et al., 2005; Gumy et al., 2010; Obara et al., 2012; Twiss et al., 2016; Terenzio et al., 2018). Despite the current acceptance of LPS in the axon as a fundamental process in nervous system development and function, this was not the predominant paradigm in the past decades. In particular, the difficulties in identifying polyribosomes in axons by electron microscopy and other necessary elements for translation (Lasek et al., 1973) created the vision that axons can only transport molecules from/to the cell bodies and that axonal LPS was a residual phenomenon, probably ascribed to mitochondrial metabolism. Initial hints of axonal LPS came from the analysis of acetylcholinesterase protein reposition in distal mammal axonal regions, showing that axonal transport from the cell body cannot be the only axonal protein source (Koenig and Koelle, 1960). Subsequent data further supported this model (Koenig, 1967) together with evidences of LPS in other systems including the squid giant axon (Giuditta et al., 1968), the goldfish Mauthner fiber (Edström and Sjöstrand, 1969) and later in rat myelinated axons (Koenig, 1991). With the advent of modern molecular biology tools, axonal LPS was demonstrated at dozens of neuronal models during injury and/or regenerative stages. In the last

two decades and especially in the last 10 years great advances were made in this field, increasing our understanding of the mechanisms involved and their importance for the development of neuronal disorders. For recent revisions about axonal LPS, please refer to Sotelo Silveira and Holt special issue (Sotelo-Silveira and Holt, 2014), and the revisions of Holt, Martin, and Schuman (Holt et al., 2019) and Twiss group (Dalla Costa et al., 2021). For a compilation about the current advances in LPS and its effects on the development of neuronal disorders, please see Lin et al. (2020) and Fernandopulle et al. (2021). Also, in the last decade have emerged functional genomics approaches that have dabbled into the study of mRNA localization and translation in the axonal territory, generating the first series of system biology pictures for this compartment (Farias et al., 2019).

In contrast, early studies in dendrites managed to identify both ribosomal particles (Bodian, 1965) and then polyribosomes (Steward and Levy, 1982; Steward and Falk, 1986), which led to the early adoption of LPS as a functional process in this neuronal compartment, hence also an early focus in its characterization (Steward and Schuman, 2001). For a recent revision about LPS in dendrites, see Chesnokova and Kolosov (2017) and Rangaraju et al. (2017). Lagging behind, recent work using transcriptomics, translational and proteomics tools started to shed light on the molecular components present in presynapses and the importance and complexity of axonal/presynaptic LPS (Hafner et al., 2019). However, the detailed understanding of all elements present in the presynapses, the mechanisms controlling mRNA transport, stability, protein synthesis and its regulation in the axonal/presynaptic compartment remains limited.

The recent development of sensitive and sophisticated omics protocols for the study of the nervous system dramatically increased the knowledge about the RNAs and proteins present at subcellular resolution (Koppel and Fainzilber, 2018). We are now beginning to understand the functional consequences of localizing mRNAs, ncRNAs and protein synthesis at different compartments (Farias et al., 2019) and their direct relationship to the origin and/or development of neuronal disorders. Indeed, although many neuronal disorders have at least an axon (axopathologies) or synaptic (synaptopathies) related component, the detailed molecular mechanisms involved are still largely unknown. The present review describes an overview of the methods developed to isolate axons and synaptic elements compatible with omics approaches and place these current omics advances in the context of axonal/presynaptic compartments and their relation to neurodegenerative diseases.

## Strategies to Isolate Axonal or Synaptic Material Compatible With Functional Genomics Protocols

### Axon Isolation Strategies

Polarized morphology of primary neuron cultures is a crucial characteristic to consider at *in vitro* models. With the development of compartmentalized neuron cultures, it is now possible to obtain purified axon material *in vitro* for biochemical or omics studies. To date, most protocols for isolating axons have been developed using *in vitro* samples, and only a few

have been developed to study the axoplasm *in vivo*, despite the differentiation state of the axonal material being an important factor. Although not all approaches might represent all situations, combining, where possible, all experimental models should be useful to understand axons in their adult environments. In the next subsections, we summarize axon isolation protocols and briefly describe relevant experimental cases where these were implemented for transcriptomics, translational and/or proteomic approaches. **Figure 1** shows a schematic description of each axon isolation methodology and **Table 1** presents a summary of omic studies developed from these strategies. Further discussion of relevant axonal omic studies can be found in Section “Functional Genomics Advances in Axon Biology.”

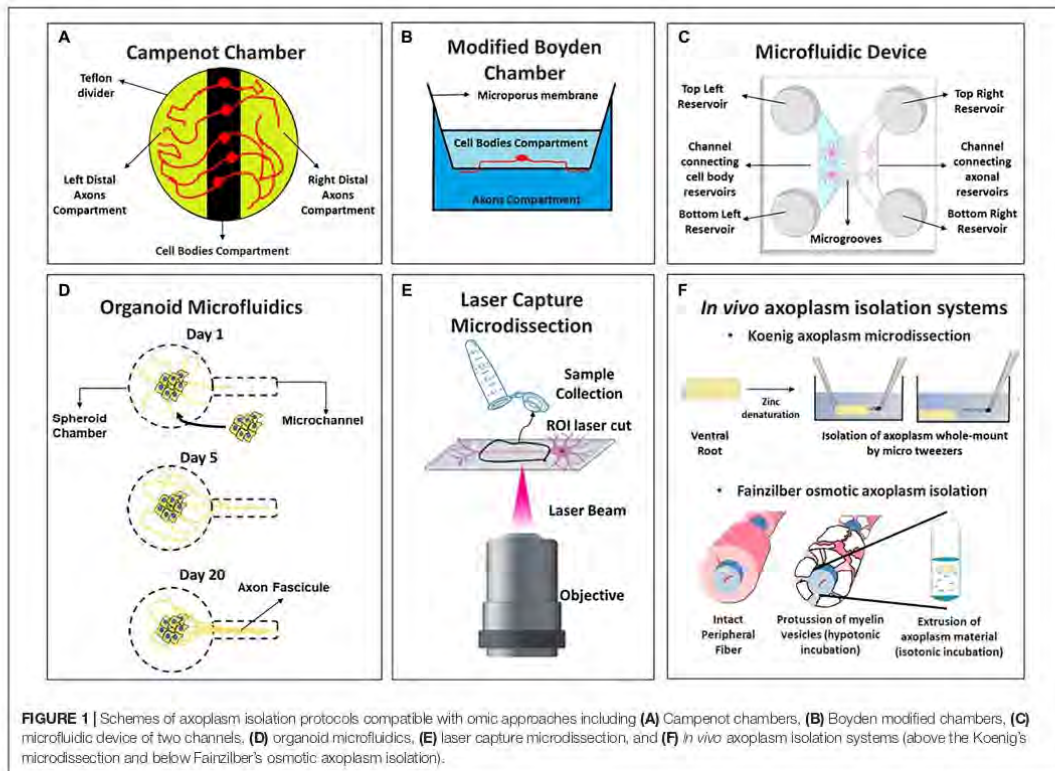
### Campenot Chambers

Campenot chambers were originally designed to study neurite development in the presence of nerve growth factor (Campenot, 1977), but this was later expanded to neurons due to the possibility of isolating neurites from cell bodies (Campenot and MacInnis, 2004; Fantuzzo et al., 2019) (**Figure 1A**). An early study by Andreassi et al. (2010) used this system to report one of the first axonal transcriptomes from rat sympathetic neurons by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) sequencing

technology. The authors identified hundreds of transcripts in axons and a specific 3'-UTR sequence in the *Imp1* mRNAs that induce its NGF-dependent axonal localization and local translation. Campenot chambers were also used to profile the axonal miRNAs in sympathetic neurons, detecting 130 axonal miRNAs and reporting the enrichment of some of these (miR-15b, miR-16, miR-204, and miR-221) relative to cell bodies in distal axon regions (Natera-Naranjo et al., 2010).

### Modified Boyden Chambers

The Boyden chamber was originally designed to study leukocyte active migration (Boyden, 1962) and was later repurposed to isolate axonal or dendritic processes by changing the membrane pore size between compartments (**Figure 1B**). This approach was successfully employed to study the axonal mRNA abundance in normal and injured dorsal root ganglion (DRG) axons by microarrays (Willis et al., 2007; Willis and Twiss, 2011). Subsequently, Yaron's group combined this isolation method with RNA-Seq to report the axonal transcriptome of mouse embryo DRGs. The authors identify short sequence motifs specifically in the axonal fraction and an unexpected high proportion of mitochondria encoded mRNAs compared to those transcripts encoded by neuron soma (Minis et al., 2014). Similar approaches





**TABLE 1** | Summary of axon isolation methods implemented for omics approaches.

Isolation method	Omic strategy	References
Campanot chambers	SAGE (1), Microarrays (2)	Andreassi et al., 2010; Natera-Naranjo et al., 2010
Modified Boyden chambers	Microarrays (3), RNAseq (4,5,6,7), RiboSeq (7), SILAC (7)	Willis et al., 2007; Minis et al., 2014; Taliaferro et al., 2016; Rotem et al., 2017; Zappulo et al., 2017
Microfluidic devices	Microarrays (8,9,10,11), RNAseq (12,13,14), BONCAT (12)	Taylor et al., 2009; Gurny et al., 2011; Baleriola et al., 2014; Saal et al., 2014; Briese et al., 2016; Bigler et al., 2017; Nijssen et al., 2018
Organoid microfluidics	RNAseq (15)	Akiyama et al., 2019
Laser capture microdissection	Microarrays (16), RNAseq (17)	Zvraj et al., 2010; Bellon et al., 2017
<i>In vivo</i> axoplasm microdissection (Koenig's method)	RNAseq (18)	Farias et al., 2020
<i>In vivo</i> axoplasm extrusion (Fainzilber's method)	MS/MS (19), ITRAQ (20), SCX-MS/MS (21), LFQ (22), BONCAT (22)	Michaevskii et al., 2010a,b; Rishal et al., 2010b; Di Paolo et al., 2021
<i>In vivo</i> FACS based	RNAseq (23), LC-MS/MS (23)	Poulpoulos et al., 2019
NanoBiopsy	RNAseq (24)	Toth et al., 2018
Mechanical dissection	RNAseq (25)	Mathur et al., 2018
TRAP-based	RNAseq (26, 27)	Shigeoka et al., 2016; Ostroff et al., 2019
Retinal explants with cell bodies removed	pSILAC quantitative proteomics combined with single-pot solid-phase-enhanced sample (SP3) preparation (28)	Cagnetta et al., 2018
Rat cortical axons cultured in micro-patterned glass chips	Two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS) analyses without and with stable isotope dimethyl labeling (29)	Chuang et al., 2018
Spatial transcriptomics	Ex-Seq (30)	Alon et al., 2021
IBioID (axon initial segment)	LC-MS/MS (31)	Hamdan et al., 2020

were used by Burge's group to study the transcriptome of neurites from neuroblastoma (N2A) and catecholaminergic (CAD) cell lines differentiated to neurons (Taliaferro et al., 2016) while Perlson's lab analyzed the axonal coding and non-coding RNAs from primary cultures of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis mutation models (Rotem et al., 2017). Finally, the group of Chekulaeva isolated neurites of mouse embryonic stem cells (mESC) differentiated to iNeurons, and performed RNA-Seq, Ribo-Seq, proteomics, pulse Stable Isotope Labeling with Amino Acids (pSILAC) and quantitative non-canonical amino acid tagging (QuanCAT) experiments to study neurite local transcriptome, translome, total proteome and newly synthesized proteome (Zappulo et al., 2017). This report is discussed in Section "Axonal Translatomics, Proteomics and Local Synthesized Proteome."

#### Compartmentalized Microfluidic Devices

The main advantage of this technology are the small microgrooves that separate two or more compartments allowing physical and fluidic isolation of axons from somatodendritic microenvironments *in vitro*. This system is ideal for axons or even long dendrites isolation since the length of the microgrooves can be modified and thus be used for central nervous system (CNS) axon isolation (Taylor et al., 2005; Dajas-Bailador et al., 2012; Lucci et al., 2020), which had previously not been successfully cultured in Campanot chambers. By this procedure, the Cotman lab analyzed axonal mRNA identities of mature CNS cortical neurons, reporting 300 axonal mRNAs, with many in common with those reported for peripheral nervous system (PNS) injured DRG axons (Taylor et al., 2009). A later microarray assay study the mRNA content in motor neurons in normal or

a spinal muscular atrophy neuronal model (Saal et al., 2014), while the Hengst group employed RNA-Seq in rat hippocampal axons injected with A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Baleriola et al., 2014). Both studies are further discussed in Section "Functional Genomics for the Study of Neurodegenerative Disorders in Axon and Synaptic Compartments." More recently, the *in vitro* transcriptome of rat motor axons was reported (Briese et al., 2016), while the axonal transcriptome of distal projections was profiled in human embryonic stem cells differentiated to glutamatergic neurons (hESC-neurons) to infer human mRNA translation mechanisms (Bigler et al., 2017).

#### Organoid Microfluidics

This strategy is based on the culture of neuron spheroids which could extend a robust fascicle of axons useful for follow growth and fasciculation programs. After culturing the spheroids, neurons spontaneously generate a single, straight, and unidirectional axon fascicle within the microchannel (Kawada et al., 2017) (Figure 1D). It was employed to analyze axonal and somato-dendrite transcriptomes in isogenic human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs)-derived motor neurons with an amyotrophic lateral sclerosis related mutation (Akiyama et al., 2019). This study will be discussed in Section "Functional Genomics for the Study of Neurodegenerative Disorders in Axon and Synaptic Compartments."

#### Laser Capture Microdissection (LCM)

This technique consists in the isolation of regions of interest by direct observation of the sample under the microscope using a powerful laser beam and special cell culture devices (Datta et al., 2015). In the case of neurons growing *in vitro*, individual

axons can be microdissected (Figure 1E). An important difficulty of this methodology is that thousands of axons need to be isolated to obtain sufficient material for further biochemical assays (Kim and Jung, 2015). Combining LCM with microarrays, Zivraj et al. (2010) studied RNA localization in axon growth cones from retinal ganglion cells (RGC) of *Xenopus laevis* and mouse at different development stages and found critical differences in mRNAs repertoire with age, suggesting that mRNA localization is important for the transformation of growth cones in mature presynaptic terminals. More recent studies use this isolation system to profile axonal miRNAs in RGC axons, identifying miR-182 as the most abundant and demonstrating its importance for axonal guidance and local translation regulation (Bellon et al., 2017).

#### Whole-Mount *in vivo* Axoplasm Isolation Protocols

Neurons from primary cultures and/or explants have metabolic differences compared to those obtained from *in vivo* tissues (Raper and Mason, 2010; Rishal et al., 2010a). Moreover, *in vivo* axons are surrounded by neuroglia and develop connections with other neurons as well, and those characteristics cannot be accurately recreated *in vitro* (Sotelo et al., 2014) -a more detailed discussion about the *in vitro* and *in vivo* implications at axonal omics can be found in sections "Axonal Transcriptomics." Therefore, isolation of axoplasmic material *in vivo* is key to obtain information to understand axonal biology in a fully differentiated tissue. In mammals, there are two main strategies for isolating axon material from peripheral nerves *in vivo*, one derived from early work by Koenig (1965, 1986) and the other developed by Fainzilber's lab (Hanz et al., 2003). A mechanical extrusion of axoplasm has been used as a strategy to study axons from invertebrates (Gilbert, 1972; Marquis and Webb, 1974; Morris and Lasek, 1984; Brady et al., 1985; Perlson et al., 2004) but is difficult to perform for most axons in vertebrates (Rishal et al., 2010a).

Koenig's strategy is known as "axoplasm microdissection protocol" (Figure 1F, above) was modified to study giant axons like the goldfish Mauthner axoplasm (Koenig, 1986) but was later adapted for mammalian spinal cord ventral root axons (Koenig et al., 2000). This methodology was used to perform Real Time quantitative PCR (RT-qPCR) from rat axoplasm material (Sotelo-Silveira et al., 2007) and more recently, after modification of the protocol to increase the axoplasm's purity, to obtain the transcriptome of mature myelinated motor axons by RNA-Seq (Farias et al., 2020).

Fainzilber's group developed a method based on osmotic manipulations to obtain isolated axoplasm from peripheral nerves (Hanz et al., 2003; Perlson et al., 2005; Yudin et al., 2008; Michaelevski et al., 2010a; Rishal et al., 2010a) (Figure 1F, below). This method was employed to obtain the axoplasm material from sciatic nerve axons after isotonic buffer incubation (Perlson et al., 2005). By hypotonic incubations in the same model, detected 540 proteins by MS/MS with less contamination of serum proteins (Rishal et al., 2010b). Pooling from hundreds of sciatic nerve segments to reach input requirement for quantitative MS/MS combined with Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ), they quantified 973 proteins at injured

axons (Michaelevski et al., 2010a), and nearly 900 axonal phosphoproteins (Michaelevski et al., 2010b). Our group, using the Fainzilber osmotic axoplasm extraction, recently reported the axoplasm proteome of normal and injured rat sciatic nerve with label free quantitative proteomics, identifying double number of protein groups and an axonal enrichment of ribosomal proteins relative to the whole nerve, especially at injury conditions (Di Paolo et al., 2021), showing that these methodologies are nowadays useful with state of the art quantitative mass spectrometry methods.

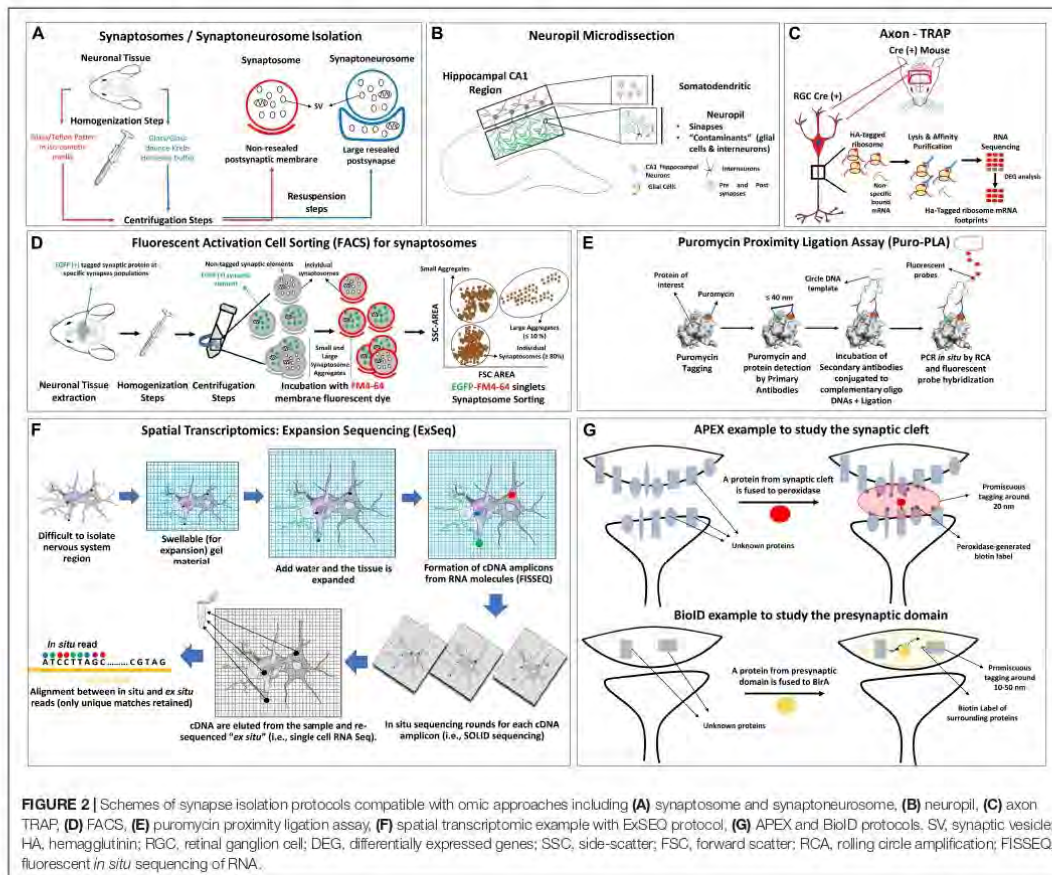
#### Synaptic Isolation Strategies

The detailed understanding of synapses molecular complexity has gained momentum in the last decade and the dysregulation of their components has been proposed as a contributor to several human neuronal disorders (Pocklington et al., 2006). In basic terms, a chemical synapse consists of two elements: the presynaptic and postsynaptic components. Nevertheless, it is also important to consider that most chemical synapses are in effect a "tripartite" structure, since the synaptic processes are tightly integrated with surrounding astrocytes and microglia, which are active partners in synaptic functions and relevant for plasticity related processes. For recent revisions about tripartite synapses see Heller and Rusakov (2017), Farhy-Tselnicker and Allen (2018) and for their relationship with neuronal disorders see Liu et al. (2018). It is important to highlight that although there are key implications for the glia involvement in synapses, this revision focuses on data obtained mainly on the presynaptic side of this tripartite structure.

In the next subsection we summarize synaptic isolation protocols and recent technologies to identify transcripts or proteins at subcellular resolution level compatible with omic strategies that also helps to define better the LPS capacity of the presynaptic element. In addition, the Figure 2 shows a schematic description of each synaptic isolation methodology described in the next sections and Table 2 lists omic studies which have used them.

