



**Universidad
de Concepción**



**FACULTAD DE
CIENCIAS**
UNIVERSIDAD DE CHILE

“Estudio de la participación de Rab36 durante la polarización neuronal hipocampal”

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Oscar Antonio Espinoza Goecke

Fecha: 21 noviembre 2023



Prof. Guía

Dr. Christian González-Billault

Prof. Co-Guía

Dr. Ernesto Muñoz Palma

.

Prof. Evaluadores

Dr. Elías Utreras

Dr. Jorge Fuente Alba

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Agradecimientos:

Cuando comencé a adentrarme a la ciencia yo era un pequeño niño, un niño con muchos sueños, bastante curioso en cuanto a lo que me rodeaba y siempre buscando las respuestas a preguntas que hasta ese punto no lograba entender a plenitud y que creo que todavía no las he podido responder. Me miraba la mano y me hacía preguntas que hoy día pueden ser hasta tan complejas como “de donde vengo y por que estoy acá”, Preguntas que hoy en día recuerdo con cariño, ya que ahí es donde partió mi desarrollo como científico, todo comenzó desde el momento que las cosas me empezaron a fascinar de alguna u otra forma. Sin embargo, no todo se quedó ahí y gracias al fundamental apoyo que recibí de mis queridos padres que siempre crearon en mi la gana de querer aprender y adueñarme del conocimiento. Por lo que recuerdo una tarde de otoño, mi padre me motivo a participar en mi primera feria científica, yo sin saber mucho de lo que era me metí a ver y lo encontré, pero complejo. ¿Que podría hacer yo? ¿Bueno, y le pregunte que podemos hacer? Y me dio un libro de ciencias y encontré por ahí un dibujo de una radio. Y me dio la idea de realizar nuestro primer proyecto. una Radio galena. Yo todo emocionado, comencé a aprender sobre las ondas, sobre la física que hay detrás de eso, y junto a mi padre buscando la roca Galena, para después comenzar con el proyecto y armar nuestra radio. Estuvimos semanas estudiando y armando el proyecto, tuvimos problemas, pero al final todo salió de maravilla, logramos escuchar las primeras señales AM por un viejo audífono. ¡Lo habíamos logrado! Entonces armamos la radio y la fui a presentar con un viejo poster donde explicaba la ciencia detrás de la radio galena, sin saberlo ya era un científico y eso me lo dio fundamentalmente mi padre. No nos detuvimos ahí, seguimos participando en muchas más ferias y ganando varias de ellas con proyectos bastante novedosos y

rudimentarios para un niño de básica. Por ende, cuando pienso en Ciencia, pienso en mi padre que fue mi principal motivador en este largo camino que todavía no termina. También a mi madre que con su enorme corazón me cuidó desde que tuve mis primeros segundos de vida y protegiéndome ante viento y marea. Sin ella no podría estar acá. También agradecer a mi Tio Jaime, una persona tremendamente importante y que ha determinado mi desarrollo desde muy pequeño, apoyándome en todo. A mis hermanas, mis sobrinas, mis amigos por sobre todo a la Ignacia “Nina” que me ha aguantado todos estos años y siempre ayudándome en todo y el Nico “Losty”, que ha sido uno de mis grandes amigos en la vida. Son muchas personas que quiero agradecer, que han participado de manera activa en mi desarrollo, indirecta y directamente. por sobre todo a mis pingüinos los 4 por siempre y ala Stellita.. mi querida amiga argentina. son muchas personas que han estado, Ernesto, el LabCenedyn. Todos... Gracias de verdad y finalmente me gustaría terminar este agradecimiento mencionando a la canción de la Mercedes Soza y a mi gran compañero Pablo Arias, siempre creíste en mi incluso cuando nadie lo hacía...

“Tantas veces me mataron
Tantas veces me morí
Sin embargo estoy aquí
Resucitando
Gracias doy a la desgracia
Y a la mano con puñal
Porque me mató tan mal
Y seguí cantando”

1 Resumen:

Las neuronas son células altamente polarizadas y con compartimentos muy especializados como el axón y las dendritas que facilitan la conexión con otras neuronas. El desarrollo de estas estructuras está relacionado fuertemente con el tráfico de membrana. Un proceso complejo que es mediado por proteínas Rab GTPasas. Existen más de 60 proteínas GTPasas en el ser humano y que median distintos procesos celulares, entre ellas la polarización neuronal. Cuando estas proteínas se activan intercambiando GDP por GTP, generan afinidad de unión con los efectores. Se ha logrado describir la unión entre Rab36-RILP-L1 y que estaría involucrado en el tráfico de membrana. Nuestra evidencia experimental muestra que Rab36 se expresa en neuronas de cultivo primario al igual que RILP-L1, y que además sobre expresando la versión constitutivamente activa y dominante negativa de Rab36 generan cambios significativos en cuanto al largo axonal, evidenciando por primera vez el rol de Rab36 mediando el desarrollo de la polaridad neuronal

2 Abstract:

Neurons are highly polarized cells with specialized compartments such as the axon and dendrites that facilitate connections with other neurons. The development of these structures is closely associated with membrane trafficking, a complex process mediated by Rab GTPases proteins. In the human body, there are over 60 GTPase proteins that mediate various cellular processes, including neuronal polarization. When these proteins are activated by exchanging GDP for GTP, they exhibit an affinity for binding with effectors.

The interaction between Rab36-RILP-L1 has been elucidated, indicating its involvement in membrane trafficking. Our experimental evidence demonstrates the expression of Rab36 and RILP-L1 in primary cultured neurons. Moreover, overexpression of the constitutively active and dominant-negative versions of Rab36 results in significant changes in axonal length. This provides, for the first time, evidence of the role of Rab36 in mediating the development of neuronal polarity.

Índice:

Contenido

1	Resumen:	5
2	Abstract:	6
3	Introducción:	9
3.1	Desarrollo de la polaridad neuronal	9
3.2	Tráfico vesicular y proteínas Rabs:	11
3.3	Rab36:	15
3.4	RILP-L1:	15
3.5	Problema:	16
4	Hipótesis:	16
5	Objetivo General:	16
6	Objetivos específicos:	16
6.1	Evaluar la expresión y distribución de Rab36 y su efector RILP-L1 en neuronas durante la adquisición de la polaridad neuronal.	16
6.2	Evaluar los efectos de la modulación de Rab36 durante el establecimiento de la polaridad neuronal.	16