#### Synaptosomes, Synaptoneurosome, and Neuropil Dissection

**Synaptosomes.** Synaptosomes are structures detached from neuronal projections after specific homogenization steps enriched on resealed synaptic junctions (but not resealed postsynaptic membranes) (Figure 2A, red lines). The term was first defined by Whittaker and collaborators (Whittaker et al., 1964), following previous work by de Robertis and Bennett (1955) and de Robertis et al. (1961; 1962; 1963). Synaptosomes are isolated from brain tissue homogenates in non-ionic and iso-osmotic media generally using a glass/teflon potter (Weiler, 2009). These structures retain the functional characteristics of both pre and postsynaptic sides with active membrane potential for a few hours after being extracted from live tissues, and can also be isolated from postmortem brains (Ihou and Tai, 2017; Scaduto et al., 2020). Since synapse junctions are morphologically resilient, it is possible to isolate them based on their size and density using specific homogenization and centrifugation protocols that have been extensively reviewed (Whittaker, 1993; Bai and Witzmann, 2007; Kamat et al., 2014;



**FIGURE 2 |** Schemes of synapse isolation protocols compatible with omic approaches including (A) synaptosome and synaptoneurosome, (B) neuropil, (C) axon TRAP, (D) FACS, (E) puromycin proximity ligation assay, (F) spatial transcriptomic example with ExSeq protocol, (G) APEX and BioID protocols. SV, synaptic vesicle; HA, hemagglutinin; RGC, retinal ganglion cell; DEG, differentially expressed genes; SSC, side-scatter; FSC, forward scatter; RCA, rolling circle amplification; FISSEQ, fluorescent *in situ* sequencing of RNA.

Michaelis et al., 2017; Wirths, 2017; Gulyásy et al., 2020). The Ficoll/sucrose (Booth and Clark, 1978) or Percoll gradients steps (Nagy et al., 1984) could be added to reduce the osmotic damage. Importantly, these methods have contaminants of axonal and glial components, and the assessment of purity is ideally based on the electron microscopy analysis of synaptosomal pellet fractions (Dunkley and Robinson, 2018). In the context of this review, we will focus on data shedding light on the capacity of the presynaptic terminal to synthesize proteins, as seen indirectly by transcriptome/translatome or directly by proteomic studies. Therefore, a technical issue where many groups are currently working on is not only gaining axonal or presynaptic insight due the unprecedented resolution/value of omic studies but also raising the bar on the quality of the samples, improving the methods to pinpoint contents of each element of the synaptic tripartite structure. This technical frontier (see sections below) is being redrawn, for example, by the purification of VGLUT1 synaptosomes with fluorescent activated cell sorting (FACS) (Luquet et al., 2017) or by spatial transcriptomics (Stahl et al., 2016).

*Synaptoneurosome*s. Synaptoneurosome are obtained after the homogenization of brain tissue typical with a glass/glass dounce in Krebs-Henseleit buffer, producing axonal nerve terminals (with synaptic vesicles, mitochondria, and cytoskeleton) attached to large sealed postsynaptic elements, which are almost not present in synaptosomes (Hollingsworth et al., 1985) (Figure 2A, blue lines). Synaptoneurosome have double the size and volume compared to synaptosomes and form vesicles that appear "snowman-shaped" by electron microscopy (Villasana et al., 2006; Westmark et al., 2011; Dunkley and Robinson, 2018). A discontinuous Percoll gradient procedure was developed to isolate synaptoneurosome in shorter times, minimizing the presence of synaptic and glial plasma membranes and of extra-synaptosomal mitochondria (Dunkley et al., 2008).

Regarding the synaptosome/synaptoneurosome contaminants and the variations on specific synaptic elements enrichment, the report of Gulyásy et al. (2020) discuss how the variations in the isolation methodologies could lead to differential results mainly due to differences in the contaminants presented in each case. This elegant meta-analysis presents five different synaptosome

**TABLE 2 |** Summary of synaptic isolation strategies implemented for omics approaches.

Isolation method	Fraction isolated	Omics strategy	References
Centrifugation-based	Synaptosome	Microarrays (1), RNAseq (2,3, 4), RiboSeq (3), LC-MS/MS (5,6, 7), XL-MS (8)	Chang et al., 2013; Xu et al., 2013; Eshraghi et al., 2019; Noya et al., 2019; Gonzalez-Lozano et al., 2020; Gulyassy et al., 2020; Simbriger et al., 2020; Epple et al., 2021
Centrifugation-based + Chromatography-based purification	Synaptic vesicles	MS (9, 10)	Morciano et al., 2006; Takamori et al., 2006
	Synaptic vesicles	LC-MS/MS (11)	Taoufiq et al., 2020
Filter-based	Synaptoneurosome	Microarrays (12), LC-MS/MS (13)	Williams et al., 2009; Hesse et al., 2019
FACS-based	Pre or post synaptic compartment	RNAseq (14)	Arey et al., 2019
	Synaptosome	RNAseq (15), LC-MS/MS (16,17, 18)	Biesemann et al., 2014; Blumenstock et al., 2019; Hafner et al., 2019; Apóstolo et al., 2020
Neuropil Dissection	Neuropil	Microarrays (19,20), RNAseq (21), Polysome profiling (22)	Poon et al., 2006; Zhong et al., 2006; Cajigas et al., 2012; Eljaver et al., 2020
Immunisolation	Synaptosomes	Immunoprecipitation, LC-MS/MS (23)	Gershoni-Ernsek et al., 2016
	Synaptic vesicles	ITRAQ (24,25, 26)	Gronborg et al., 2010; Boyken et al., 2013; Taoufiq et al., 2020
APEX	Synaptic cleft	ITRAQ (27)	Loh et al., 2016
BioID	Inhibitory post-synapsis	LC/LC-MS/MS (28)	Uezu et al., 2016
Spatial transcriptomics	Dendrites, dendritic spines, axon	Ex-Seq (29)	Alon et al., 2021

isolation variants and describe the source of contamination by various techniques -including electron microscopy and proteomics- and conclude that besides the core of detected proteins is the same, the differences could be important for further analysis and are a consequence mainly of the different degrees of purity from mitochondria and glial structures.

**Neuropil dissection.** This term is generically associated with specific areas in the nervous system that are composed mostly of unmyelinated axons, dendrites and glial cell processes, forming a synaptically dense region that contains a relatively low number of cell bodies (Purves et al., 2018) (Figure 2B). It can be extracted by expert microdissection, as previous reports showed for the CA1 adult rat hippocampus (Cajigas et al., 2012). The later study provided a pioneer dataset, where the power of genome-wide expression data was used to disentangle the subcellular compartment origin and possible contaminating sources. Those results were significantly improved by Hafner et al., 2019 (detailed in section “Transcriptomics and Translatomics at the Synaptic Compartments”).

It is becoming clear that the combination of approaches that use neuropil dissection/synaptosomes benefit from a combined experimental approach that uses tagging of molecular components and specific expression of tagged-translation related molecules in a time and spatial manner in order to purify contents more specifically and reducing the contamination levels.

#### Methodologies to Analyze Difficult to Isolate Synaptic Sub-compartments Compatible With Functional Genomics Protocols

Despite all the progress on the physical isolation of synaptic elements, there are certain limitations that cannot be easily resolved. For example, the presynaptic and postsynaptic compartments in the neuropil are so close from each other that it is not possible to physically isolate each part by any

of the previous described protocols. Nevertheless, in the last 5 years different strategies combining sophisticated visualization methodologies with omic approaches allow to localize and identify transcripts in certain synaptic elements which cannot be easily isolated by other methodologies. One of these systems is the Axon Translating Ribosome Affinity Purification or Axon-TRAP from Holt's lab (Shigeoka et al., 2016) to specifically analyze the axonal translate using tagged ribosomes obtained by genetic modifications (Figure 2C). Other technology is synaptosome isolation with FACS (Figure 2D) which combines membrane fluorescent probes, cell sorting and GFP-tagging of the synaptic element of interest to isolate highly purified fluorescent synaptosomes. The method was developed by Wolf and Kapatos (1989) and adapted by Murphy lab to analyze the presynaptic transcriptome of *Caenorhabditis elegans* (Arey et al., 2019), by Macklis group to define the transcriptome and proteome of developing axonal projections of cerebral cortex (Poulopoulos et al., 2019) and by others to analyze different synaptic proteomes (Biesemann et al., 2014; Blumenstock et al., 2019; Apóstolo et al., 2020). For a general revision of FACS please see Luquet et al. (2017). In the case where the goal is to analyze LPS, the puromycin metabolic labeling of newly synthesized proteins was applied to analyze pre and postsynaptic protein synthesis combined with expansion and super resolution, and electron microscopy (Hafner et al., 2019) (Figure 2E).

To localize and identify transcripts massively in difficult-to-isolate regions, the spatial transcriptomic methods were designed, combining fluorescent *in situ* hybridization techniques with high throughput sequencing (Figure 2F). For recent revisions of these techniques and their implications on the study of the nervous system please refer to the following publications (Lein et al., 2017; Mu et al., 2019; Miedema et al., 2020; Waylen et al., 2020; Armand et al., 2021). Although not applied in depth to explore axons yet, there are variants of spatial transcriptomic

protocols that were applied to study synapses. Multiplexed error-robust fluorescence *in situ* hybridization (MERFISH) (Wang et al., 2018; Xia et al., 2019) analyses hundreds of mRNA sequences at a time employing binary encoding gene labeling in multiple rounds of hybridization. Sequencing fluorescent *in situ* hybridization (SeqFISH) uses a limited pool of fluorophores to construct a temporal barcoding scheme for each round of hybridization, allowing a quantitative multiplexed single molecule mRNA imaging (Lubeck et al., 2014; Shah et al., 2016). Last, Expansion Sequencing or “ExSeq” uses fluorescent untargeted *in situ* sequencing of RNA or FISSEQ (Lee et al., 2014), combined with expansion microscopy. In essence, mRNA is retrotranscribed *in situ* to cDNA and rolling circle amplification is followed by SOLID sequencing of each cDNA amplicon using a standard fluorescent microscope. That, combined with expansion microscopy to add spatial resolution and differentiate each cDNA amplicon, is especially useful for highly packed RNA groups. As it will be discussed later, this method provides very interesting results on the local transcriptome of neuronal sub-compartment of dendrites, like spines *in vivo* (Alon et al., 2021).

In relation to *in vivo* proteomics, studies partially independent from physical isolation protocols, two methods were designed both based in the promiscuous tagging of a protein of interest and the surrounding proteins (approximately 10–50 nm around) with biotin via ascorbate, known as APEX, or modified *Escherichia coli* biotin ligase, known as BioID, which are then recovered by streptavidin or anti-biotin beads and sequenced by MS (revised by Han et al., 2018; Wang and Savas, 2018; Bosch et al., 2021) (see Figure 2G). Interactions networks with a byte localized in the synaptic cleft, can be pinpointed allowing sub-nanometer resolution of structures far away from the reach of other classical isolation procedures (Loh et al., 2016).

A detailed discussion about early and recent works that used these technologies to analyze synapses by functional genomics can be found in Section “Functional Genomics for the Study of the Synaptic Compartment.”

## Functional Genomics Advances in Axon Biology

### Axonal Transcriptomics

Transcriptomic analysis allows the investigation of the axonal mRNA repertoire, which represents proteins that could be potentially synthesized in axons. There are almost 20 published axonal transcriptomes to date (Willis et al., 2007; Taylor et al., 2009; Andreassi et al., 2010; Zivraj et al., 2010; Baleriola et al., 2014; Minis et al., 2014; Saal et al., 2014; Briese et al., 2016; Taliaferro et al., 2016; Bigler et al., 2017; Rotem et al., 2017; Zappulo et al., 2017; Mathur et al., 2018; Tóth et al., 2018; Pouloupoulos et al., 2019; Farias et al., 2020), obtained from various species and neuronal types. In addition, although many of these studies focused on mRNAs, RNA-Seq approaches have also been successfully applied to the investigation of axonal miRNAs (Phay et al., 2015; Bellon et al., 2017; Rotem et al., 2017; Corradi et al., 2020), expanding the research into regulatory mechanisms of local mRNA translation.

Most of these studies analyzed the enriched RNAs in the axon compared to the somatodendritic domain. This strategy is inherently conservative because it eliminates from the analysis those RNAs that might be present at high levels in both domains like the  $\beta$ -actin which localization and local synthesis in axons have been demonstrated (Wong et al., 2017). Despite this caveat, the data from these studies has provided significant progress for the field.

While most studies were carried out using *in vitro* models, data on what occurs under *in vivo* conditions has recently been obtained. The work of Macklis’s lab described the local transcriptome and proteome of growth cones from mouse cerebral cortex single projections, revealing novel molecular specializations of these structures, including accumulations of the mTOR2 and mRNAs that contain mTOR-dependent motifs (Pouloupoulos et al., 2019). In addition to this, a recent study from the Sotelo-Silveira group revealed the axonal transcriptome of fully differentiated myelinated motor neurons derived from rat ventral roots (Farias et al., 2020). In this study, the population of axonal mRNAs detected showed less diversity compared with previously published transcriptomes obtained from *in vitro* cell cultures. This result may be explained by multiple factors, including differences between neuronal cell cultures *in vitro* and neurons in their normal environment, differences in the neurons’ developmental stage, and/or differences in the axonal isolation protocols. Interestingly, almost all mRNAs coding for ribosomal proteins were found in the axoplasm, providing clues to how translation machinery may renew and operate far away from the nucleolus. The latter is consistent with proteomics results indicating that ribosomes are enriched in sciatic nerve axons preparing to regenerate (Di Paolo et al., 2021).

The comparative analysis of axonal transcriptomes shows that the gene ontology categories related to translation, mitochondria, and the cytoskeleton are enriched in all data sets, regardless of neuronal type or state of maturation (Farias et al., 2019). These categories are also enriched in the group of mRNAs present in axons of different types (sensory or motor) or various differentiation conditions (mature or in active growth), defining a core set of mRNAs needed for the correct function of the domain (Farias et al., 2020). Other ontological categories are also enriched in some of the axons, such as intracellular traffic, axon guidance, and proteins related to the synapses (Farias et al., 2019). In turn, studies have also shown how the axonal transcriptome can dynamically change throughout neuronal development, varying the capacity for protein synthesis in axons at different development stages. The study of mRNAs located in growth cones of the RGC of *Xenopus* in stages of “pathfinding” and “target-arriving” revealed that the number and complexity of RNAs increased dramatically with age and adapted to the functional demands of the growing axon tip as it transforms into the presynaptic terminal (Zivraj et al., 2010). Furthermore, the examination of axonal transcriptomes from embryonic and adult stages of mouse DRG allowed the estimation that there are a similar number of localized transcripts at both stages but with significant changes 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 from development to adulthood (Gumy et al., 2011). The later observation was supported by the trapping of ribosome associated mRNAs at different developmental (Shigeoka et al., 2016) and adulthood stages associated with learning processes in axons (Ostroff et al., 2019), see section below.

### Axonal Translatomics, Proteomics and Local Synthesized Proteome

#### Axon Translatomics

First axon translatomics was performed by Shigeoka et al. (2016) with Axon-TRAP, a method to analyze the mRNAs associated to ribosomes targeted into axons or synapses of interest *in vivo* (Figure 2C). Approximately, 2,000 transcripts were associated with tagged ribosomes, decreasing to a half in the adult axons, showing also the first conclusive evidence of LPS in mature CNS axons (Shigeoka et al., 2016). Moreover, the comparison of the axonal translatome repertoire with the mRNAs previously reported by transcriptome assays at the same developmental stages (Zivraj et al., 2010) shows coincidences, but also shows a group of genes that are detected only at the transcriptome level, suggesting the existence of repressed mRNAs that are not expressed until a certain development stage. The authors also bring evidence of alternative splicing events, that could produce specific UTR sequences that define the mRNA transport to the axon, and suggest *cis*-regulatory elements and secondary RNA motifs in the axon-localized mRNAs that could promote axonal translation. The TRAP technology was recently applied in axons of rat adult forebrains *in vivo* and linked local translation with learning and memory related processes (Ostroff et al., 2019). Interestingly, the number of transcripts detected in the adult axon in CNS by both studies as being translated are in the range of the ones detected later in adult myelinated PNS motor axons (Fariñas et al., 2020), likely indicating that adult differentiated axons have less mRNA diversity (see above, "Axonal Transcriptomics").

#### Axon Proteomics and Local Proteome Assays

The increasing capacity of mass spectrometry technologies allow the study of samples with low quantities of total proteins like the axons by proteomic approaches. The total axonal proteome was analyzed mostly at *in vitro* models and together with local synthesized proteomes to perform comparative analysis.

Zappulo et al. (2017) report the transcriptome, translatome, proteome and newly synthesized proteome of mice iNeurons neurites, identifying approximately 7000 proteins and revealing that the neurite enriched mRNAs encoded approximately half of the neurite-localized proteome in relation to cell bodies. Moreover, the Ribo-Seq neurite data indicated a preferential translation of localized RNAs and proteins in neurites with a strong correlation with the newly synthesized proteome obtained by pSILAC and QuanCAT protocols validated by puromycin proximity ligation assays. These results suggest that those localized mRNAs are indeed translated locally. Most of these proteins have neuronal related functions associated with neuronal diseases and have a relevant proportion of RNA binding proteins important for mRNA translation regulation and localization.

The study of LPS regulation at a genome wide level has only recently been explored. Cagnetta et al. (2018) combine elegant ultrasensitive sample preparation technology known as single-pot solid-phase-enhanced sample preparation (SP3) with pSILAC metabolic labeling and compartmentalized chambers to isolate the axons of RGC *X. laevis* embryos and demonstrate that axon local translation could be regulated by specific cues including BDNF, semaphorins and Netrin-1. Each cue differentially affects axonal synthesis of multiple proteins in a temporally dynamic way (Cagnetta et al., 2018). In general, this approach was able to observe a thousand newly synthesized proteins in categories related to ribosome, translation and proteosome related processes, a higher detection capacity compared to the axonal enriched proteins reported for cortical axons in culture (Chuang et al., 2018).

The approaches mentioned above cannot differentiate between specific subregions of the axonal domain, a challenge that may be overcome by promiscuous tagging protocols. In this regard a recent report adapted the BioID protocol to analyze the proteome of intracellular membrane, cytosolic, and microtubule compartments of the axon initial segment of E18 rat hippocampal neurons (Hamdan et al., 2020). The authors report an enrichment on cytoskeleton related proteins (i.e., ankyrins, spectrins, actin, and tubulins), proteins related to axonal trafficking (i.e., Mical3) and no previous axonal assigned proteins that open new questions about its roles in neuronal functions.

Most of the axonal proteomics are carried out *in vitro*, losing the influence of *in vivo* cell-to-cell interactions. Nevertheless, a few axonal proteomic analyses have been developed *in vivo* by the group of Perlson et al. (2005) and recently used by our group. The first *in vivo* axonal proteome was obtained in 2005 using isotonic buffer incubations (Perlson et al., 2005). Later, improvements in the protocol after the addition of a hypotonic buffer incubation step combined with iTRAQ proteomics allowed authors to analyze the axoplasmic proteome in injured rat sciatic nerve ligatures and identify 973 proteins (Michailevski et al., 2010a). A publication of our group detected 2,087 proteins in extruded axoplasm from rat sciatic nerves *in vivo* with an enrichment on ribosomal proteins at injured axons and reports a list of newly synthesized proteins in the axoplasm *in vivo* obtained by BONCAT-MS/MS protocols (Di Paolo et al., 2021). Functional categories obtained from the latter are also consistent with an *in vivo* axon growth cone proteome from developing mice cortex (Poulopoulos et al., 2019).

It's important to note that there is also the possibility of a contribution from the surrounding glia to the local axonal proteome (Court et al., 2008; Lopez-Verrilli and Court, 2012; Sotelo et al., 2013, 2014; Canclini et al., 2020), therefore, further refinement of techniques should also consider this source in upcoming experiments.

### Functional Genomics for the Study of the Synaptic Compartment

Despite all the progress made in the study of synapses at a local level, the identities of most synaptic mRNAs, ncRNAs and proteins were unknown until the advent of next generation

RNA sequencing and proteomics, which coincided with the increased capacity to isolate synaptic components. As mentioned above most omic analyses focus on the postsynaptic side (Sasaki, 2020). In the next sub-sections, we summarize the current transcriptomics and proteomics advances, focusing on presynaptic studies.

### Transcriptomics and Translatomics at the Synaptic Compartments

In the early nineties most of the studies to define the synaptic RNAs used Northern blot or RT-PCR to analyze synaptosome fractions, assuming that the presynaptic side lacked local mRNA translation (Steward, 1983) and therefore, was no need to distinguish between pre and postsynaptic regions (Steward and Banker, 1992). Nevertheless, the group of Giuditta et al. (2008) mounted solid evidence of mRNA presence and LPS in the axon and later at the presynaptic endings in several publications (see reviews from Crispino et al., 2014), including pioneer cDNA libraries from the squid giant axon (Kaplan et al., 1992) and demonstration that active polysomes were present in presynaptic endings of squid brain synaptosomes (Crispino et al., 1993, 1997; Eyman et al., 2007).

Initial microarrays studies on tissues with complex mixtures of neuronal and glial processes detected hundreds of potentially pre and postsynaptic mRNAs, but since the axon side of the story was not considered to be relevant, the studies likely miss classify axonal mRNAs as dendritic ones (Poon et al., 2006; Zhong et al., 2006). Later Zivraj et al. (2010) identified, using also microarrays and microdissection of *X. laevis* growth cones, 958 transcripts, and reported a low intersection with previous datasets suggesting that the synaptic mRNA population seems to be more complex and dynamic across maturation. In addition, other studies added the presence of miRNA inside synaptic vesicles by microarrays (Xu et al., 2013; Li et al., 2015) and more recently the small non-coding synaptic RNAome from mice hippocampal synaptosomes and suggests that synaptic microRNAs can potentially control almost all the synaptic mRNAome (Epple et al., 2021).

However, the most significant synaptic omic improvements came with next generation sequencing protocols (NGS) combined with the strategies mentioned in Section "Methodologies to Analyze Difficult to Isolate Synaptic Sub-Compartments Compatible With Functional Genomics Protocols." Early work from Schuman's lab performed a profile of the adult rat hippocampal neuropil transcriptome, which is highly enriched on sealed synapses with pre and postsynaptic components (Cajigas et al., 2012). The authors identified 8,379 transcripts of which 2,550 mRNAs were associated with dendritic or axonal synaptic compartments, excluding those transcripts enriched in non-neurite data sets. The mRNA population discovered suggested that local translation in mature synapses could be a commonly occurring mechanism, rather than an exception, later confirmed in detail by Hafner et al. (2019) (see below). Despite possible contaminations that are always present in neuropil preparations (discussed in Section "Synaptosomes, Synaptoneuroosomes, and Neuropil Dissection"), this observation started to move the debate beyond local translation as a process relevant not only in development or regenerating axons but

toward its validation in mature axons and synaptic contexts. Indeed, Axon-TRAP protocols (see above) supports this point demonstrating that local mRNA translation occurs in CNS axons and is tightly regulated during development (Shigeoka et al., 2016; Ostroff et al., 2019).

The neuropil analysis cannot distinguish between pre and postsynaptic regions which is important in order to demonstrate if LPS occur at both axonal and dendritic sides. To answer this point an exhaustive analysis from Schuman group combined FACS synaptosomes isolation procedures, puromycin-based metabolic labeling (to visualize newly synthesized proteins *in situ* by fluorescent and electron microscopy imaging), expansion and super resolution microscopy to clearly differentiate the pre and postsynaptic sides, and demonstrate the occurrence of LPS at postsynaptic but also at excitatory (VGLUT<sup>+</sup>) and inhibitory (vGAT<sup>+</sup>) presynaptic terminals (Hafner et al., 2019). The authors suggest by synaptosome transcriptomics, and confirmed by fluorescent super resolution imaging, the presence of translation machinery and ribosomes in presynaptic terminals and directly evidence local translation in these compartments by puromycin labeling combined with expansion microscopy or electron microscopy imaging. In the same year, Arey et al. (2019) designed a method based on differential fluorescent labeling of cell bodies, presynaptic and axonal regions (using specific protein markers fused to fluorescent tags) that could be isolated by FACS protocol to perform transcriptomics specifically for each compartment in *C. elegans*. The authors detected 8,778 transcripts at presynapses with 542 enriched relative to cell bodies, an overrepresentation of RNA binding proteins and translation regulation RNAs and also a recurrent PUMILIO binding motif in the 3'-UTR region that could regulate memory related processes.

Recently two synaptic translatomics assays were developed in order to have a closer picture of the local regulation of protein synthesis at synapses. Gkogkas' lab that combined a well-established method for synaptoneurosome preparation with Ribo-Seq in order to assess translational levels of synapse-associated mRNAs, identifying transcripts from over 10,000 protein-coding genes but cannot distinguish between pre and postsynaptic sides (Simbriger et al., 2020). To assess this point, the group of Schuman recently published a method to perform Ribo-Seq on microdissected neuropil and somata from CA1 region of rat hippocampal slides to differentiate translational activity of polysome and monosome fractions (Biever et al., 2020). The authors demonstrate that neuropil extracted monosomes are active in dendrites and axons, translating synaptic related transcripts that encoded highly abundant proteins (detected by neuropil proteomics). The same group is currently working on the translatome and transcriptome profiles of the neuropil to unravel the unprecedented synaptic capacity for local protein production *in vivo* which is essential to maintain and modify the pre and postsynaptic proteome (available at bioRxiv). Is relevant to note that the active monosome fraction in axons may explain the historical difficulties to visualize polyribosomes in axons by electron microscopy imaging since monosomes are almost impossible to detect by these methodologies.

As we discussed above, the isolation of pure synaptic compartments sometimes is difficult to achieve. To overcome

some of these inherent difficulties and limitations a recently developed group of techniques termed “spatial transcriptomics” may allow specific subcellular localization of individual mRNA at massive scales (see Section “Methodologies to Analyze Difficult to Isolate Synaptic Sub-Compartments Compatible With Functional Genomics Protocols”). Moffitt et al. (2018) used MERFISH combined with single cell transcriptomics to investigate the molecular, spatial, and functional organization of the mouse hypothalamic preoptic region, identifying nearly 70 different neuronal populations and demonstrating the capacity of this methodology to analyze complex brain circuits. The same group is currently attempting to molecularly define the mouse primary motor cortex transcripts with high spatial resolution and the transcriptome compositions in somata, dendrites, and axons of individual mouse hippocampal neurons (available at bioRxiv). SeqFISH was used to reveal the intra-regional complexity of dentate gyrus, CA1 and CA3 from mouse hippocampus *in vivo* showing an increased cell heterogeneity along the dorsal to ventral axis (Eng et al., 2019). Finally, Alon et al. (2021) developed the “ExSeq” protocols to reveal the RNA population of dendrites, spines and even axons from mouse hippocampal neurons, detecting differences between mRNA populations in dendrites and their own spines. With this system the authors reveal the presence of multiple RNA types (small RNAs and even intron retaining transcripts) at distal dendrites 100 microns away from the cell bodies and could also recapitulate the organization of neuron types from mouse primary visual cortex by the detection of transcripts by the ExSeq protocol. Importantly, this technology has the potential to be used to study the transcriptome of presynapses without complex isolation procedures.

Regarding the bioinformatic analysis of the data obtained from single cell sequencing protocols, and despite global similarities with standard RNA-Seq analysis, it has some specific aspects to consider. Recent revisions summarize the bioinformatic protocols that have been specially designed for these methodologies and the main aspects to be considered (Kulkarni et al., 2019).

All these recent findings have transformed the previously prevailing concept that local translation was only a minor source of synaptic protein content, and instead confirmed it not only as a mechanism used during synaptic plasticity in dendritic domains but also on the presynaptic side at basal conditions.

### Proteomics at the Synaptic Compartments

The analysis of protein content in synaptosomes and derived sub-fractions lead to an exponential increase in our knowledge of synaptic protein content. All the intensive proteomics work performed in the last 20 years defining the current structural and functional blueprint of synapses that now support LPS studies is difficult to review in a short section, so we refer for example to Laßek et al. (2015); Dieterich and Kreutz (2016), and Xu et al. (2021). With the advent of quantitative and unbiased proteomics, it is now possible to evaluate the precise neuronal proteome changes associated with diseases (Reig-Viader et al., 2018; Wang and Savas, 2018) or plasticity related processes. The recent report from Noya et al. (2019) exemplifies how proteomics could explain synaptic plasticity

functions. The authors isolate synaptoneuroosomes from mouse brains and perform transcriptomics and proteomics protocols to demonstrate the role of synapses in the local control of the circadian rhythm, revealing the largest proportion of circadian transcripts in any model described to date and suggesting that synaptic protein local translation could have an essential role in sleep and wake states which are essential for regulate memory and learning efficiencies diurnally (Noya et al., 2019).

An inherent problem of synaptic proteomics is the loose of spatial information during the MS/MS analytical process. The isolation of synaptic plasma membranes or SPMs (Jones and Matus, 1974), by osmotic lysis combined with differential centrifugation, and synaptic vesicles or SVs (De Camilli et al., 1983; Huttner et al., 1983) were the initial attempts to obtain spatial information, besides the considerable contamination obtained. Immunoprofiling synaptic vesicles docked to the presynaptic active zone (Morciano et al., 2005, 2009; Takamori et al., 2006), together with a step of mild proteolysis of synaptosomes (Boyken et al., 2013), helped to increase purity, gaining insights on differences, for example between glutamatergic and GABAergic synapses (Grønberg et al., 2010). Recently, ultra-definition subcellular proteomic workflows, detected 1,500 SVs proteins (Taoufiq et al., 2020) increasing several fold previous capacity detection levels.

In many cases synaptic regions are still difficult to physically separate from other parts (i.e., the pre and postsynaptic regions of the neuropil) or almost impossible to isolate, such as those from the synaptic cleft. Recent protocols were modified to direct the expression of the “promiscuous” tagging enzymes to the subcellular region of interest. In this line the APEX protocol was applied to study the synaptic cleft from excitatory (glutamate releasing) and inhibitory (GABA releasing) synapses from adult mouse brain *in vivo*, reporting 199 glutamatergic and 42 GABAergic unique proteins, assigning previous known synaptic proteins to a specific cleft type and reporting novel synaptic proteins (Loh et al., 2016). In the same year the BioID protocol was applied to characterize the inhibitory postsynaptic (iPSD) proteome of mouse brain identifying all previous known iPSDs proteins, reporting 140 novel ones and a few protein groups were also detected in excitatory postsynapses suggesting a more complex scenario than previously thought (Uezu et al., 2016). It will be very interesting to see the result of combining APEX/BioID like approaches with methods to evidence local protein neo synthesis at proteomics scales in axon/synapses.

### Functional Genomics for the Study of Neurodegenerative Disorders in Axon and Synaptic Compartments

A large and heterogeneous group of neuronal disorders are those of the brain and spinal cord that are characterized by the progressive deterioration of neuron structures and functional capabilities. The literature of neuronal disorders due to molecular imbalances at the axonal and/or synaptic levels (known as axonopathies and synaptopathies, respectively) is vast, covering dozens of methodological approaches and having tons of relevant results on the understanding of the molecular pathways



involved, and changes that could trigger each neuronal disease. Nevertheless, the ratio between advancements in basic science and the development of biomedical therapies able to cure or at least reduce the symptoms and/or progression of most neuronal disorders is depressingly low and, in some cases -like Alzheimer's Disease or Amyotrophic Lateral Sclerosis-, there is almost no treatments to slow down the progress of the symptoms.

In general, neuronal disorders are studied based on a reduced number of their individual cellular components (Faundez et al., 2019). Nevertheless, even in monogenic neurological disorders (i.e., Rett syndrome or Huntington's disease), the proteins affected are capable of regulating the function and/or expression of hundreds/thousands of genes. In this context, system biology approaches appear as the main way to have a comprehensive picture of the observed phenotype. Functional genomic approaches are providing previously unexplored regulatory events that need to be pursued using gene centered approaches to validate observations in the context of the pathologies studied.

For the purpose of this review, we were interested in studies where axon and/or synaptic functional genomic studies provided any new insight on the relationship of the local capacity of gene expression in these compartments and the neuronal disorders analyzed. Since there are many relevant articles in this area especially in the case of synaptopathies, where is difficult to disentangle the influence of the cellular soma from the local response, we focused on diseases such as Alzheimer's Disease (AD), Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), and Spinal Muscular Atrophy (SMA), to provide examples on how local gene expression could be of importance. Interestingly, it is commonly observed that that changes in axons and/or synapses tend to occur early in the degeneration of the implicated system, highlighting the local influence but also possible venues for therapeutic development. Moreover, several reports shows that initial synaptic dysfunction and associated cognitive impairments can be reverted during early stages of neuronal disorders (Lacor, 2007; Zoghbi and Bear, 2012). In **Tables 3, 4** we summarize important omics studies developed to understand these neurodegenerative diseases from axon or synaptic compartments, respectively.

### Alzheimer's Disease

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia, and although some therapies can temporally ameliorate some of the symptoms (Long and Holtzman, 2019; Breijyeh and Karaman, 2020; Zetterberg and Bendlin, 2021), none can stop disease progression. AD pathogenesis is complex, involving abnormal amyloid beta ( $A\beta$ ) metabolism, tau hyperphosphorylation, oxidative stress, reactive glia and microglia changes, and other pathological events [please refer to Khan and Bloom (2016); Wang et al. (2017); Femminella et al. (2018), and Guo et al. (2020)]. Accumulation of extracellular oligomeric forms of  $A\beta$  is positively correlated with the onset of cognitive decline in AD brains and can elicit neurodegeneration in primary neurons (Zhang et al., 2012; Lee et al., 2020). Elevated  $A\beta$  levels can have an effect on the axons, triggering pathogenic signaling mechanisms (Kanaan et al., 2013; Baleriola et al., 2014).

The relation between AD and axon biology is currently centered in recurrent evidences that presents axonal degeneration as a process that occurs before cell body loss (Adalbert and Coleman, 2013) and before the onset of clinical symptoms, which seems to be a common feature of age-related diseases including ALS (Dadon-Nachum et al., 2011) and Parkinson Disease (Tagliaferro and Burke, 2016). This characteristic opens the possibility of potentially reversible disease-modifying phase for these pathologies. In consequence, understanding the molecular and cellular mechanisms underlying these axonal processes is critical for the development of therapeutic strategies (Salvadores et al., 2017). Although it is now clear that changes at synapses during AD development produce clear dysfunction of synaptic activity, the mechanisms involved are still elusive. In this line, recent proteomic analysis about the physiological roles of amyloid precursor protein (APP) shows that this protein is present in the presynaptic active zone and links the progress of AD with the physiological role of APP in synaptic vesicle traffic (Laßek et al., 2013; Weingarten et al., 2017). Besides the fact that AD studies in the last 30 years have been mainly centered around  $A\beta$  plaques and tau aggregations, more recent interpretations for sporadic AD development have started to focus on the multitude of dysregulated events that eventually impact synapse function and lead to neuronal loss (Sheng et al., 2012). Indeed, a recent revision from Jackson et al. (2019) describe the relative direct and indirect effects of  $A\beta$  and tau aggregations on synaptic dysfunction.

It is interesting to note that most of the functional genomics data developed in AD models does not discern between the local effects at neuronal compartments from the total differences at each brain region where cell bodies and other non-neuronal cells are prevalent than axon/dendrite contributions. Nevertheless, this type of omics approaches provides data about the synaptic roles in AD progression. For example, the study of Kempf et al. (2016) analyzed different brain regions from APPSwe/PS1  $\Delta E9$  mouse, a widely used model of cerebral amyloids, and reveals differential molecular signatures on synaptic plasticity related pathways for each brain region. More recently, membrane-enriched post-mortem brain samples (including synaptic elements) were analyzed by label free quantitative proteomics in free of pathology, asymptomatic and AD patients. A total of 530 unique proteins with significantly altered expression levels were observed across each condition, but only two proteins (APP and SNAP25) changing between all groups: APP increases and SNAP25 decreases throughout AD (Higginbotham et al., 2019).

Regarding the functional genomics studies performed at synaptic or axonal compartments locally, Miller's group isolated synaptoneuroosomes from the prefrontal cortex of control and early AD patients and performed microarray analysis (Williams et al., 2009). The authors found increased expression of neuroplasticity related genes, UTR consensus sequences related to translation regulation at synapses and several neurotransmitter receptors, including the GluR2 subunit of the AMPA receptor and the muscarinic cholinergic receptor 3 (CHRM3). Few years later Yang et al. (2013) perform one of the first shotgun proteomic assay in whole brains from early AD stage using a

**TABLE 3** | Summary of axonal omic approaches implemented for the study of neurodegenerative diseases.

Axon isolation strategy	Omic strategy	Neuronal disorder analyzed	Main discoveries	References
Rat embryonic hippocampal neurons cultured in tripartite microfluidic chambers	RNA-seq	Alzheimer's disease (AD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Locally applied A<math>\beta_{1-42}</math> triggers recruitment of mRNAs into axons and local translation.</li> <li>ATF4 is local translated, is necessary for retrograde spread of A<math>\beta_{1-42}</math>, induce neurodegeneration <i>in vivo</i> and is increased in AD.</li> </ul>	Baleriola et al., 2014
Mice embryo motoneurons cultured in 2 channel microfluidic device	Microarrays	Spinal muscular atrophy (SMA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>SMN knockdown produce downregulation of synaptic localization, neuron projections and growth cones related mRNAs.</li> <li>Transcripts related to local translation and energy production are enriched relative to cell bodies.</li> <li>Dysregulation of transcripts in axons and cell bodies could trigger SMA.</li> </ul>	Saa] et al., 2014
Mice embryo spinal cord motoneurons cultured in Boyden modified chambers	RNA-seq (analysis of mRNAs and miRNAs)	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>SOD1G93A and TDP43A315T mutations of ALS show enrichment in mitochondria related mRNAs; most genes altered in the SOD1 model were not altered in the TDP43 model; novel list of axonal miRNAs with altered expression levels.</li> <li>Open the possibility that axon local translation could modulate initial stages of ALS and bring possible therapies.</li> </ul>	Rotem et al., 2017
mESC derived motoneurons cultured in 2 channel microfluidic device	RNA-seq (axon-seq in house method)	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Improved sensibility in axonal RNA-Seq protocols; Identification of dysregulated genes in axons of SOD1G93A mutation ALS model including previous known ALS-causing genes.</li> <li>Axon seq could be a robust, sensible and of low cost RNA Sequencing for polarized cells.</li> </ul>	Nijssen et al., 2018
Isogenic human-induced pluripotent stem cell-derived motor neurons cultured as nerve organoid in microfluidic device	RNA-seq	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Identification of aberrant axon branching and increased levels of Fos-b mRNA. Overexpression of Fos-b produced aberrant axon branching <i>in vivo</i> and siRNA treatment ameliorated the observed phenotype.</li> <li>Provide a complete RNA profile of human motor neurons, provides a novel strategy for neurodegenerative axon analysis and present Fos-b pathway as potential therapeutic target in future ALS research.</li> </ul>	Akiyama et al., 2019

TBA42 mutant and wild type mice. They found 3 differentially expressed proteins and suggesting early signatures of imminent neurodegeneration long before behavioral changes appear (Yang et al., 2013). Other independent study performed proteomics on isolated synaptosomes from human brain autopsies with AD and respective controls, reporting 26 differential synaptic proteins with functions related to energy metabolism, signal transduction, vesicle transport, structure, and antioxidant activity (Chang et al., 2013). In addition, a recent work analyzes the synapse disruption due to A $\beta$  aggregates and perform an unbiased proteomic screen plus a systematic *in silico* analysis of synaptoneurosome preparations from human AD brain cortices with a known APOE genotype variants and controls subjects (Hesse et al., 2019). The authors detected 5500 proteins with a decrease of proteins relevant for synaptic and mitochondrial function and an increase on those involved in neuroimmune interactions and intracellular signaling.

Most of the previously mentioned transcriptomics/proteomics reports cannot discern which mRNAs are translated in axon/synaptic compartments and this information is important since LPS at dendrites and axons is involved in plasticity related processes in the brain (Donlin-Asp et al., 2021), and influence the progression of neurodegenerative diseases (Thelen and Kye, 2019; Lin et al., 2020; Fernandopulle et al., 2021). Moreover, it was

recently reported that APP is locally synthesized in synaptosomes of TgCRND8 mice (a model of AD that overexpress the human APP) and that other synaptosome proteins increase its local translation at control animals trained by fear conditioning experiments but not in the AD models (Cefaliello et al., 2020). The authors suggest a synaptic plasticity impairment related to LPS at synapses with an unknown connection with AD development. In the same line the group of Hengst visualized nascent locally synthesized proteins by BONCAT assay in hippocampal neuronal axons exposed to A $\beta_{1-42}$  oligomers and found partial overlap with controls, dysregulation of mRNAs previously reported as AD-related genes including APP, ApoE, Clu, and FERMT2 and novel ones like ATF4 for which was demonstrated its role in neurodegeneration progression (Baleriola et al., 2014). The authors also show an increase on axonal LPS after exposition to A $\beta_{1-42}$  and the essential role of A $\beta_{1-42}$  for cell death induction. The same group recently reported how translation of axonally localized, but previously silenced sentinel mRNAs, are induced by exposure to A $\beta$  peptide, generating a retrograde signaling complex including vimentin (Walker et al., 2018), and thus, reinforcing the importance of axonal transcriptome and dynamic LPS in disease mechanisms. On the other side, it has been observed that A $\beta$  oligomers can also stimulate tau LPS in the somatodendritic domain

**TABLE 4 |** Summary of synaptic omic approaches for the study of neurodegenerative diseases.

Synaptic isolation strategy	Omic strategy	Neuronal disorder analyzed	Main discoveries	References
Synaptoneuroosomes from postmortem human prefrontal cortex	Microarrays	Incipient Alzheimer's disease (iAD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increased expression of neuroplasticity related mRNAs including <i>GLUR2</i> and <i>CHRM3</i>.</li> <li><i>GLUR2</i> could have an incidence in AD development and <i>CHRM3</i> a compensatory mechanism of iAD patients – 3'UTR conserved motifs.</li> </ul>	Williams et al., 2009
Synaptosomes from human postmortem hippocampus and temporal cortex	Proteomics	Incipient Alzheimer's disease (iAD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>26 proteins involving different cellular functions (energy metabolism, signal transduction, vesicle transport, structure, and antioxidant activity) were differentially expressed between AD and control subjects involved in synaptic dysfunction.</li> </ul>	Chang et al., 2013
Synaptoneurosome from human post mortem superior temporal gyrus and primary visual cortex	Proteomics	Alzheimer's Disease (AD) with known APOE gene status	<ul style="list-style-type: none"> <li>Identification of 5,500 proteins in human brain synapses.</li> <li>Decrease abundance of proteins important for synaptic and mitochondrial function and an increase on those involved in neuroimmune interactions and intracellular signaling at AD brain synapses.</li> </ul>	Hesse et al., 2019
Synaptosomes from spinal cords central synapses of P14 <i>Smn2B<sup>-/-</sup></i> mice	Proteomics	Spinal muscular atrophy (SMA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>65 proteins differentially expressed at early presymptomatic stages with enriched molecular functions related to mitochondrial dynamics, cholesterol biogenesis and protein clearance.</li> <li>These proteins are involved in cellular functions including energy metabolism, signal transduction, vesicle transport, structure, and antioxidant activity – uncover potential markers for pathogenic mechanism that triggers synaptic dysfunction.</li> </ul>	Eshraghi et al., 2019
Synaptosomes from <i>SOD1G93A</i> mice model	Proteomics	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Perform network analysis and identified <i>Staufen1</i> as major mediator of dynein interactions through <i>PP1B</i> protein.</li> <li>Demonstrate that Dynein-<i>Staufen1</i>-<i>PP1B</i> interactions was altered in ALS models.</li> <li>Suggest a model in which dynein at synapses do clustering and anchoring of mRNAs including <i>Staufen1</i> and these interaction regulate mRNA localization along the axon and the synapses and is altered in ALS models.</li> </ul>	Gershoni-Emek et al., 2016

mediated by the activation of kinase FYN, using both *in vivo* and *in vitro* models (Li and Götz, 2017). This study proposes a new hypothesis to the somatodendritic accumulation of tau, a common event in AD, although being distant from the axonal or synaptic compartments discussed before.

Despite all these relevant results, the capacity to perform recently developed techniques to evaluate newly synthesized proteins combined with omics approaches including Axon TRAP (Shigeoka et al., 2016; Ostroff et al., 2019), adapted FACS systems (Poulopoulos et al., 2019) or the metabolic labeling protocols (i.e., BONCAT combined with proteomics assays) can be implemented in the near future to compare proteins levels in different neuronal disease models at different developmental stages to identify how LPS can affect neurological disorders, as other suggested (Lin et al., 2020). The later revision provides an interesting meta-analysis indicating that in the top100 expressed transcripts across different axonal transcriptomes and translomes sets are included genes reported as essential for the development of neuronal disorders.

### Spinal Muscular Atrophy

Muscle paralysis in motor neuron related diseases, such as Spinal Muscular Atrophy (SMA) and amyotrophic lateral sclerosis (see below), is caused by functional impairment and motor neurons' degeneration. In 95% of SMA cases an autosomal recessive condition associated with mutations in the survival of motor

neurons (*SMN1*) gene is the cause of the disease. Those mutations reduced but not depleted the levels of full-length *SMN* protein and this event is sufficient to sustain the survival of most cell types but of spinal motor neurons (Edens et al., 2015).

Disturbed mRNA processing and axonal transport in SMA has been proposed as potential mechanisms leading to the dysfunction and degeneration of motor neurons (Fallini et al., 2012; Chaytow et al., 2018). Interestingly, transcriptome analysis of motor neurons in a mouse SMA model at early presymptomatic stage detects expression-level changes and splicing abnormalities of specific mRNAs critical for motor neuron functions, revealing molecular events that could explain initial key aspects of SMA development (Zhang et al., 2013). Other reports show synaptic related impairments including a reduction in proprioceptive synaptic functions that leads to motor neuron dysfunction, behavior impairments (Fletcher et al., 2017) and the impaired synaptic vesicle release at neuromuscular junction together with postsynaptic side abnormalities in acute SMA stages (Kong et al., 2009; Martínez-Hernández et al., 2013). In addition, it was demonstrated that there are impairments at central synapses during SMA progression, resulting in the loss of excitatory glutamatergic synaptic inputs to motor neurons that may enhance their vulnerability to degeneration and death (Tarabal et al., 2014). All previous results suggest that SMA, typically considered a motor neuron disease, could have dysregulations in other cells, axons, neuronal circuits and

central synapses, as suggested previously (Murray et al., 2008; Torres-Benito et al., 2011). Although is out of the scope of this revision, recent reports also suggest that glial cells could have a role in SMA motor neuron degeneration (Abati et al., 2020).

Functional genomics in axons and synapses could shed light in the understanding of SMA pathology, especially at early stages. Nevertheless, those approaches are not abundant in the literature. In this regard, Sendtner's group analyzed axonal transcriptome changes by microarray analysis in neurons under-expressing Survivor Motor Neuron (SMN) mRNA, one of the deficient proteins in SMA (Saal et al., 2014). In SMN knock down, mRNA levels were affected in somatodendritic and axonal compartments and a great proportion of axonal mRNAs were downregulated compared to axons in basal conditions with gene ontologies related to synaptic localization, neuron projections and growth cones suggesting defects in axon elongation and presynaptic differentiation.

A recent publication analyzed the proteomics on isolated synaptosomes of spinal cords synapses of P14 Smn2B/- mice, a model of SMA (Eshraghi et al., 2019). The authors report 2,030 proteins from which 65 proteins are differentially expressed in relation to the controls at the early presymptomatic stages with enriched molecular functions related to mitochondrial dynamics, cholesterol biogenesis, and protein clearance. This small group of proteins could lead to neurotoxicity dependent cell death and synaptic dysfunction that can be further studied to discern their role in potential therapies that bring stability to the central synapses and preserve the neuronal integrity.

### Amyotrophic Lateral Sclerosis

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a lethal motor neuron disease with no current treatment, which is characterized by progressive loss of upper and lower motor neurons at the spinal or bulbar level. The long axons of these neurons become damaged at the initial stages of ALS and the axonal dysfunction appears prior to the motor phenotype of the disease (Fischer et al., 2004; Roy et al., 2005), suggesting that ALS could be redefined as a distal axonopathy disease (Moloney et al., 2014). Recent studies reveal that the axo-pathomechanisms in ALS include problems in neuronal cytoskeleton, cargo transport, axonal energy supply, clearance of junk proteins, and aberrant axonal branching [reviewed by Suzuki et al. (2020)]. Mutations in SOD1, C9orf72, TARDBP, and FUS are known genes contributing toward ALS (Rosen, 1993; Kwiatkowski Jr., Bosco et al., 2009; Vance et al., 2009; DeJesus-Hernandez et al., 2011).

Other authors propose that ALS can be understood as a synaptopathy due to perturbations of synaptic structure and function, glutamate excitotoxicity, impaired transport defects, and free radical-mediated oxidative stress [reviewed by Zarei et al. (2015)] at early stages of the disease before the appearance of patient symptoms due to loss of motor neurons [reviewed by Fogarty (2019)]. In this context, different reports show how the dysregulation of synaptic related elements can trigger ALS development. For example, the poly-glycine-alanine aggregates cause a reduction in SV2 protein synaptic release leading to neuronal death that can be rescued by restoring SV2 levels, thus opening a possible early clinical ALS therapy (Jensen et al., 2020).

The mitochondrial dysfunction at the synaptic clefts of ventral horns was also proposed as a possible trigger of sporadic ALS (Engelen-Lee et al., 2017). The overexpression of TDP43 mutants reduce excitability within pyramidal neurons and attenuates synaptic function associated with ALS progression (Jiang et al., 2019). Previous reports clearly show how ALS is a neuronal disorder in which subcellular local aspects must be considered, including axonopathy and synaptopathy related studies by functional omics (Casas et al., 2016).

Regarding axonopathy related studies, Rotem et al. (2017) analyzed the axonal and somatic transcriptomes of mice with SOD1<sup>G93A</sup> and TDP43<sup>A315T</sup> ALS mutations and found that the genes enriched in axons of both SOD1<sup>G93A</sup> and TDP43<sup>A315T</sup> mutations were associated with mitochondrial function, as previously reported in several ALS models. However, most of the altered genes in the SOD1<sup>G93A</sup> mutation model were not altered in the TDP43 system, and vice versa. This result is consistent with the ALS pathology behavior, which is indistinguishable between the ALS SOD1 and the ALS TDP43 phenotypes. In addition to the mRNA analysis, the authors also describe a list of several miRNAs which have been proposed as potential ALS biomarkers and could be contributors to disease progression (Foggin et al., 2019; Jollin et al., 2020).

Hedlund group analyzed the axonal transcriptomes in ALS models performing an in-house method called "Axon-seq" in cultured mice and human mESC derived motor neurons with the SOD1<sup>G93A</sup> mutation (Nijssen et al., 2018). This method combines compartmentalized microfluidic devices, RNA-Seq and specific bioinformatic analysis. The authors detect up to 5,000 mRNAs in mouse and human stem cell-derived motor neuron axons with oxidative energy and ribosome production as the top identified molecular functions. In relation to ALS, they identified 121 dysregulated genes in neurons containing the SOD1<sup>G93A</sup> mutation and only two of these genes, Zfp688 and Zfp688, were also dysregulated in the SOD1<sup>G93A</sup> soma compartment, suggesting that axon specific changes might occur during disease progression.

Although the previous two groups employed the same mutation model for ALS, they analyzed transcriptomes from different neuron types (spinal cord cultured neurons and mESC derived motor neurons) and used different axon isolation protocols. This might explain why the results between these experiments are barely comparable, as they detect a very different number of total axonal transcripts. While in Rotem et al. (2017) the authors detected more than 15,000 mRNAs localized in axons, Nijssen et al. (2018) detected less than a half of the mRNAs (4,479 with RPKM > 1 or 6,568 with RPKM > 0.1). Nijssen et al. (2018) argue that their sequencing method (Axon-seq) detected less mRNAs because previously reported methods may have cross-contamination between somatodendritic and axonal compartments. The lists of differentially expressed genes in SOD1<sup>G93A</sup> for both studies have no overlapping, denoting how different experimental procedures and patient backgrounds can affect the results obtained.

In the case of Aoki's group study, they performed RNA profiling of isolated axons from nerve organoids which mimics motor nerve tissue (Akiyama et al., 2019). Using genetic

tools, the authors produce isogenic hiPSCs-derived motor neurons carrying the single amino acid mutation p.H517D in the FUS gene. After RNA-Seq analysis, the authors detected 671 differentially expressed genes in the axon compartment compared to the cell bodies. From this list they highlighted Fos-b, the binding target of FUS, with increased levels in FUS mutant motor neurons and conclude that this factor could be a key regulator of FUS-mutant axon branching *in vitro* and *in vivo* suggesting that Fos-B pathway could be a potential therapeutic target in future ALS research.

Regarding synaptic related omics, synaptosome extraction from SOD1<sup>G93A</sup> and wild type mice combined with a dynein immunoprecipitation step and mass spectrometry was used to identify disrupted interaction between this retrograde motor protein and Staufeni, an essential RNA binding protein for transport and localization of neuronal RNAs in axon and synapses (Gershoni-Emek et al., 2016). The authors suggest that this disrupted interaction could lead to synaptic dysfunction and motor neuron toxicity in ALS.

## DISCUSSION

The application of functional genomics approaches has contributed to our understanding of the molecular characterization of neuronal processes in health and disease. Despite these advances, many questions remain unanswered and there is a clear need to translate these omics findings into detailed mechanistic information of the cellular and physiological processes behind them.

For example, an open question is about the complexity, differences or commonalities in the transcriptome of axons and synaptic fractions isolated from *in vitro* or *in vivo* models. Recent findings reported by us showed that the transcriptome of isolated axoplasm from rat myelinated motor fibers *in vivo* is “less complex” –1,008 mRNAs detected (Farias et al., 2020)– than those reported *in vitro*: 15,555 mRNAs in Minis et al. (2014), 11,145 in Zappulo et al. (2017), 4,553 in Nijssen et al. (2018), and 9,858 in Briese et al. (2016). Although those differences can also be ascribed largely to changes between developmental stages (immature vs. mature), neuronal models and experimental protocols, the results reveal the importance of improving and extending *in vivo* models and patient derived cell systems to better understand neuronal processes. In the case of motor neuron diseases, interesting data could arise from transcriptome studies on axoplasm material isolated from animal models of ALS or SMA. Moreover, the analysis by RNA-Seq of splice variants that can trigger many disease pathologies, and alternative UTR sequences, that regulate the axonally transported RNA populations (Taliaferro et al., 2016; Turner-Bridger et al., 2020), could be an interesting avenue to understand the development of motor diseases (Kar et al., 2018; Tushev et al., 2018; Bae and Miura, 2020). In parallel, important considerations about the contamination of each isolation procedure need to be taken into account since neurites or synaptic components have lower total amounts of RNA/proteins compared to surrounded

cell bodies or glial cells. It is expected that current and future studies will rely more on the quality rather than the quantity of starting material. Indeed, single cell and/or spatial transcriptomics with subcellular resolution could contribute toward this problem in the local identification of transcripts minimizing isolation steps. Additionally, we may pose simple but relevant questions: does one type of neuron can have different axonal transcriptomes? Do different neurons have different axonal transcriptome? Is there a core group of mRNAs in the axon or synapses?

Due to the relevance of LPS in axonal development, homeostasis and synaptic plasticity, the identification of locally translated mRNAs could be a step forward in the study of neuronal disease etiology (Kindler and Kreienkamp, 2012; Swanger and Bassell, 2013; Kuzniowska et al., 2020). The use of pulse-chase stable isotopic amino acids, amino acid analogs, or puromycin labeling, coupled with mass spectrometry protein identification from *in vivo* isolated neuronal compartments, could open new avenues to identify the repertoire of newly synthesized proteins at normal or pathological conditions. New protocols, like Axon-TRAP promise to generate pictures of *in vivo* responses in different experimental setups including axonopathies. Performing these protocols in isolated axoplasm material from adult peripheral nerves who carry specific mutations that generate neurological disorders, like ALS, could also be of importance to unravel molecular aspects of these diseases, especially at the early stages.

It is also relevant to consider neuropil activated monosomes from both synaptic compartments (Biever et al., 2020), which together with previous findings on ribosomes assembled at axons independently from the nucleolus (Shigeoka et al., 2019) opens a new window in how to analyze axon/synaptic translomics. Since monosomes were demonstrated as key contributors to the neuronal translome, in particular for axonal side regions (Biever et al., 2020), the fact that standard protocols like Ribo-Seq selectively analyze polysome footprints, may provide an incomplete view at least for axonal translational regulation. Moreover, active monosomes in the neuropil seem to prefer longer and complex mRNAs, suggesting that monosome and slow translation could allow post translational modifications that are essential for synaptic plasticity events and for the prevention of protein aggregations, critical in neuronal disorders (Biever et al., 2020). Future analysis in this direction probably will shed light on how complex disorders like ALS or AD are developed at axon or synaptic levels.

Mass spectrometry technologies have dramatically increased their sensitivity in dynamic and quantitative proteomics. However, analyzing the dynamic changes in the synaptic proteome is a difficult task due to the intrinsic variability in the isolation of the structures of interest (Dieterich and Kreutz, 2016). Moreover, synapses also have a complex architecture with thousands of protein interactions that classical proteomic approaches cannot resolve. The development of chemical cross-linking combined with mass spectrometry techniques, known as XL-MS protocols, allows the capture of both native protein

structures and interactions by cross-linking reagents in a physiologically subcellular context of interest (Liu et al., 2015). Recent work applies these protocols to generate the largest cross-linking datasets to date and reveal the complex architecture of the synaptic compartment (Gonzalez-Lozano et al., 2020).

In addition to the challenges derived from the study of synaptic dynamics by proteomics, analytical steps also have to consider the “average problem” (Wang and Savas, 2018), which is produced by highly abundant proteins that can mask the measurement of low abundance but important synaptic proteins. Different protocols like LCM (Kennard et al., 2014), FACS (Biesemann et al., 2014), biorthogonal strategies (Heo et al., 2018), APEX and BioID (de Wit et al., 2009; Uezu et al., 2016) could help to analyze synaptic type-specific proteomes, since they are pseudo-independent of organelle or subdomain purifications (Wang and Savas, 2018).

Another current challenge for synaptic and localized neuronal proteomics is how to study the implicit diversity of the brain connectome. Undoubtedly any precise profiling of RNA and proteins at the different levels of the connectome (cell body, axon, dendrites, and synapse) will make an invaluable contribution to the description of how neuronal networks function, and could facilitate the development of novel therapeutics for neurological disorders in the future. Nevertheless, initial metadata analysis of synaptic neuroproteomics of independent experiments developed in the same neurological disorder's models reveal that only few detected proteins are constantly dysregulated (Reig-Viader et al., 2018) suggesting that a more standardized and systematic research is needed to identify the key pathophysiological mechanisms involved. Future research in the field may require larger-scale experiments combining proteomics and biochemical validations in order to address the intrinsic methodological and biological variability.

Synaptic proteomics faces additional challenges in the study of post-translational modifications, since plasticity-related processes like Long Term Potentiation initiation requires SUMOylation (Daniel et al., 2018) and phosphorylation of many pre- and postsynaptic proteins (Lee, 2006; Yokoi et al., 2012; Li et al., 2016). The post-translational modifications increase peptide spectra and consequently reducing the depth of traditional proteomic analyses that are being approached using recent preparation approaches and MS search algorithms, like open search (Chick et al., 2015).

A complementary approach to standard functional genomics is the characterization of mRNA composition by spatial transcriptomics (see Section “Transcriptomics and Translatomics at the Synaptic Compartments”). These approaches provide an unprecedented resolution (Luecken and Theis, 2019) and could serve as a bridge between neuroscience, computational biology, and systems biology, enabling a better understanding of the brain's cellular heterogeneity and its subcompartment

complexity too. In combination with powerful omics and expansion microscopy (i.e., ExSeq) there are promising protocols to analyze difficult to isolate compartments and bring new insights about the RNAs present in specific neuronal compartments at basal or neuronal disease conditions (Kulkarni et al., 2019).

As many new routes of research lay in the future, it remains to be investigated the local role of other regulatory components by omics approaches like non-coding RNAs in axons (Natera-Naranjo et al., 2010; Sasaki et al., 2014; Corradi and Baudet, 2020) as well as synapses (Earls et al., 2014; Smalheiser, 2014; Epple et al., 2021), or different regulatory pathways controlling local protein synthesis impacting local physiology of an individual axon or synaptic bouton (Terenzio et al., 2018). In summary, the dynamic quantification of transcripts and proteins localized in each neuronal compartment by functional genomics, in combination with sophisticated methods for isolation/visualization of the biological material, will help to understand the molecular changes occurring in these cytoplasmic territories in basal conditions and their involvement in neuronal disorders.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JRSS designed and planned the revision contents. AD and JRSS wrote the manuscript and designed the figures. AD and JG developed the tables and searched for references. JG, GE, JF, FDB, and PS, contributed to specific sections according to their expertise. AD and JRSS prepared the final corrected version. All authors contributed to the proofing, corrections and approved the final version of the article.

## FUNDING

This study was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) for funding projects codes: CSIC Inciación 2013 #197 and #370; Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA); the IUBMB Wood-Whelan Fellowships grants of 2017, the 2018 ASBMB-PROLAB fellowships and the Science and Innovation Fund from the Foreign and Commonwealth Office-ANII Grant code UK\_ID\_2015\_1\_3. ANII-Max Plank MPI\_ID\_2020\_1\_1010120.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the following institutions for the financial support received: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) for funding projects codes: INI\_X\_2011\_1\_3852, POS\_NAC\_2012\_1\_8584, POS\_NAC\_2013\_1\_11165, POS\_NAC\_2016\_1\_129865, and POS\_NAC\_2016\_1\_129959. We give special thanks to Florencia Pages Videla for all the support during the writing of the manuscript.

## REFERENCES

- Abati, E., Citterio, G., Bresolin, N., Comi, G. P., and Corti, S. (2020). Glial cells involvement in spinal muscular atrophy: could SMA be a neuroinflammatory disease? *Neurobiol. Dis.* 140:104870. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104870
- Adalbert, R., and Coleman, M. P. (2013). Review: axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39, 90–108. doi: 10.1111/j.1365-2990.2012.01308.x
- Akiyama, T., Suzuki, N., Ishikawa, M., Fujimori, K., Sone, T., Kawada, J., et al. (2019). Aberrant axon branching via Fos-B dysregulation in FUS-ALS motor neurons. *EBioMedicine* 45, 362–378. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.06.013
- Alon, S., Goodwin, D. R., Sinha, A., Wassie, A. T., Chen, F., Daugharthy, E. R., et al. (2021). Expansion sequencing: spatially precise in situ transcriptomics in intact biological systems. *Science* 371:eaa2656. doi: 10.1126/science.aax2656
- Alvarez, J., and Torres, J. C. (1985). Slow axoplasmic transport: a fiction? *J. Theor. Biol.* 112, 627–651. doi: 10.1016/s0022-5193(85)80028-x
- Andreassi, C., Zimmermann, C., Mitter, R., Fusco, S., De Vita, S., Saiardi, A., et al. (2010). An NGF-responsive element targets myo-inositol monophosphatase-1 mRNA to sympathetic neuron axons. *Nat. Neurosci.* 13, 291–301. doi: 10.1038/nn2486
- Apóstolo, N., Smukowski, S. N., Vanderlinden, J., Condomitti, G., Rybakín, V., Ten Bos, J., et al. (2020). Synapse type-specific proteomic dissection identifies IgSF8 as a hippocampal CA3 microcircuit organizer. *Nat. Commun.* 11:5171.
- Arey, R. N., Kalesky, R., and Murphy, C. T. (2019). Nervous system-wide profiling of presynaptic mRNAs reveals regulators of associative memory. *Sci. Rep.* 9:20314.
- Armand, E. J., Li, J., Xie, F., Luo, C., and Mukamel, E. A. (2021). Single-cell sequencing of brain cell transcriptomes and epigenomes. *Neuron* 109, 11–26. doi: 10.1016/j.neuron.2020.12.010
- Bae, B., and Miura, P. (2020). Emerging roles for 3' UTRs in neurons. *Int. J. Mol. Sci.* 21:3413. doi: 10.3390/ijms21103413
- Bai, F., and Witzmann, F. A. (2007). Synaptosome proteomics. *Subcell. Biochem.* 43, 77–98. doi: 10.1007/978-1-4020-5943-8\_6
- Baleriola, J., Walker, C. A., Jean, Y. Y., Cray, J. F., Troy, C. M., Nagy, P. L., et al. (2014). Axonally synthesized ATF4 transmits a neurodegenerative signal across brain regions. *Cell* 158, 1159–1172. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.001
- Bassell, G. J., Zhang, H., Byrd, A. L., Femino, A. M., Singer, R. H., Taneja, K. L., et al. (1998). Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J. Neurosci.* 18, 251–265. doi: 10.1523/jneurosci.18-01-00251.1998
- Bellón, A., Iyer, A., Bridi, S., Lee, F. C. Y., Ovando-Vázquez, C., Corradi, E., et al. (2017). miR-182 regulates Slit2-mediated axon guidance by modulating the local translation of a specific mRNA. *Cell Rep.* 18, 1171–1186. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.093
- Biesemann, C., Grønberg, M., Luquet, E., Wichert, S. P., Bernard, V., Bungers, S. R., et al. (2014). Proteomic screening of glutamatergic mouse brain synaptosomes isolated by fluorescence activated sorting. *EMBO J.* 33, 157–170. doi: 10.1002/embj.201386120
- Biever, A., Glock, C., Tushev, G., Ciirdaeva, E., Dalmay, T., Langer, J. D., et al. (2020). Monosomes actively translate synaptic mRNAs in neuronal processes. *Science* 367:eaay4991. doi: 10.1126/science.aay4991
- Bigler, R. L., Kamande, J. W., Dumitru, R., Niedringhaus, M., and Taylor, A. M. (2017). Messenger RNAs localized to distal projections of human stem cell derived neurons. *Sci. Rep.* 7:611. doi: 10.1038/s41598-017-00676-w
- Blumenstock, S., Angelo, M. F., Peters, F., Dorostkar, M. M., Ruf, V. C., Luckner, M., et al. (2019). Early defects in translation elongation factor 1 $\alpha$  levels at excitatory synapses in  $\alpha$ -synucleinopathy. *Acta Neuropathol.* 138, 971–986. doi: 10.1007/s00401-019-02063-3
- Bodian, D. (1965). A suggestive relationship of nerve cell rna with specific synaptic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 53, 418–425. doi: 10.1073/pnas.53.2.418
- Booth, R. F., and Clark, J. B. (1978). A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain. *Biochem. J.* 176, 365–370. doi: 10.1042/bj1760365
- Bosch, J. A., Chen, C.-L., and Perrimon, N. (2021). Proximity-dependent labeling methods for proteomic profiling in living cells: an update. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 10:e392.
- Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453–466. doi: 10.1084/jem.115.3.453
- Boyken, J., Grønberg, M., Riedel, D., Urfaub, H., Jahn, R., and Chua, J. J. E. (2013). Molecular profiling of synaptic vesicle docking sites reveals novel proteins but few differences between glutamatergic and GABAergic synapses. *Neuron* 78, 285–297. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.027
- Brady, S. T., Lasek, R. J., and Allen, R. D. (1985). Video microscopy of fast axonal transport in extruded axoplasm: a new model for study of molecular mechanisms. *Cell Motil.* 5, 81–101. doi: 10.1002/cm.970050203
- Breijyeh, Z., and Karaman, R. (2020). Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. *Molecules* 25:5789. doi: 10.3390/molecules25245789
- Briese, M., Saal, L., Appenzeller, S., Moradi, M., Baluapuri, A., and Sendtner, M. (2016). Whole transcriptome profiling reveals the RNA content of motor axons. *Nucleic Acids Res.* 44:e33. doi: 10.1093/nar/gkv1027
- Buchheit, T. E., and Tytell, M. (1992). Transfer of molecules from glia to axon in the squid may be mediated by glial vesicles. *J. Neurobiol.* 23, 217–230. doi: 10.1002/neu.480230303
- Burch, A., Tao-Cheng, J.-H., and Dosemeci, A. (2017). A novel synaptic junction preparation for the identification and characterization of cleft proteins. *PLoS One* 12:e0174895. doi: 10.1371/journal.pone.0174895
- Cagnetta, R., Frese, C. K., Shigeoka, T., Krijgsveld, I., and Holt, C. E. (2018). Rapid cue-specific remodeling of the nascent axonal proteome. *Neuron* 99, 29.e4–46.e4.
- Cajigas, I. J., Tushev, G., Will, T. J., tom Dieck, S., Fuerst, N., and Schuman, E. M. (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
- Campbell, D. S., and Holt, C. E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32, 1013–1026. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00551-7
- Campanot, R. B. (1977). Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 4516–4519. doi: 10.1073/pnas.74.10.4516
- Campanot, R. B., and MacInnis, B. L. (2004). Retrograde transport of neurotrophins: fact and function. *J. Neurobiol.* 58, 217–229. doi: 10.1002/neu.10322
- Canclini, L., Farias, J., Di Paolo, A., Sotelo-Silveira, J. R., Folle, G., Kun, A., et al. (2020). Association of microtubules and axonal RNA transferred from myelinating Schwann cells in rat sciatic nerve. *PLoS One* 15:e0233651. doi: 10.1371/journal.pone.0233651
- Casas, C., Manzano, R., Vaz, R., Osta, R., and Brites, D. (2016). Synaptic failure: focus in an integrative view of ALS. *Brain Plast.* 1, 159–175. doi: 10.3233/bpl-140001
- Cefaliello, C., Penna, E., Barbato, C., Di Ruberto, G., Mollica, M. P., Trinchesi, G., et al. (2020). Deregulated local protein synthesis in the brain synaptosomes of a mouse model for Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 57, 1529–1541. doi: 10.1007/s12035-019-01835-y
- Chang, R. Y. K., Nouwens, A. S., Dodd, P. R., and Etheridge, N. (2013). The synaptic proteome in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 9, 499–511.
- Chaytow, H., Huang, Y.-T., Gillingwater, T. H., and Fallor, K. M. E. (2018). The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3877–3894. doi: 10.1007/s00018-018-2849-1
- Chesnokova, E. A., and Kolosov, P. M. (2017). Local protein synthesis in dendritic terminals and its regulation in normal conditions and during plastic changes. *Neurosci. Behav. Physiol.* 47, 595–607. doi: 10.1007/s11055-017-0440-0
- Chick, J. M., Kolippakkam, D., Nusinow, D. P., Zhai, B., Rad, R., Huttlin, E. L., et al. (2015). Erratum: a mass-tolerant database search identifies a large proportion of unassigned spectra in shotgun proteomics as modified peptides. *Nat. Biotechnol.* 33:882. doi: 10.1038/nbt0815-882d
- Chuang, C.-F., King, C.-E., Ho, B.-W., Chien, K.-Y., and Chang, Y.-C. (2018). Unbiased proteomic study of the axons of cultured rat cortical neurons. *J. Proteome Res.* 17, 1953–1966. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00069
- Corradi, E., and Baudet, M.-L. (2020). In the right place at the right time: miRNAs as key regulators in developing axons. *Int. J. Mol. Sci.* 21:8726. doi: 10.3390/ijms21228726

- Corradi, E., Dalla Costa, I., Gavoci, A., Iyer, A., Rocuzzo, M., Otto, T. A., et al. (2020). Axonal precursor miRNAs hitchhike on endosomes and locally regulate the development of neural circuits. *EMBO J.* 39:e102513.
- Court, F. A., Hendriks, W. T. J., MacGillavry, H. D., Alvarez, J., and van Minnen, J. (2008). Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *J. Neurosci.* 28, 11024–11029. doi: 10.1523/jneurosci.2429-08.2008
- Crispino, M., Capano, C. P., Kaplan, B. B., and Giuditta, A. (1993). Neurofilament proteins are synthesized in nerve endings from squid brain. *J. Neurochem.* 61, 1144–1146. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03632.x
- Crispino, M., Chun, J. T., Cefalio, C., Perrone Capano, C., and Giuditta, A. (2014). Local gene expression in nerve endings. *Dev. Neurobiol.* 74, 279–291. doi: 10.1002/dneu.22109
- Crispino, M., Kaplan, B. B., Martin, R., Alvarez, J., Chun, J. T., Benech, J. C., et al. (1997). Active polysomes are present in the large presynaptic endings of the synaptosomal fraction from squid brain. *J. Neurosci.* 17, 7694–7702. doi: 10.1523/jneurosci.17-20-07694.1997
- Dadon-Nachum, M., Melamed, E., and Offen, D. (2011). The “dying-back” phenomenon of motor neurons in ALS. *J. Mol. Neurosci.* 43, 470–477. doi: 10.1007/s12031-010-9467-1
- Dajas-Bailador, F., Bonev, B., Garcez, P., Stanley, P., Guillemot, F., and Papalopulu, N. (2012). microRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 697–699. doi: 10.1038/nn.3082
- Dalla Costa, I., Buchanan, C. N., Zdradzinski, M. D., Sahoo, P. K., Smith, T. P., Thames, E., et al. (2021). The functional organization of axonal mRNA transport and translation. *Nat. Rev. Neurosci.* 22, 77–91. doi: 10.1038/s41583-020-00407-7
- Daniel, J. A., Cooper, B. H., Palvimo, J. J., Zhang, F.-P., Brose, N., and Tirard, M. (2018). Response: commentary: analysis of SUMO1-conjugation at synapses. *Front. Cell. Neurosci.* 12:117. doi: 10.3389/fncel.2018.00117
- Datta, S., Malhotra, L., Dickerson, R., Chaffee, S., Sen, C. K., and Roy, S. (2015). Laser capture microdissection: big data from small samples. *Histol. Histopathol.* 30, 1255–1269.
- De Camilli, P., Harris, S. M. Jr., Huttner, W. B., and Greengard, P. (1983). Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes. *J. Cell Biol.* 96, 1355–1373. doi: 10.1083/jcb.96.5.1355
- de Robertis, E. D., and Bennett, H. S. (1955). Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 47–58. doi: 10.1083/jcb.1.1.47
- de Robertis, E., Pellegrino, de Iraldi, A., Rodriguez, G., and Gomez, C. J. (1961). On the isolation of nerve endings and synaptic vesicles. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 229–235. doi: 10.1083/jcb.9.1.229
- de Robertis, E., Rodriguez, de Lores Arnaiz, G., Pellegrino, and de Iraldi, A. (1962). Isolation of synaptic vesicles from nerve endings of the rat brain. *Nature* 194, 794–795. doi: 10.1038/194794a0
- de Robertis, E., Rodriguez, de Lores Arnaiz, G., Salganicoff, L., Pellegrino, de Iraldi, A., et al. (1963). Isolation of synaptic vesicles and structural organization of the acetylcholine system within brain nerve endings. *J. Neurochem.* 10, 225–235. doi: 10.1111/j.1471-4159.1963.tb05038.x
- de Wit, J., Sylwestrak, E., O’Sullivan, M. L., Otto, S., Tiglio, K., Savas, J. N., et al. (2009). LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. *Neuron* 64, 799–806. doi: 10.1016/j.neuron.2009.12.019
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., et al. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011
- Di Paolo, A., Farias, J., Garat, J., Macklin, A., Ignatchenko, V., Kislinger, T., et al. (2021). Rat sciatic nerve axoplasm proteome is enriched with ribosomal proteins during regeneration processes. *J. Proteome Res.* 20, 2506–2520. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00980
- Dieterich, D. C., and Kreuzt, M. R. (2016). Proteomics of the synapse—a quantitative approach to neuronal plasticity. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 368–381. doi: 10.1074/mcp.r115.051482
- Donlin-Asp, P. G., Polisseni, C., Klimek, R., Heckel, A., and Schuman, E. M. (2021). Differential regulation of local mRNA dynamics and translation following long-term potentiation and depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2017578118. doi: 10.1073/pnas.2017578118
- Donnelly, C. J., Fainzilber, M., and Twiss, J. L. (2010). Subcellular communication through RNA transport and localized protein synthesis. *Traffic* 12, 1498–1505. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01118.x
- Dunkley, P. R., and Robinson, P. J. (2018). Synaptosome preparations: which procedure should I use? *NeuroMethods* 27–53. doi: 10.1007/978-1-4939-8739-9\_3
- Dunkley, P. R., Jarvie, P. E., and Robinson, P. J. (2008). A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat. Protoc.* 3, 1718–1728. doi: 10.1038/nprot.2008.171
- Earls, L. R., Westmoreland, J. J., and Zakharenko, S. S. (2014). Non-coding RNA regulation of synaptic plasticity and memory: implications for aging. *Ageing Res. Rev.* 17, 34–42. doi: 10.1016/j.arr.2014.03.004
- Edens, B. M., Ajroud-Driss, S., Ma, L., and Ma, Y.-C. (2015). Molecular mechanisms and animal models of spinal muscular atrophy. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 685–692. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.07.024
- Edström, A., and Sjöstrand, J. (1969). Protein synthesis in the isolated Mauthner nerve fibre of goldfish. *J. Neurochem.* 16, 67–81. doi: 10.1111/j.1471-4159.1969.tb10344.x
- Eng, C.-H. L., Lawson, M., Zhu, Q., Dries, R., Koulena, N., Takei, Y., et al. (2019). Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH. *Nature* 568, 235–239. doi: 10.1038/s41586-019-1049-y
- Engelen-Lee, J., Blokhuis, A. M., Splet, W. G. M., Pasterkamp, R. J., Aronica, E., Demmers, J. A. A., et al. (2017). Proteomic profiling of the spinal cord in ALS: decreased ATP5D levels suggest synaptic dysfunction in ALS pathogenesis. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 18, 210–220. doi: 10.1080/21678421.2016.1245757
- Epple, R., Krüger, D., Berulava, T., Brehm, G., Islam, R., Köster, S., et al. (2021). The coding and small non-coding hippocampal synaptic RNAome. *Mol. Neurobiol.* 58, 2940–2953. doi: 10.1007/s12035-021-02296-y
- Eshraghi, M., Gombard, R., De Repentigny, Y., Vacratsis, P. O., and Kothary, R. (2019). Pathologic alterations in the proteome of synaptosomes from a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Proteome Res.* 18, 3042–3051. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00159
- Eyman, M., Cefalio, C., Ferrara, E., De Stefano, R., Lavina, Z. S., Crispino, M., et al. (2007). Local synthesis of axonal and presynaptic RNA in squid model systems. *Eur. J. Neurosci.* 25, 341–350. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05304.x
- Fallini, C., Bassell, G. J., and Rossoll, W. (2012). Spinal muscular atrophy: the role of SMN in axonal mRNA regulation. *Brain Res.* 1462, 81–92. doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.044
- Fantuzzo, J. A., Hart, R. P., Zahn, J. D., and Pang, Z. P. (2019). Compartmentalized devices as tools for investigation of human brain network dynamics. *Dev. Dyn.* 248, 65–77. doi: 10.1002/dvdy.24665
- Farhy-Tselnicker, I., and Allen, N. J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev.* 13:7.
- Farias, J., Holt, C. E., Sotelo, J. R., and Sotelo-Silveira, J. R. (2020). Axon microdissection and transcriptome profiling reveals the in vivo RNA content of fully differentiated myelinated motor axons. *RNA* 26, 595–612. doi: 10.1261/rna.073700.119
- Farias, J., Sotelo, J. R., and Sotelo-Silveira, J. (2019). Toward axonal system biology: genome wide views of local mRNA translation. *Proteomics* 19:e1900054.
- Faundez, V., Wynne, M., Crocker, A., and Tarquinio, D. (2019). Molecular systems biology of neurodevelopmental disorders, rett syndrome as an archetype. *Front. Integr. Neurosci.* 13:30. doi: 10.3389/fnint.2019.00030
- Femminella, G. D., Thayanandan, T., Calsolaro, V., Komici, K., Rengo, G., Corbi, G., et al. (2018). Imaging and molecular mechanisms of Alzheimer’s disease: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 19:3702. doi: 10.3390/ijms19123702
- Fernandopulle, M. S., Lippincott-Schwartz, J., and Ward, M. E. (2021). RNA transport and local translation in neurodevelopmental and neurodegenerative disease. *Nat. Neurosci.* 24, 622–632. doi: 10.1038/s41593-020-00785-2
- Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., et al. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* 185, 232–240. doi: 10.1016/j.expneurol.2003.10.004



- Fletcher, E. V., Simon, C. M., Pagiatis, J. G., Chalif, J. I., Vukojcic, A., Droback, E., et al. (2017). Reduced sensory synaptic excitation impairs motor neuron function via Kv2.1 in spinal muscular atrophy. *Nat. Neurosci.* 20, 905–916. doi: 10.1038/nn.4561
- Fogarty, M. J. (2019). Amyotrophic lateral sclerosis as a synaptopathy. *Neural Regen. Res.* 14, 189–192. doi: 10.4103/1673-5374.244782
- Foggini, S., Mesquita-Ribeiro, R., Dajas-Bailador, F., and Layfield, R. (2019). Biological significance of microRNA biomarkers in ALS-innocent bystanders or disease culprits? *Front. Neurol.* 10:578. doi: 10.3389/fneur.2019.00578
- Gershoni-Emek, N., Mazza, A., Chein, M., Gradus-Pery, T., Xiang, X., Li, K. W., et al. (2016). Proteomic analysis of dynein-interacting proteins in amyotrophic lateral sclerosis synaptosomes reveals alterations in the RNA-binding protein staufen1. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 506–522. doi: 10.1074/mcp.m115.049965
- Gilbert, D. S. (1972). Helical structure of Myxococcus axoplasm. *Nat. New Biol.* 237, 195–198. doi: 10.1038/newbio237195a0
- Giuditta, A., Chun, J. T., Eymann, M., Cefaliello, C., Bruno, A. P., and Crispino, M. (2008). Local gene expression in axons and nerve endings: the glia-neuron unit. *Physiol. Rev.* 88, 515–555. doi: 10.1152/physrev.00051.2006
- Giuditta, A., Dettbarn, W. D., and Brzin, M. (1968). Protein synthesis in the isolated giant axon of the squid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 1284–1287.
- Gonzalez-Lozano, M. A., Koopmans, F., Sullivan, P. F., Protze, J., Krause, G., Verhage, M., et al. (2020). Stitching the synapse: cross-linking mass spectrometry into resolving synaptic protein interactions. *Sci. Adv.* 6:eaa5783. doi: 10.1126/sciadv.aax5783
- Gronborg, M., Pavlos, N. J., Brunk, I., Chua, J. J. E., Münster-Wandowski, A., Riedel, D., et al. (2010). Quantitative comparison of glutamatergic and GABAergic synaptic vesicles unveils selectivity for few proteins including MAL2, a novel synaptic vesicle protein. *J. Neurosci.* 30, 2–12. doi: 10.1523/jneurosci.4074-09.2010
- Gulyássi, P., Puska, G., Györfy, B. A., Todorov-Völgyi, K., Juhász, G., Drahoš, L., et al. (2020). Proteomic comparison of different synaptosome preparation procedures. *Amino Acids* 52, 1529–1543. doi: 10.1007/s00726-020-02912-6
- Gumy, L. F., Tan, C. L., and Fawcett, J. W. (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, L. F., Yeo, G. S. H., Tung, Y.-C. L., Zivraj, K. H., Willis, D., Coppola, G., 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
- Guo, T., Zhang, D., Zeng, Y., Huang, T. Y., Xu, H., and Zhao, Y. (2020). Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegen.* 15:40. doi: 10.1186/s13024-020-00391-7
- Hafner, A.-S., Donlin-Asp, P. G., Leitch, B., Herzog, E., and Schuman, E. M. (2019). Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments. *Science* 364:eaau3644. doi: 10.1126/science.aau3644
- Hamdan, H., Lim, B. C., Torii, T., Joshi, A., Konning, M., Smith, C., et al. (2020). Mapping axon initial segment structure and function by multiplexed proximity biotinylation. *Nat. Commun.* 11:100.
- Han, S., Li, J., and Ting, A. Y. (2018). Proximity labeling: spatially resolved proteomic mapping for neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 50, 17–23. doi: 10.1016/j.conb.2017.10.015
- Hanz, S., Persson, E., Willis, D., Zheng, J.-Q., Massarwa, R., Huerta, J. J., et al. (2003). Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron* 40, 1095–1104. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00770-0
- Heller, J. P., and Rusafov, D. A. (2017). The nanoworld of the tripartite synapse: insights from super-resolution microscopy. *Front. Cell. Neurosci.* 11:374. doi: 10.3389/fncel.2017.00374
- Heo, S., Diering, G. H., Na, C. H., Nirujogi, R. S., Bachman, J. L., Pandey, A., et al. (2018). Identification of long-lived synaptic proteins by proteomic analysis of synaptosome protein turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E3827–E3836.
- Hesse, R., Hurtado, M. L., Jackson, R. J., Eaton, S. L., Herrmann, A. G., Colom-Cadena, M., et al. (2019). Comparative profiling of the synaptic proteome from Alzheimer's disease patients with focus on the APOE genotype. *Acta Neuropathol. Commun.* 7:214.
- Higginbotham, L., Dammer, E. B., Duong, D. M., Modeste, E., Montine, T. J., Lah, J. J., et al. (2019). Network analysis of a membrane-enriched brain proteome across stages of Alzheimer's disease. *Proteomes* 7:30. doi: 10.3390/proteomes7030030
- Hollingsworth, E. B., McNeal, E. T., Burton, J. L., Williams, R. J., Daly, J. W., and Creveling, C. R. (1985). Biochemical characterization of a filtered synaptosome preparation from guinea pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-generating systems, receptors, and enzymes. *J. Neurosci.* 5, 2240–2253. doi: 10.1523/jneurosci.05-08-02240.1985
- Holt, C. E., Martin, K. C., and Schuman, E. M. (2019). Local translation in neurons: visualization and function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 557–566. doi: 10.1038/s41594-019-0263-5
- Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P., and De Camilli, P. (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J. Cell Biol.* 96, 1374–1388. doi: 10.1083/jcb.96.5.1374
- Jackson, J., Jambrina, E., Li, J., Marston, H., Menzies, F., Phillips, K., et al. (2019). Targeting the synapse in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 13:735. doi: 10.3389/fnins.2019.00735
- Jensen, B. K., Schuldi, M. H., McAvoy, K., Russell, K. A., Boehringer, A., Curran, B. M., et al. (2020). Synaptic dysfunction induced by glycine-alanine dipeptides in C9orf72-ALS/FTD is rescued by SV2 replenishment. *EMBO Mol. Med.* 12:e10722.
- Jhou, J.-F., and Tai, H.-C. (2017). The study of postmortem human synaptosomes for understanding Alzheimer's disease and other neurological disorders: a review. *Neurol. Ther.* 6, 57–68. doi: 10.1007/s40120-017-0070-z
- Jiang, T., Handley, E., Brizuela, M., Dawkins, E., Lewis, K. E. A., Clark, R. M., et al. (2019). Amyotrophic lateral sclerosis mutant TDP-43 may cause synaptic dysfunction through altered dendritic spine function. *Dis. Model. Mech.* 12:dmm038109. doi: 10.1242/dmm.038109
- Jolin, G., Gray, E., Thompson, A. G., Bobeva, Y., Talbot, K., Weishaupt, J., et al. (2020). Identification of a potential non-coding RNA biomarker signature for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Commun.* 2:fcaa053.
- Jones, D. H., and Matus, A. I. (1974). Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* 356, 276–287. doi: 10.1016/0005-2736(74)90268-5
- Kamat, P. K., Kalani, A., and Tyagi, N. (2014). Method and validation of synaptosomal preparation for isolation of synaptic membrane proteins from rat brain. *MethodsX* 1, 102–107. doi: 10.1016/j.mex.2014.08.002
- Kanaan, N. M., Pigino, G. F., Brady, S. T., Lazarov, O., Binder, L. I., and Morfini, G. A. (2013). Axonal degeneration in Alzheimer's disease: when signaling abnormalities meet the axonal transport system. *Exp. Neurol.* 246, 44–53. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.06.003
- Kaplan, B. B., Gioio, A. E., Capano, C. P., Crispino, M., and Giuditta, A. (1992). beta-Actin and beta-Tubulin are components of a heterogeneous mRNA population present in the squid giant axon. *Mol. Cell. Neurosci.* 3, 133–144. doi: 10.1016/1044-7431(92)90017-v
- Kar, A. N., Lee, S. J., and Twiss, J. L. (2018). Expanding axonal transcriptome brings new functions for axonally synthesized proteins in health and disease. *Neuroscientist* 24, 111–129. doi: 10.1177/1073858417712668
- Kawada, J., Kaneda, S., Kirihara, T., Maroof, A., Levi, T., Eggan, K., et al. (2017). Generation of a motor nerve organoid with human stem cell-derived neurons. *Stem Cell Rep.* 9, 1441–1449. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.021
- Kempf, S. J., Metaxas, A., Ibañez-Vea, M., Darvesh, S., Finsen, B., and Larsen, M. R. (2016). An integrated proteomics approach shows synaptic plasticity changes in an APP/PS1 Alzheimer's mouse model. *Oncotarget* 7, 33627–33648. doi: 10.18632/oncotarget.9092
- Kennard, J. T. T., Guévremont, D., Mason-Parker, S. E., Abraham, W. C., and Williams, J. M. (2014). Redistribution of ionotropic glutamate receptors detected by laser microdissection of the rat dentate gyrus 48 h following LTP induction in vivo. *PLoS One* 9:e92972. doi: 10.1371/journal.pone.0092972
- Khan, S. S., and Bloom, G. S. (2016). Tau: the center of a signaling nexus in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 10:31. doi: 10.3389/fnins.2016.00031
- Kholodenko, B. N. (2003). Four-dimensional organization of protein kinase signaling cascades: the roles of diffusion, endocytosis and molecular motors. *J. Exp. Biol.* 206, 2073–2082. doi: 10.1242/jeb.00298
- Kim, E., and Jung, H. (2015). Local protein synthesis in neuronal axons: why and how we study. *BMB Rep.* 48, 139–146. doi: 10.5483/bmbrep.2015.48.3.010
- Kindler, S., and Kreienkamp, H.-J. (2012). Dendritic mRNA targeting and translation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970, 285–305. doi: 10.1007/978-3-70911-0932-8\_13

- Koenig, E. (1965). Synthetic mechanisms in the axon in myelin-free axons of the cat. *J. Neurochem.* 12, 357–361. doi: 10.1111/j.1471-4159.1965.tb04236.x
- Koenig, E. (1967). Synthetic mechanisms in the axon iv. In vitro incorporation of [3H]precursors into axonal protein and rna. *J. Neurochem.* 14, 437–446. doi: 10.1111/j.1471-4159.1967.tb09542.x
- 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 of the rat in vitro. *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 384–394. doi: 10.1016/1044-7431(91)90025-j
- Koenig, E., and Koelle, G. B. (1960). Acetylcholinesterase regeneration in peripheral nerve after irreversible inactivation. *Science* 132, 1249–1250. doi: 10.1126/science.132.3435.1249
- Koenig, E., Martin, R., Titmus, M., and Sotelo-Silveira, J. R. (2000). Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J. Neurosci.* 20, 8390–8400. doi: 10.1523/jneurosci.20-22-08390.2000
- Kong, L., Wang, X., Choe, D. W., Polley, M., Burnett, B. G., Bosch-Marcé, M., et al. (2009). Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J. Neurosci.* 29, 842–851. doi: 10.1523/jneurosci.4434-08.2009
- Koppel, L., and Fainzilber, M. (2018). Omics approaches for subcellular translation studies. *Mol. Omics* 14, 380–388. doi: 10.1039/c8mo00172c
- Kulkarni, A., Anderson, A. G., Merullo, D. P., and Konopka, G. (2019). Beyond bulk: a review of single cell transcriptomics methodologies and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 58, 129–136. doi: 10.1016/j.copbio.2019.03.001
- Kuzniowska, B., Cysewski, D., Wasilewski, M., Sakowska, P., Milek, J., Kulinski, T. M., et al. (2020). Mitochondrial protein biogenesis in the synapse is supported by local translation. *EMBO Rep.* 21:e48882.
- Kwiatkowski, T. J. Jr., Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., et al. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205–1208.
- Lacor, P. N. (2007). Advances on the understanding of the origins of synaptic pathology in AD. *Curr. Genomics* 8, 486–508. doi: 10.2174/138920207783769530
- Lasek, R. J., Dabrowski, C., and Nordlander, R. (1973). Analysis of axoplasmic RNA from invertebrate giant axons. *Nat. New Biol.* 244, 162–165. doi: 10.1038/newbio244162a0
- Lasek, R. J., Gainer, H., and Barker, J. L. (1977). Cell-to-cell transfer of glial proteins to the squid giant axon: the glia-neuron protein transfer hypothesis. *J. Cell Biol.* 74, 501–523. doi: 10.1083/jcb.74.2.501
- Lařek, M., Weingarten, J., Einsfelder, U., Brendel, P., Müller, U., and Volkandt, W. (2013). Amyloid precursor proteins are constituents of the presynaptic active zone. *J. Neurochem.* 127, 48–56. doi: 10.1111/jnc.12358
- Lařek, M., Weingarten, J., and Volkandt, W. (2015). The synaptic proteome. *Cell Tissue Res.* 359, 255–265.
- Lee, H.-K. (2006). Synaptic plasticity and phosphorylation. *Pharmacol. Ther.* 112, 810–832. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.06.003
- Lee, J. H., Daugharthy, E. R., Scheiman, J., Kalthor, R., Yang, J. L., Ferrante, T. C., et al. (2014). Highly multiplexed subcellular RNA sequencing in situ. *Science* 343, 1360–1363. doi: 10.1126/science.1250212
- Lee, S. H., Kang, J., Ho, A., Watanabe, H., Bolshakov, V. Y., and Shen, J. (2020). APP family regulates neuronal excitability and synaptic plasticity but not neuronal survival. *Neuron* 108, 676.e8–690.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2020.08.011
- Lein, E., Borm, L. E., and Linnarsson, S. (2017). The promise of spatial transcriptomics for neuroscience in the era of molecular cell typing. *Science* 358, 64–69. doi: 10.1126/science.aan6827
- Leung, K.-M., van Horck, F. P. G., Lin, A. C., Allison, R., Standart, N., and Holt, C. E. (2006). Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nat. Neurosci.* 9, 1247–1256. doi: 10.1038/nn1775
- Li, C., and Götz, J. (2017). Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation. *EMBO J.* 36, 3120–3138. doi: 10.15252/embj.201797724
- Li, H., Wu, C., Aramayo, R., Sachs, M. S., and Harlow, M. L. (2015). Synaptic vesicles contain small ribonucleic acids (sRNAs) including transfer RNA fragments (trfRNA) and microRNAs (miRNA). *Sci. Rep.* 5:14918.
- Li, J., Wilkinson, B., Clementel, V. A., Hou, J., O'Dell, T. J., and Coba, M. P. (2016). Long-term potentiation modulates synaptic phosphorylation networks and reshapes the structure of the postsynaptic interactome. *Sci. Signal* 9:rs8. doi: 10.1126/scisignal.aaf6716
- Lin, J. Q., van Tartwijk, F. W., and Holt, C. E. (2020). Axonal mRNA translation in neurological disorders. *RNA Biol.* doi: 10.1080/15476286.2020.1822638 [Epub ahead of print].
- Liu, C.-Y., Yang, Y., Ju, W.-N., Wang, X., and Zhang, H.-L. (2018). Emerging roles of astrocytes in neuro-vascular unit and the tripartite synapse with emphasis on reactive gliosis in the context of Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 12:193. doi: 10.3389/fncel.2018.00193
- Liu, F., Rijkers, D. T. S., Post, H., and Heck, A. J. R. (2015). Proteome-wide profiling of protein assemblies by cross-linking mass spectrometry. *Nat. Methods* 12, 1179–1184.
- Loh, K. H., Stawski, P. S., Draycott, A. S., Udeshi, N. D., Lehrman, E. K., Wilton, D. K., et al. (2016). Proteomic analysis of unbound cellular compartments: synaptic clefts. *Cell* 166, 1295.e21–1307.e21.
- Long, J. M., and Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell* 179, 312–339. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001
- Lopez-Verrilli, M. A., and Court, F. A. (2012). Transfer of vesicles from schwann cells to axons: a novel mechanism of communication in the peripheral nervous system. *Front. Physiol.* 3:205. doi: 10.3389/fphys.2012.00205
- Lubeck, E., Coskun, A. F., Zhiyentayev, T., Ahmad, M., and Cai, L. (2014). Single-cell in situ RNA profiling by sequential hybridization. *Nat. Methods* 11, 360–361. doi: 10.1038/nmeth.2892
- Lucci, C., Mesquita-Ribeiro, R., Rathbone, A., and Dajas-Bailador, F. (2020). Spatiotemporal regulation of GSK3 $\beta$  levels by miRNA-26a controls axon development in cortical neurons. *Development* 147:dev180232. doi: 10.1242/dev.180232
- Luecken, M. D., and Theis, F. J. (2019). Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 15, e8746. doi: 10.15252/msb.20188746
- Luquet, E., Biesemann, C., Munier, A., and 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
- Maday, S., Twelvetrees, A. E., Moughamian, A. J., and Holzbaur, E. L. F. (2014). Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron* 84, 292–309. doi: 10.1016/j.neuron.2014.10.019
- Marquis, J. K., and Webb, G. D. (1974). Studies of axon permeability utilizing axoplasm extrusion techniques with single isolated axons from the circumesophageal connectives of *Homarus americanus*. *J. Neurochem.* 23, 1085–1086. doi: 10.1111/j.1471-4159.1974.tb10763.x
- Martínez-Hernández, R., Bernal, S., Also-Rallo, E., Alías, L., Barceló, M., Hereu, M., et al. (2013). Synaptic defects in type I spinal muscular atrophy in human development. *J. Pathol.* 229, 49–61. doi: 10.1002/path.4080
- Mathur, C., Johnson, K. R., Tong, B. A., Miranda, P., Srikanth, D., Basilio, D., et al. (2018). Demonstration of ion channel synthesis by isolated squid giant axon provides functional evidence for localized axonal membrane protein translation. *Sci. Rep.* 8:2207.
- Michaevlevski, I., Medzihradzky, K. F., Lynn, A., Burlingame, A. L., and 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. doi: 10.1074/mcp.900369-mcp200
- Michaevlevski, I., Segal-Ruder, Y., Rozenbaum, M., Medzihradzky, K. F., Shalem, O., Coppola, G., et al. (2010b). Signaling to transcription networks in the neuronal retrograde injury response. *Sci. Signal* 3:ra53. doi: 10.1126/scisignal.2000952
- Michaelis, M. L., Jiang, L., and Michaelis, E. K. (2017). Isolation of synaptosomes, synaptic plasma membranes, and synaptic junctional complexes. *Methods Mol. Biol.* 1538, 107–119. doi: 10.1007/978-1-4939-6688-2\_9
- Miedema, A., Wijering, M. H. C., Eggen, B. J. L., and Kooistra, S. M. (2020). High-resolution transcriptomic and proteomic profiling of heterogeneity of brain-derived microglia in multiple sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 13:583811. doi: 10.3389/fnmol.2020.583811
- Minis, A., Dahary, D., Manor, O., Leshkowitz, D., Pilpel, Y., and 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

- Moffitt, J. R., Bambah-Mukku, D., Eichhorn, S. W., Vaughn, E., Shekhar, K., Perez, J. D., et al. (2018). Molecular, spatial, and functional single-cell profiling of the hypothalamic preoptic region. *Science* 362:eau5324. doi: 10.1126/science.aau5324
- Moloney, E. B., de Winter, F., and Verhaagen, J. (2014). ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Front. Neurosci.* 8:252. doi: 10.3389/fnins.2014.00252
- Morciano, M., Beckhaus, T., Karas, M., Zimmermann, H., and Volkmandt, W. (2009). The proteome of the presynaptic active zone: from docked synaptic vesicles to adhesion molecules and maxi-channels. *J. Neurochem.* 108, 662–675. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05824.x
- Morciano, M., Burré, J., Corvey, C., Karas, M., Zimmermann, H., and Volkmandt, W. (2005). Immunolocalization of two synaptic vesicle pools from synaptosomes: a proteomics analysis. *J. Neurochem.* 95, 1732–1745. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03506.x
- Morris, J. R., and Lasek, R. J. (1984). Monomer-polymer equilibria in the axon: direct measurement of tubulin and actin as polymer and monomer in axoplasm. *J. Cell Biol.* 98, 2064–2076. doi: 10.1083/jcb.98.6.2064
- Mu, Q., Chen, Y., and Wang, J. (2019). Deciphering brain complexity using single-cell sequencing. *Genomics Proteomics Bioinform.* 17, 344–366. doi: 10.1016/j.gpb.2018.07.007
- Murray, L. M., Comley, L. H., Thomson, D., Parkinson, N., Talbot, K., and Gillingwater, T. H. (2008). Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 17, 949–962. doi: 10.1093/hmg/ddm367
- Nagy, A. H., Paless, G., Ali, A. H., and Tóth, G. (1984). A rapid method for separation of thylakoid membranes by density gradient centrifugation in percoll. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 179, 529–532. doi: 10.1016/s0015-3796(84)80093-1
- Natera-Naranjo, O., Aschrafi, A., Gioio, A. E., and Kaplan, B. B. (2010). Identification and quantitative analyses of microRNAs located in the distal axons of sympathetic neurons. *RNA* 16, 1516–1529. doi: 10.1261/rna.1833310
- Nijssen, J., Aguilá, J., Hoogstraaten, R., Kee, N., and Hedlund, E. (2018). Axon-Seq decodes the motor axon transcriptome and its modulation in response to ALS. *Stem Cell Rep.* 11, 1565–1578. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.11.005
- Noya, S. B., Colameo, D., Brüning, F., Spinner, A., Mirscof, D., Opitz, L., et al. (2019). The forebrain synaptic transcriptome is organized by clocks but its proteome is driven by sleep. *Science* 366:eav2642. doi: 10.1126/science.aav2642
- Obara, I., Géranton, S. M., and Hunt, S. P. (2012). Axonal protein synthesis: a potential target for pain relief? *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 42–48. doi: 10.1016/j.coph.2011.10.005
- Ostrov, L. E., Santini, E., Sears, R., Deane, Z., Kanadia, R. N., LeDoux, J. E., et al. (2019). Axon TRAP reveals learning-associated alterations in cortical axonal mRNAs in the lateral amygdala. *eLife* 8:e51607. doi: 10.7554/eLife.51607
- Persson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R., and Fainzilber, M. (2005). Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 45, 715–726. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.023
- Persson, E., Medzihradsky, K. F., Darula, Z., Munno, D. W., Syed, N. I., Burlingame, A. L., et al. (2004). Differential proteomics reveals multiple components in retrogradely transported axoplasm after nerve injury. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 510–520. doi: 10.1074/mcp.m400004-mcp200
- Phay, M., Kim, H. H., and Yoo, S. (2015). Dynamic change and target prediction of axon-specific micromas in regenerating sciatic nerve. *PLoS One* 10:e0137461. doi: 10.1371/journal.pone.0137461
- Pocklington, A. J., Armstrong, J. D., and Grant, S. G. N. (2006). Organization of brain complexity–synapse proteome form and function. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* 5, 66–73. doi: 10.1093/bfpp/ell013
- Poon, M. M., Choi, S.-H., Jamieson, C. A. M., Geschwind, D. H., and Martin, K. C. (2006). Identification of process-localized mRNAs from cultured rodent hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 26, 13390–13399. doi: 10.1523/jneurosci.3432-06.2006
- Poulopoulos, A., Murphy, A. J., Ozkan, A., Davis, P., Hatch, J., Kirchner, R., et al. (2019). Subcellular transcriptomes and proteomes of developing axon projections in the cerebral cortex. *Nature* 565, 356–360. doi: 10.1038/s41586-018-0847-y
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., White, L., et al. (2018). *Neuroscience*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Rangaraju, V., Tom Dieck, S., and Schuman, E. M. (2017). Local translation in neuronal compartments: how local is local? *EMBO Rep.* 18, 693–711. doi: 10.15252/embr.201744045
- Raper, J., and Mason, C. (2010). Cellular strategies of axonal pathfinding. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001933. doi: 10.1101/cshperspect.a001933
- Reig-Viader, R., Sindreu, C., and Bayés, À. (2018). Synaptic proteomics as a means to identify the molecular basis of mental illness: are we getting there? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 84, 353–361. doi: 10.1016/j.pnpb.2017.09.011
- Rishal, I., Michalevski, I., Rozenbaum, M., Shinder, V., Medzihradsky, K. F., Burlingame, A. L., et al. (2010a). Axoplasm isolation from peripheral nerve. *Dev. Neurobiol.* 2, 126–133. doi: 10.1002/dneu.20755
- Rishal, I., Rozenbaum, M., and Fainzilber, M. (2010b). Axoplasm isolation from rat sciatic nerve. *J. Vis. Exp.* 2007. doi: 10.3791/2087
- Rosen, D. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364, 362–362. doi: 10.1038/364362c0
- Rotem, N., Magen, I., Ionescu, A., Gershoni-Emek, N., Altman, T., Costa, C. J., 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., Zhang, B., Lee, V. M.-Y., and Trojanowski, J. Q. (2005). Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 109, 5–13. doi: 10.1007/s00401-004-0952-x
- Saal, L., Briese, M., Kneitz, S., Glinka, M., and 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
- Salvadores, N., Sanhueza, M., Manque, P., and Court, F. A. (2017). Axonal degeneration during aging and its functional role in neurodegenerative disorders. *Front. Neurosci.* 11:451. doi: 10.3389/fnins.2017.00451
- Sasaki, Y. (2020). Local translation in growth cones and presynapses, two axonal compartments for local neuronal functions. *Biomolecules* 10:668. doi: 10.3390/biom10050668
- Sasaki, Y., Gross, C., Xing, L., Goshima, Y., and Bassell, G. J. (2014). Identification of axon-enriched microRNAs localized to growth cones of cortical neurons. *Dev. Neurobiol.* 74, 397–406. doi: 10.1002/dneu.22113
- Scaduto, P., Sequeira, A., Vawter, M. P., Bunney, W., and Limon, A. (2020). Preservation of global synaptic excitatory to inhibitory ratio during long postmortem intervals. *Sci. Rep.* 10:8626.
- Shah, S., Lubeck, E., Zhou, W., and Cai, L. (2016). In situ transcription profiling of single cells reveals spatial organization of cells in the mouse hippocampus. *Neuron* 92, 342–357. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.001
- Sheller, R. A., Tytell, M., Smyers, M., and Bittner, G. D. (1995). Glia-to-axon communication: enrichment of glial proteins transferred to the squid giant axon. *J. Neurosci. Res.* 41, 324–334. doi: 10.1002/jnr.490410305
- Sheng, M., Sabatini, B. L., and Südhof, T. C. (2012). Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a005777. doi: 10.1101/cshperspect.a005777
- Shigeoka, T., Jung, H., Jung, J., Turner-Bridger, B., Ohk, J., Lin, J. Q., et al. (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, H. H.-W., Lin, J. Q., Cagnetta, R., Dwivedy, A., et al. (2019). On-site ribosome remodeling by locally synthesized ribosomal proteins in axons. *Cell Rep.* 29, 360510.e–3619.e10.
- Simbriger, K., Amorim, I. S., Chalkiadaki, K., Lach, G., Jafarnejad, S. M., Khoutorsky, A., et al. (2020). Monitoring translation in synaptic fractions using a ribosome profiling strategy. *J. Neurosci. Methods* 329:108456. doi: 10.1016/j.jneumeth.2019.108456
- Smalheiser, N. R. (2014). The RNA-centred view of the synapse: non-coding RNAs and synaptic plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369, 20130504. doi: 10.1098/rstb.2013.0504
- Sotelo, J. R., Canciani, L., Kun, A., Sotelo-Silveira, J. R., Calliari, A., Cal, K., et al. (2014). Glia to axon RNA transfer. *Dev. Neurobiol.* 74, 292–302. doi: 10.1002/dneu.22125

- Sotelo, J. R., Canclini, L., Kun, A., Sotelo-Silveira, J. R., Xu, L., Wallrabe, H., et al. (2013). Myosin-Va-dependent cell-to-cell transfer of RNA from Schwann Cells to axons. *PLoS One* 8:e61905. doi: 10.1371/journal.pone.0061905
- Sotelo-Silveira, J. R., and Holt, C. E. (2014). Introduction to the special issue on local protein synthesis in axons. *Dev. Neurobiol.* 74, 207–209. doi: 10.1002/dneu.22163
- Sotelo-Silveira, J., Crispino, M., Puppo, A., Sotelo, J. R., and Koenig, E. (2007). 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, 545–557. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04999.x
- Stahl, P. L., Salmén, F., Vickovic, S., Lundmark, A., Navarro, J. F., Magnusson, J., et al. (2016). Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* 353, 78–82. doi: 10.1126/science.aaf2403
- Steward, O. (1983). Alterations in polyribosomes associated with dendritic spines during the reinnervation of the dentate gyrus of the adult rat. *J. Neurosci.* 3, 177–188. doi: 10.1523/jneurosci.03-01-00177.1983
- Steward, O., and Banker, G. A. (1992). Getting the message from the gene to the synapse: sorting and intracellular transport of RNA in neurons. *Trends Neurosci.* 15, 180–186. doi: 10.1016/0166-2236(92)90170-d
- Steward, O., and Falk, P. M. (1986). Protein-synthetic machinery at postsynaptic sites during synaptogenesis: a quantitative study of the association between polyribosomes and developing synapses. *J. Neurosci.* 6, 412–423. doi: 10.1523/jneurosci.06-02-00412.1986
- Steward, O., and Levy, W. B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 2, 284–291. doi: 10.1523/jneurosci.02-03-00284.1982
- Steward, O., and Schuman, E. M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 299–325. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.299
- Suzuki, N., Akiyama, T., Warita, H., and Aoki, M. (2020). Omics approach to axonal dysfunction of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Front. Neurosci.* 14:194. doi: 10.3389/fnins.2020.00194
- Swanger, S. A., and Bassell, G. J. (2013). Dendritic protein synthesis in the normal and diseased brain. *Neuroscience* 232, 106–127. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.003
- Tagliaferro, P., and Burke, R. E. (2016). Retrograde axonal degeneration in Parkinson disease. *J. Parkinsons Dis.* 6, 1–15. doi: 10.3233/jpd-150769
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., et al. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127, 831–846.
- Taliaferro, J. M., Matthew Taliaferro, J., Vidaki, M., Oliveira, R., Olson, S., Zhan, L., et al. (2016). Distal alternative last exons localize mRNAs to neural projections. *Mol. Cell* 61, 821–833. doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.020
- Taoufiq, Z., Ninov, M., Villar-Briones, A., Wang, H.-Y., Sasaki, T., Roy, M. C., et al. (2020). Hidden proteome of synaptic vesicles in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 33586–33596. doi: 10.1073/pnas.2011870117
- Tarabal, O., Caraballo-Miralles, V., Cardona-Rossinyol, A., Correa, F. J., Olmos, G., Lladó, J., et al. (2014). Mechanisms involved in spinal cord central synapse loss in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 519–535. doi: 10.1097/nen.0000000000000074
- Taylor, A. M., Berchtold, N. C., Perreau, V. M., Tu, C. H., Li Jeon, N., and Cotman, C. W. (2009). Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. *J. Neurosci.* 29, 4697–4707. doi: 10.1523/jneurosci.6130-08.2009
- Taylor, A. M., Blurton-Jones, M., Rhee, S. W., Cribbs, D. H., Cotman, C. W., and Jeon, N. L. (2005). A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods* 2, 599–605. doi: 10.1038/nmeth777
- Terenzio, M., Koley, S., Samra, N., Rishal, I., Zhao, Q., Sahoo, P. K., et al. (2018). Locally translated mTOR controls axonal local translation in nerve injury. *Science* 359, 1416–1421. doi: 10.1126/science.aan1053
- Terenzio, M., Schiavo, G., and Fainzilber, M. (2017). Compartmentalized signaling in neurons: from cell biology to neuroscience. *Neuron* 96, 667–679. doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.015
- Thelen, M. P., and Kye, M. J. (2019). The role of RNA binding proteins for local mRNA translation: implications in neurological disorders. *Front. Mol. Biosci.* 6:161. doi: 10.3389/fmolb.2019.00161
- Tobias, G. S., and Koenig, E. (1975). Axonal protein synthesizing activity during the early outgrowth period following neurotomy. *Exp. Neurol.* 49, 221–234. doi: 10.1016/0014-4886(75)90206-x
- Torres-Benito, L., Neher, M. F., Cano, R., Ruiz, R., and Tabares, L. (2011). SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. *PLoS One* 6:e26164. doi: 10.1371/journal.pone.0026164
- Tóth, E. N., Lohith, A., Mondal, M., Guo, J., Fukamizu, A., and 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
- Turner-Bridger, B., Caterino, C., and Cioni, J.-M. (2020). Molecular mechanisms behind mRNA localization in axons. *Open Biol.* 10, 200177. doi: 10.1098/rsob.200177
- Tushev, G., Glock, C., Heumüller, M., Biever, A., Jovanovic, M., and Schuman, E. M. (2018). Alternative 3' UTRs modify the localization, regulatory potential, stability, and plasticity of mRNAs in neuronal compartments. *Neuron* 98, 495.e6–511.e6.
- Twiss, J. L., Kalinski, A. L., Sachdeva, R., and Houle, J. D. (2016). Intra-axonal protein synthesis - a new target for neural repair? *Neural Regen. Res.* 11, 1365–1367. doi: 10.4103/1673-5374.191193
- Twiss, J. L., Smith, D. S., Chang, B., and Shooter, E. M. (2000). Translational control of ribosomal protein L4 mRNA is required for rapid neurite regeneration. *Neurobiol. Dis.* 7, 416–428. doi: 10.1006/mbdi.2000.0293
- Uezu, A., Kanak, D. J., Bradshaw, T. W. A., Soderblom, E. J., Catavero, C. M., Burette, A. C., et al. (2016). Identification of an elaborate complex mediating postsynaptic inhibition. *Science* 353, 1123–1129. doi: 10.1126/science.aag0821
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., et al. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323, 1208–1211.
- Verma, P., Chierzi, S., Codd, A. M., Campbell, D. S., Meyer, R. L., Holt, C. E., et al. (2005). Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J. Neurosci.* 25, 331–342. doi: 10.1523/jneurosci.3073-04.2005
- Villasana, L. E., Klann, E., and Tejada-Simon, M. V. (2006). Rapid isolation of synaptoneuroosomes and postsynaptic densities from adult mouse hippocampus. *J. Neurosci. Methods* 158, 30–36. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.05.008
- Walker, C. A., Randolph, L. K., Matute, C., Alberdi, E., Baleriola, J., and Hengst, U. (2018). A $\beta$  triggers the generation of a retrograde signaling complex from sentinel mRNAs in axons. *EMBO Rep.* 19:e45435. doi: 10.15252/embr.201745435
- Wang, G., Moffitt, J. R., and Zhuang, X. (2018). Multiplexed imaging of high-density libraries of RNAs with MERFISH and expansion microscopy. *Sci. Rep.* 8:4847.
- Wang, J., Gu, B. J., Masters, C. L., and Wang, Y.-J. (2017). A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid- $\beta$  metabolism beyond the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 612–623. doi: 10.1038/nrn.2017.111
- Wang, Y.-Z., and Savas, J. N. (2018). Uncovering discrete synaptic proteomes to understand neurological disorders. *Proteomes* 6:30. doi: 10.3390/proteomes6030030
- Waylen, L. N., Nim, H. T., Martelotto, L. G., and Ramalison, M. (2020). From whole-mount to single-cell spatial assessment of gene expression in 3D. *Commun. Biol.* 3:602.
- Weiler, I. J. (2009). "Synaptosomes," in *Encyclopedia of Neuroscience*, ed. L. R. Squire (Cambridge, MA: Academic Press Elsevier), 815–818.
- Weingarten, J., Weingarten, M., Wegner, M., and Volkandt, W. (2017). APP—a novel player within the presynaptic active zone proteome. *Front. Mol. Neurosci.* 10:43. doi: 10.3389/fnmol.2017.00043
- Westmark, P. R., Westmark, C. J., Jeevananthan, A., and Malter, J. S. (2011). Preparation of synaptoneuroosomes from mouse cortex using a discontinuous percoll-sucrose density gradient. *J. Vis. Exp.* 55:3196. doi: 10.3791/3196
- Whittaker, V. P. (1993). Thirty years of synaptosome research. *J. Neurocytol.* 22, 735–742. doi: 10.1007/bf01181319
- Whittaker, V. P., Michaelson, I. A., and Kirkland, R. J. (1964). The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochem. J.* 90, 293–303. doi: 10.1042/bj0900293

- Wiegert, J. S., Simon Wiegert, J., Peter Bengtson, C., and Bading, H. (2007). Diffusion and not active transport underlies and limits ERK1/2 synapse-to-nucleus signaling in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 282, 29621–29633. doi: 10.1074/jbc.m701448200
- Williams, C., Mehrian Shai, R., Wu, Y., Hsu, Y.-H., Sitzer, T., Spann, B., et al. (2009). Transcriptome analysis of synaptoneuroosomes identifies neuroplasticity genes overexpressed in incipient Alzheimer's disease. *PLoS One* 4:e4936. doi: 10.1371/journal.pone.0004936
- Willis, D. E., and Twiss, J. L. (2011). Profiling axonal mRNA transport. *Methods Mol. Biol.* 714, 335–352. doi: 10.1007/978-1-61779-005-8\_21
- Willis, D. E., van Niekerk, E. A., Sasaki, Y., Mesngon, M., Merianda, T. T., Williams, G. G., et al. (2007). Extracellular stimuli specifically regulate localized levels of individual neuronal mRNAs. *J. Cell Biol.* 178, 965–980. doi: 10.1083/jcb.200703209
- Willis, D., Li, K. W., Zheng, J.-Q., Chang, J. H., Smit, A. B., Kelly, T., et al. (2005). Differential transport and local translation of cytoskeletal, injury-response, and neurodegeneration protein mRNAs in axons. *J. Neurosci.* 25, 778–791. doi: 10.1523/jneurosci.4235-04.2005
- Wirths, O. (2017). Preparation of crude synaptosomal fractions from mouse brains and spinal cords. *Bio-Protocol* 7:e2423. doi: 10.21769/bioprotoc.2423
- Wolf, M. E., and Kapatos, G. (1989). Flow cytometric analysis of rat striatal nerve terminals. *J. Neurosci.* 9, 94–105. doi: 10.1523/jneurosci.09-01-00094.1989
- Wong, H. H.-W., Lin, J. Q., Ströhl, F., Roque, C. G., Cioni, J.-M., Cagnetta, R., et al. (2017). RNA docking and local translation regulate site-specific axon remodeling in vivo. *Neuron* 95, 852.e8–868.e8.
- Xia, C., Fan, J., Emanuel, G., Hao, J., and Zhuang, X. (2019). Spatial transcriptome profiling by MERFISH reveals subcellular RNA compartmentalization and cell cycle-dependent gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 19490–19499. doi: 10.1073/pnas.1912459116
- Xu, J., Chen, Q., Zen, K., Zhang, C., and Zhang, Q. (2013). Synaptosomes secrete and uptake functionally active microRNAs via exocytosis and endocytosis pathways. *J. Neurochem.* 124, 15–25. doi: 10.1111/jnc.12057
- Xu, Y., Song, X., Wang, D., Wang, Y., Li, P., and Li, J. (2021). Proteomic insights into synaptic signaling in the brain: the past, present and future. *Mol. Brain* 14:37.
- Yang, H., Wittnam, J. L., Zubarev, R. A., and Bayer, T. A. (2013). Shotgun brain proteomics reveals early molecular signature in presymptomatic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 37, 297–308. doi: 10.3233/jad-130476
- Yokoi, N., Fukata, M., and Fukata, Y. (2012). Synaptic plasticity regulated by protein-protein interactions and posttranslational modifications. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 297, 1–43. doi: 10.1016/b978-0-12-394308-8.00001-7
- Yudin, D., Hanz, S., Yoo, S., Iavnilovitch, E., Willis, D., Gradus, T., et al. (2008). Localized regulation of axonal RanGTPase controls retrograde injury signaling in peripheral nerve. *Neuron* 59, 241–252. doi: 10.1016/j.neuron.2008.05.029
- Zappulo, A., van den Bruck, D., Ciolli Mattioli, C., Franke, V., Imami, K., McShane, E., et al. (2017). RNA localization is a key determinant of neurite-enriched proteome. *Nat. Commun.* 8:583.
- Zarei, S., Carr, K., Reiley, L., Diaz, K., Guerra, O., Altamirano, P. F., et al. (2015). A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg. Neurol. Int.* 6:171. doi: 10.4103/2152-7806.169561
- Zetterberg, H., and Bendlin, B. B. (2021). Biomarkers for Alzheimer's disease—preparing for a new era of disease-modifying therapies. *Mol. Psychiatry* 26, 296–308. doi: 10.1038/s41380-020-0721-9
- Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y.-W., and Xu, H. (2012). Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 120(Suppl. 1), 9–21. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07519.x
- Zhang, Z., Pinto, A. M., Wan, L., Wang, W., Berg, M. G., Oliva, L., et al. (2013). Dysregulation of synaptogenesis genes antecedes motor neuron pathology in spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 19348–19353. doi: 10.1073/pnas.1319280110
- Zheng, J. Q., Kelly, T. K., Chang, B., Ryazantsev, S., Rajasekaran, A. K., Martin, K. C., et al. (2001). A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. *J. Neurosci.* 21, 9291–9303. doi: 10.1523/jneurosci.21-23-09291.2001
- Zhong, J., Zhang, T., and Bloch, L. M. (2006). Dendritic mRNAs encode diversified functionalities in hippocampal pyramidal neurons. *BMC Neurosci.* 7:17. doi: 10.1186/1471-2202-7-17
- Zivraj, K. H., Tung, Y. C. L., Piper, M., Gumy, L., Fawcett, J. W., Yeo, G. S. H., et al. (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
- Zoghbi, H. Y., and Bear, M. F. (2012). Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a009886. doi: 10.1101/cshperspect.a009886

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Di Paolo, Garat, Eastman, Farias, Dajas-Bailador, Smircich and Sotelo-Silveira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **9.2) Anexo 2.**

*Aquí se presenta es un breve reporte producto de una selección de los mejores trabajos presentados en el Congreso del Comité Interamericano de Sociedades de Microscopía Electrónica (CIASEM XV) desarrollado en la Universidad Católica de Buenos Aires en octubre del 2019. En el mismo se describe la puesta a punto del protocolo de Click iT para evidenciar la neo-síntesis de proteínas en axones de nervios periféricos en modelos ex vivo. El reporte fue escrito por mi y corregido por el PhD. José Sotelo Silveira.*

## ***In vivo* Local Protein Synthesis in Peripheral Axons using Click iT Chemistry and Confocal Fluorescence Microscopy.**

Andrés Di Paolo<sup>1</sup>, José Roberto Sotelo Sosa<sup>2\*</sup> and José Roberto Sotelo Silveira<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos & Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup> Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup> Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable; Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay

\* Corresponding author: [sotelojos@gmail.com](mailto:sotelojos@gmail.com)

Neurons are highly polarized cells with long projections including dendrites and axons. Those are complex cellular compartments where the local protein synthesis (LPS) involving processes like plasticity or regenerative processes [1]–[3]. In peripheral axons most of the LPS studies are performed using *in vitro* models that likely are far away from *in vivo* biology of mature axons. An aspect not yet fully characterized is the fine localization where LPS occurs at mature axons *in vivo*. Only a few studies were made at axons *in vivo* using radiolabeling techniques, but these methods have multiple risks for the users and the environment and are difficult to perform [4]–[6]–[7].

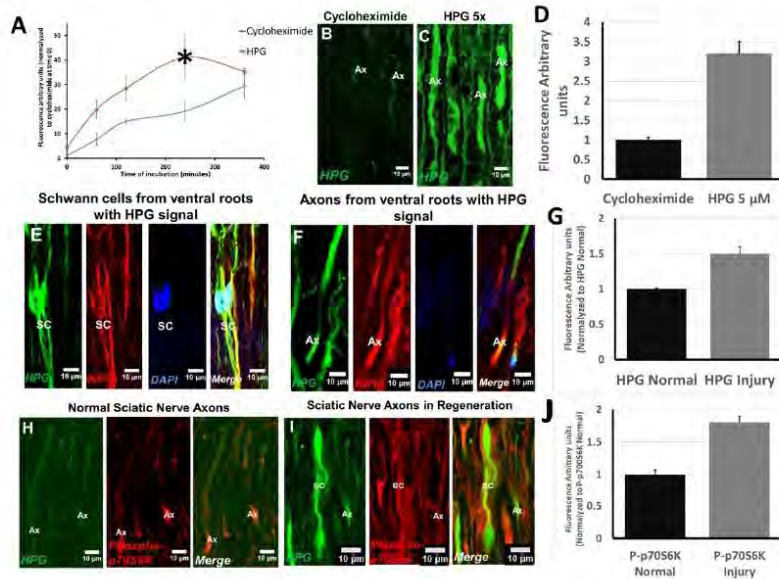
In recent years new technologies were developed for study protein synthesis by fluorescence microscopy including BONCAT protocols [8]. The principle of the technique is the use of methionine orthogonal amino acids in the cell media that are incorporated in newly synthesized peptides. After fixation steps, those peptides are showed by Click iT Chemistry by the link of a fluorescent molecule to the reactive moiety of the modified amino acid. In the literature there are many studies that use this technology *in vitro* [9], [10] but not *in vivo*. The present work study the sites of LPS in mature axons of peripheral nerves segments incubated *ex vivo* [13] with the HPG orthogonal amino acid, in combination with Click iT Chemistry and confocal fluorescence microscopy. Our study reveals that optimal fluorescent signal is obtained after 4 hours of incubation with 5 μM HPG in DMEM, with significant differences against a negative control using the protein synthesis inhibitor cycloheximide (Figure 1A, 1B, 1C and 1D). In resting conditions signal can be observed inside Schwann cell cytoplasm (Figure 1E) but also in axoplasm regions (Figure 1F) revealing LPS in mature myelinated axons. An increase on protein synthesis eighteen hours after lesion has been reported [7], [11], [12], [13], here we detected an increase of 1.5 fold in the fluorescent LPS signal compared to axons without an injury (Figure 1G, 1H and 1I). The later increase is also consistent with an 1.8 fold increase in the immunofluorescence signal of phospho-p70S6K (Figure 1J), a protein that indicates mTOR activation leading to axonal local translation regulation [14]. Finally, we tested if LPS can be observed in motor ventral root axonal wholemounts depleted of myelin obtained by microdissection [15–16]. We detected HPG positive puncta colocalizing with YOYO-1, a highly sensitive DNA/RNA probe (Figure 2) suggesting that those sites could be site of synthesis at axonal domains.

Taken all together these results support the use of HPG/Click IT Chemistry *in vivo* as a useful tool to study local protein synthesis in mature myelinated axons.

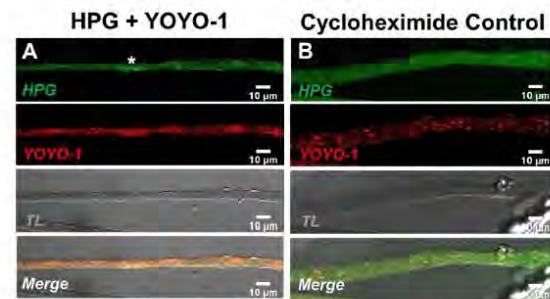
### **References**

- [1] L. F. Gumy, C. L. Tan, and J. W. Fawcett, *Exp. neurology*, **223**, (2010), pp. 28–37.
- [2] J. Scheib and A. Höke, *Nature reviews. Neurology*, **9**, (2013) pp. 668–76.
- [3] E. Kim and H. Jung, *BMB Reports*, **48**, (2015), pp. 139–146.
- [4] G. S. Tobias and E. Koenig, *Exp. Neurology*, **49**, (1975), pp. 221–234.
- [5] J. Q. Zheng *et al.*, *The Journal of neuroscience*, **21** (2001), pp. 9291–303
- [6] J. Alvarez and C. R. Benich, *Exp. neurology*, **82**, (1983), pp. 25–42.

- [7] J.R. Sotelo-Silveira, *The Journal of Neuroscience*, **62**, (2000), pp. 65–74.  
 [8] D. C. Dieterich, et al, *Nat. Protocols*, **2**, (2007), pp. 532–540.  
 [9] A. Biever, P. G. Donlin, E. Schuman, *Curr. Op. in Neurobiology*, **57**, (2019), pp. 141–148.  
 [10] R. Cagnetta et al, *Neuron*, **99**, (2018), pp. 29–46.  
 [11] P. Verma et al., *The Journal of neuroscience*, **25**, (2005), pp. 331–42.  
 [12] F. Zhou et al *Philos. transac. of the Royal Society of London*, **361**, (2006), pp. 1575–92.  
 [13] J. R. Sotelo et al., *PloS one*, **8**, (2013), pp. 61905.  
 [14] M. Terenzio et al, *Science (New York, N.Y.)*, **359**, (2018), pp. 1416–1421.  
 [15] E. Koenig and R. Martin, *The Journal of neuroscience*, **16**, (1996), pp. 1400–11.  
 [16] E. Koenig et al, *The Journal of neuroscience*, **20**, (2000), pp. 390–400.



**Figure 1. Distribution of newly synthesized protein signal with HPG labelling in peripheral nerves.** (A) HPG incubation time curve. Asterisk shows the 4-hour (240 min) selected time. (B) Cycloheximide control, (C) HPG 5  $\mu$ M selected work concentration (D). (E) Schwann cells (SC) & (F) Axons (Ax) with HPG signal. (G–J) Sciatic nerve axons at normal condition and regenerative state with an increase in HPG and phospho-p70S6K signals. Graphics G and I show the quantification in axons for HPG and P-p70S6K.



**Figure 2. Local protein synthesis signal inside the axoplasm extracted from ventral root nerves.** (A) HPG signal co-localized with YOYO-1 signal suggesting protein synthesis domains inside the axon. (B) Control condition with cycloheximide. Transmitted Light (TL) shows the axonal morphology.

Downloaded from <https://www.cambridge.org/core>. IP address: 189.133.233.6, on 16 May 2020 at 13:55:50, subject to the Cambridge Core terms of use, available at <https://www.cambridge.org/core/terms>. <https://doi.org/10.1017/S144678020000628>



### **9.3) Anexo 3. Materiales y Métodos suplementarios del Artículo I: “PDCD4 regulates axonal growth by translational repression of neurite growth-related genes and is modulated during nerve injury responses”.**

#### **Animals and surgical procedures.**

Sprague Dawley male adult rats (6-9 months old) were used for *ex vivo* experiments. The maintenance was made in accordance with international agreements at IIBCE bioterium in Montevideo, Uruguay. Animals were anesthetized with ketamine and xylazine mix (100 mg/kg, 10 mg/kg) by intraperitoneal injection. Afterwards the animals were intracardially perfused using paraformaldehyde.

- Sciatic nerve transection.

Adult Sprague-Dawley rats were anesthetized with 50 mg/kg pentobarbital. An incision was made at mid-thigh and the sciatic nerve was transected, which was then closed with cyanoacrylate glue. After 18 h recovery, rats were euthanized by decapitation and a 2-cm sciatic nerve segment proximal to the transection was removed. Equivalent contralateral uninjured segments were used as controls. Afterwards we labelled the proximal region using a strand and quickly fixed with PFA 4% for 1 hour at RT. Immunohistochemistry protocols were carried out as described for *in vivo* tissues. All the experimental procedures were made according to the Uruguayan ethical national committee (CNEA) with approved project code “005/01/2014”.

#### **Cell Cultures.**

Rats (Sprague-Dawley) and mice (C57/BL6) used for primary neuron cultures were housed at the Animal Unit in the School of Life Sciences (University of Nottingham). They were bred and sacrificed according to the UK Animal (Scientific Procedures) Act 1986.

- Primary cortical neurons culture.

Primary cortical neuron cultures were obtained from C57/BL6 E16 mice brains as previously described (Lucci *et al.* 2020). Brain cortices were dissected, and the meninges separated under a dissection microscope. The tissue was further incubated in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>-free; Gibco) with 1 mg/ml trypsin and 5 mg/ml DNase I (Sigma-Aldrich) at 37°C for 30'. Following the addition of 0.05% (v/v) soybean trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich), the tissue was mechanically dissociated in Neurobasal media (Invitrogen) supplemented with 1X GlutaMax and 2% B-27 (Gibco). Dissociated neurons were resuspended in supplemented Neurobasal media (10x10<sup>6</sup> cells/mL).

- Primary *DRG* neurons culture.

Primary *DRGs* cultures were obtained from E18 rat embryos. Briefly, approximately 200 *DRGs* ganglions were extracted from 11-15 embryos per experiment in L15 cold media, trypsinized in Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> PBS 0.025% trypsin for 10 minutes at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and incubated with 0.1% collagenase type I (filtered 0.2 μm) for 20 min, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Pellet is resuspended and dissociated in DMEM complete media (2% B27, 2 mM glutamate, 1% PE, 50 ng/mL NGF, 50 ng/μL GDNF, 4 μM APH). Cells were centrifuged at 1000 g for 5 minutes, and the pellet resuspended in complete media before seeding into compartmentalized microfluidic chambers (Xona Microfluidics, Xona SND 150) pre-coated with laminin 20 μg/mL for 1 hour, 37°C. Then 10 μL of dissociated *DRGs* were seeded into the designated channel (approximately 30 *DRGs* in each).

- PC12 cell line culture and lentiviral transfection.

PC12 cells from ATCC were grown in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% horse serum, 5% of fetal bovine serum and antibiotics (penicillin and streptomycin), at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Plastic surfaces were coated with 8 μg/cm<sup>2</sup> collagen I from rat tail. Neuronal differentiation was achieved by removing growth factors and antibiotics and exposing cells to 100 ng/mL of NGF 2.5S for at least 72 h. To achieve PDCD4 silencing, commercial lentiviral viral particles from Dharmacon GE, with an inducible shRNA against PDCD4, were used. After transfection, cells were grown in complete medium for 24 hrs and selected with 5 μg/mL of

puromycin for 3-5 days. Cells were then cultured in complete medium to obtain stable cell lines able to induce silencing of PDCD4 or express a scrambled shRNA control.

- Neuroblastoma (Neuro2a) Cell line culture.

Neuro2a cells were a kind gift from Robert Layfield lab, University of Nottingham, UK. Cells were maintained in DMEM, 10% FCS, 1% PS and seeded on 12-well plates at  $1.5 \times 10^5$  cells/well.

### **siRNA and plasmid transfections.**

In the primary cortical neuron and Neuro2a cell line, transfections were performed 24 hours after neuron seeding (day 2 of cell culture) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as suggested by manufacturer's instructions. 25 nM of siGENOME Mouse Pdc4 SMARTpool 5 nmol (catalog number M-044032-01-0005) and siGENOME Non-Targeting siRNA Control Pool N°1 5 nmol (catalog number D-001206-13-05) both from GE Healthcare Dharmacon-Horyzon Solutions, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermo Scientific), following the manufacturer's instructions. For plasmid transfections the PDCD4-pcDNA 3.1 (zero) was kindly gifted by Yang Hsin-Sheng, with empty plasmid used as a control. Both plasmids were applied at 2  $\mu$ g final concentration and added 24 hours after neuron seeding (day 2 of cell culture). To identify transfected cortical neurons, the siRNA and PDCD4 plasmids were co-transfected with pmax-GFP Green-cat (ThermoScientific) 1  $\mu$ g of final concentration and cells were fixed 72 hours after transfection (day 5 of cell culture). In the specific case of primary DRG neuron cultures, the cell permeable Accell SMARTPOOL Pdc4 siRNA 5 nmol (catalog number E-097927-00-0005) or Accell Non Targeting Pool 5 nmol (catalog number D-001910-10-05) both from Healthcare Dharmacon - Horyzon Solutions were incubated at 1  $\mu$ M final concentration in the cell body side of compartmentalized chambers after DRGs develop neurites. 96 hours later neurons were fixed.

### **Semi-quantitative Real Time PCR.**

PDCD4 quantification in PC12 cells was performed by semi-quantitative real time PCR and  $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen 2001). For this, RNA was isolated using Trizol (Invitrogen,

Cat#15596026) or mirVana isolation kit (ThermoFisher, Cat# AM1560). Genomic DNA was removed by DNase treatment (Invitrogen, Cat#AM2222) and RNA was re-isolated by the same method. cDNA was produced by retrotranscription by SuperScript II (Invitrogen, Cat#18064014) or III (Invitrogen, Cat#18080044) reverse transcriptase and quantified with SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Cat#A25742) in Corbett Rotor-Gene 6000 instrument with the following PCR conditions: 10 minutes at 95°C, 40 cycles of: 15 seconds at 95°C, 15 seconds at 58°C and 45 seconds at 60°C; and 72°C to 90°C melting. In all cases, three independent biological replicates were used to evaluate significant differences by Student's test using RPL29 gene as housekeeping (Zhou *et al.* 2010).

For primary DRGs cultures, E18 rat embryos were cultured at two channel compartmentalized microfluidic chambers as described in the previous section. Axonal RNA was obtained as described previously (Garcez *et al.* 2016). To obtain cDNA, 50 ng of RNA were retrotranscribed by Superscript III reverse transcriptase (ThermoFisher, Cat#18080093) according to manufacturer instructions. The qPCR was performed using PowerUp SYBR Green (Applied Biosystems) in an Applied Biosystems Step One *Plus* thermocycler, using cycling parameters recommended by Applied Biosystems (mRNA). Data was acquired with Applied Biosystems SDS2.3 software. As above, the RPL-29 gene was used as a housekeeping gene (Zhou *et al.* 2010).

Primers sequences were obtained from literature: PDCD4 forward: 5'-TGAGCACGGAGATACGAACGA-3' and PDCD4 reverse: 5'-GCTAAGGACACTGCCAACACG-3' from (Liu *et al.* 2010), RPL29 forward: 5'-CAAGTCCAAGAACCACACCAC-3' and RPL29 reverse: 5'-GCAAAGCGCATGTTTCCTCAG-3' from (Parker *et al.* 2013).

### **Immunohistochemistry and immunocytochemistry.**

- Tissue sections.

For brain, cerebellum and sciatic nerve tissue, rats were intracardially perfused with 3% sodium citrate and then 4% PFA in PBS buffer. Tissue extraction was done after two hours of perfusion, and a final fixation step was performed overnight (ON), 4°C for brain and cerebellum and 1

hour at RT for sciatic nerves. 3x10 minutes washes in PBS and cryo-protection steps with successive incubations in 15 and 30% sucrose ON, 4°C for one and two days respectively were performed. Cryosections of 20 µm were collected on glass slides pre-treated with Poly-L-Lysine 0.1% in mQ water. Permeabilization with 0.5% Triton in the PHEM buffer for 20 minutes at RT, 3x5 washes in PHEM buffer and blocking in 3% BSA, 1% glycine for 30 minutes at RT were developed. Incubation with the primary and secondary antibodies was performed in a blocking buffer with 5% NGS, ON at 4°C with 3x10 minutes washes in buffer PHEM between and after incubation.

- Primary neurons and cell lines.

For cortical, *DRG* neurons, PC12 and Neuro2a cell lines, the media was removed, and cells rinsed with PBS and fixed with 4% PFA with 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 4% sucrose in the PBS buffer for 30 minutes (RT). Cells were permeabilized in 0.2% Triton + 10 mM glycine in PBS for 20 minutes at RT. Incubation with the primary antibody was made in 3% BSA ON at 4°C, while incubation with secondary antibodies was made in the same buffer for 2 hours at RT. Cells were mounted using Vectashield with DAPI or Pro-Long Antifade reagent.

### **List of antibodies and probes.**

Rabbit polyclonal PDCD4 antibody (dilution 1:200) Abcam (ab51495); Mouse monoclonal MAG antibody (dilution 1:1500) Millipore (Cat#MAB1567); Mouse monoclonal antibody Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (1A5) (dilution 1:400) CellSignaling (#9206); Mouse Monoclonal Anti-Acetylated Tubulin antibody (dilution (1:1000) Sigma - Aldrich (Cat#T7451); Alexa Fluor 555 Phalloidin (dilution 1:150) Invitrogen-ThermoFisher (Cat#A34055); Alexa Fluor 647 Phalloidin (dilution 1:150) Invitrogen-ThermoFisher (Cat#A22287); Goat anti-Mouse IgG, (H+L) HRP conjugate antibody Millipore (Cat# AP308P); Swine anti-rabbit IgG HRP antibody Dako (Cat# P0217); Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (dilution 1:1000) ThermoFisher (Cat# A-11001); Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 conjugate (dilution 1:1000) ThermoFisher (Cat# A-21422); Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody Alexa Fluor 633 Conjugated (dilution: 1:1000) ThermoFisher (Cat# A-21052); DAPI (dilution 1:2000) ThermoFisher (Cat#D1306).

### **Puro-PLA protocol.**

A total of 2 independent experiments were made. Ventral roots were extracted from adult rats and incubated in neurobasal media with puromycin at 300  $\mu$ M final concentration for 15 and 30 minutes or without puromycin as a control condition. Then a fixation with 4% PFA for 1 hour was performed and cryosections were made as described above.

The PLA protocol was carried-out according to the manufacturer's instructions of DuoLink, Sigma using the following reagents: Duolink® *In situ* PLA® Probe Anti-Rabbit *PLUS* dilution 1/5 (Cat#DUO92002-30RXN), Duolink® *In situ* PLA® Probe Anti-Mouse *MINUS* dilution 1/5 (Cat#DUO92004-30RXN), Duolink® *In situ* Detection Reagents FarRed (DUO92013-30RXN).

### **Protein extraction and western blot protocol for Neuro2a cell line.**

A total of 3 independent experiments were performed. Cells were scraped 72 h after transfection, lysed with 150  $\mu$ L of RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, with 150 mM sodium chloride, 1.0% Igepal CA-630 (NP-40), 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% sodium dodecyl sulphate), centrifuged for 20 min at 12,000g and supernatants collected and run on a 12% SDS-PAGE gel. Proteins were separated by standard electrophoresis protocol. For blocking step 5% milk in TBST (TBS buffer with Tween-20 0.1%) was used for 1 hour at RT. The primary antibodies were incubated ON, 4°C and a chemiluminescence protocol was performed using HRP secondary antibodies. The enzyme substrate was the Supersignal West femto-maximum sensitivity substrate revealed and was incubated for 1 minute and then washed with a blocking buffer. Western blot bands were detected with a Las 3000 mini from FUJIFILM using the accumulated signal method.

### **Image acquisition.**

Neo-cortex, cerebellum, sciatic nerves and PC12 cells images were taken on the LSM confocal OLYMPUS FV300 using a 60X oil, NA 1.42 objective. The software for controlling the microscope and taking the images was the Fluoview version 5.0c.

For primary cultures, an inverted fluorescent microscope ZEISS axiovert 200M coupled to a CCD camera (Photometrics CoolSnap MYO) was used. For axon length images, a 10X air NA 0.3 or 20X air NA 0.8 were used, while quantification of immunofluorescence used a 63X oil NA 1.3. The micromanager software version 1.4 was employed to acquire the images and control the microscope.

For PLA experiments on ventral roots an LSM confocal ZEISS 800 was used. A 63x oil, NA 1.4 premium objective adapted for AiryScan was used for image acquisition. The stacks were always taken at an ideal  $\mu\text{m}$  number between each z plane. The software for controlling the microscope and taking the images was the ZEN Blue version 2.3.

### **Image quantification and analysis.**

In all image quantification analysis, we kept the same PMT (below 700 V) and/or time exposures of the camera in order to compare control and experimental conditions. We also kept the same PMT (below 700 V) and same laser intensities for each experiment between conditions, with all the images from each experimental group taken on the same day.

- Quantification of fluorescence.

Quantification of expression levels from immunofluorescence signals at different regions of interest (ROIs) was made with *FIJI* (Just ImageJ) software (Schindelin *et al.* 2012). Following the selection of ROIs, the Raw\_Integrated\_Density was calculated and divided by the size of the selected area. For each condition an average of these values was calculated and normalized against its control. The value for the controls was defined as 1. For the selection of ROIs in cortical and *DRG* neurons the acetylated tubulin was used to define subcellular compartments. For quantitative analysis in cortical neurons a total of 292 cell bodies and 129 axons were quantified from three independent experiments (unless as indicated for day 12) In experiments with sciatic nerve ventral roots axoplasms, MAG, phalloidin and light-chain neurofilament 68 KDa were used as counter-stains.

- Quantification of axonal length of cortical neurons.

Images were taken from at least four independent preparations. GFP-positive neurons were assessed with axons defined as a neurite that was longer than 80  $\mu\text{m}$  and at least three times the length of other processes, measured from the cell body to the distal extent of the central region of the growth cone. Selected axon projections were measured using ImageJ, and the data expressed as percentage of the respective controls. For determination of axon versus branch, the axon was defined as the process that remained parallel to the axon segment proximal to the branch point. Branches were defined as processes extending at orthogonal angles to the axon. Total length of axon branches was not included in the measurement. The average length of axons in control groups was  $\pm 341 \mu\text{m}$  (mean  $\pm 14.92$ ). The average for each experimental condition (siRNA PDCD4 or plasmid PDCD4) was normalized against its control. A total number of  $\sim 400$  cortical axons were measured per condition for the PDCD4 overexpression analysis and  $\sim 600$  axons per condition for the PDCD4 silencing analysis. The n number was defined as separate experiments from independent neuronal preparations for all conditions.

- Quantification of axonal length of *DRG* neurons.

A stitched image of the entire axonal channel of the microfluidic chambers stained for axons (acetylated tubulin) was obtained using micromanager software and the stitching plugin of *FIJI* software for each axonal microfluidic compartment. A total of 4 independent experiments with siRNA control chambers and 3 with siRNA of *Pdcd4* were used (in total 9 siRNA Control and 7 siRNA PDCD4 chambers were used). Image analysis for neuron growth was processed using the Neuron\_Growth plugin software developed by Fanti & collaborators at the Universidad Nacional Autónoma de México (<http://www.ifc.unam.mx/ffm/conditions.html>). The same software settings were used for all images and the percentage of the area covered by the axons was quantified. Average values were calculated for the siRNA control chambers and for the siRNA PDCD4 chambers and normalized to the internal control.



- Quantification of neurite length of differentiated PC12 cells.

Images were taken from five independent preparations. For quantifying neurite length of differentiated PC12 cells in the presence and absence of PDCD4, three independent cell cultures were grown for each condition. After 72 h of shRNA induction, cells were exposed to NGF for 72 h to achieve neuron-like differentiation. The free line tool of ImageJ was used to mark neurites in several optic fields for each culture and length was quantified. An average of 80 neurites were quantified per replicate. Neurite length was contrasted in the two conditions comparing 3 vs 3 averages per replicate

- Puro-PLA Pdc4 spots quantifications.

*FIJI* (just ImageJ) software was used to quantify PLA signals. After selection of axoplasm regions (counterstained with phalloidin and/or light-chain-neurofilament) from Z-stack images a z project with *Maximum Intensity Projection* algorithm was used to obtain a single image with all the PLA spots for each stack. Then a *threshold* was defined to detect each spot as black and the rest as white. Then the “*Analyze Particles*” algorithm was used with the size between 0.20-10 in all cases. The “masks display exclude clear” algorithm was used to count and see the mask on each spot and to control if the protocol was adequately working for each image. The experiment without puromycin was used as a control condition and the count of PLA/area was defined as “1”. Following this, the PLA counts for 15 minutes and 30 minutes exposure to puromycin were normalized to the control.

- Western Blot quantification.

Images were obtained with the same exposure settings. *FIJI* (Just ImageJ) gel quantification software was used selecting ROIs equal to the biggest protein band for each image. Each band was quantified and then divided by the one corresponding to actin (control band) for each line. The values corresponding to siRNA PDCD4 were expressed as a percent of the siRNA control.

### ***Ribosome Profiling.***

After 72 h of 100 ng/mL NGF 2.5S and 500 ng/mL doxycycline exposure, to achieve neuronal differentiation and shRNA expression, 80x10<sup>6</sup> cells per condition were used to isolate total RNA and polysomes, in two biological replicates per condition. For this, cells were treated with 100 mg/μL of cycloheximide (CHX) for 1 hour at 37°C in the hood to stop translation before collection of RNA on ice. A Transcriptome sample was separated to use as total RNA control and submitted to RNA extraction using mirVana isolation kit (ThermoFisher, Cat# AM1560) and RNA-Seq protocol. At the same time, a proteome sample was separated and submitted to *Label-Free Quantitative Proteomics* using an Orbitrap Fusion. For translome samples, cells were lysed and post mitochondrial supernatant was loaded in a 12%-33.5% sucrose cushion and ultracentrifugated in SW40Ti rotor at 35,000 RPM for 2:45 hrs at 4°C. Polysomal pellet was resuspended and digested with 200 U of Benzonase for 10 minutes at RT. Digestion was stopped with mirVana Lysis Buffer to continue with RNA isolation. Ribosomal footprints were isolated running a denaturalized 15% PAGE 7M urea, cutting the proper band identified by length (~30nt) and extracting RNA from gel slices. Ribosomal footprints (Translatome sample) are then concentrated by precipitation and quality and quantity checked using 2100 Agilent Bioanalyzer Small RNA Kit.

### **Sequencing and bioinformatic analysis.**

All transcriptome and translome samples were sequenced in BGI Tech Solutions. Transcriptome samples were submitted to RNA-Seq Quantification Library (Normal Library: 2-10 μg) protocol, using poly(A)<sup>+</sup> selection and 20 millions of paired-end (2x100 bp) reads were obtained. Translatome samples were submitted to Small RNA Library (Low-Input Library: 0.2-1 μg) protocol and 40 millions of single-end reads were obtained.

Fastq files obtained were analyzed using servers available in the Genomics Department at IIBCE. Sequences were mapped using bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) versus curated mRNAs described in the mouse genome (available at NCBI ftp site). For translome samples, sequences were first mapped against *Rattus norvegicus* rRNA genes to remove contamination. Reads counts were estimated by featureCounts (Liao *et al.* 2014) and differential gene

expression analysis between transcriptomes or translomes was done using edgeR (Robinson *et al.* 2010). Normalized counts were exported and translational efficiency was calculated and contrasted between conditions (shPDCD4 vs shScrambled) using Xtail R package (Xiao *et al.* 2016). Gene lists analysis were performed using on-line free tools like STRING (Jensen *et al.* 2009) and an in-house software (manuscript in preparation; <https://github.com/sradiouy/ldMiner>).

Protein samples were submitted to *Label-Free Quantitative Proteomics* using an LC-MS/MS Orbitrap Fusion instrument. Protein intensity values (*LFQ/IBAQ*) were averaged and statistical differences were reported using ANOVA.

### **General statistical analysis.**

All data groups shown are expressed as the mean  $\pm$  SEM and the probability distribution of the data set was analyzed before further statistical analysis. Normality tests were made for all the data sets. With normal data, a two tailed t-student test was performed or paired t test for plasmid and siRNA axonal length quantifications. If the data sets don't pass the normality tests, a Mann Whitney test was used. In all cases p values less or equal to 0.05 were considered as significant. Each “n” was defined as an independent experiment from a separate culture preparation. The following general code was used: (\*): p value <0.05; (\*\*): p value <0.01; (\*\*\*): p value <0.001.

### **SI References.**

- Garcez PP, Guillemot F, Dajas-Bailador F. 2016. Study of miRNA Function in the Developing Axons of Mouse Cortical Neurons: Use of Compartmentalized Microfluidic Chambers and In Utero Electroporation. *MicroRNA Technologies* 59–71. [http://dx.doi.org/10.1007/7657\\_2016\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/7657_2016_12).
- Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, Doerks T, Julien P, Roth A, Simonovic M, *et al.* 2009. STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* 37: D412–6.
- Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9: 357–359.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30: 923–930.

- Liu X, Cheng Y, Yang J, Krall TJ, Huo Y, Zhang C. 2010. An essential role of PDCD4 in vascular smooth muscle cell apoptosis and proliferation: implications for vascular disease. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**: C1481–8.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**: 402–408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lucci C, Mesquita-Ribeiro R, Rathbone A, Dajas-Bailador F. 2020. Spatiotemporal regulation of GSK3 $\beta$  levels by miRNA-26a controls axon development in cortical neurons. *Development* **147**. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.180232>.
- Parker SS, Mandell EK, Hapak SM, Maskaykina IY, Kusne Y, Kim J-Y, Moy JK, St John PA, Wilson JM, Gothard KM, *et al.* 2013. Competing molecular interactions of aPKC isoforms regulate neuronal polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 14450–14455.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, *et al.* 2012. *FIJI*: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676–682.
- Xiao Z, Zou Q, Liu Y, Yang X. 2016. Genome-wide assessment of differential translations with *Ribosome Profiling* data. *Nat Commun* **7**: 11194.
- Zhou L, Lim Q-E, Wan G, Too H-P. 2010. Normalization with genes encoding ribosomal proteins but not GAPDH provides an accurate quantification of gene expressions in neuronal differentiation of PC12 cells. *BMC Genomics* **11**: 75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-75>.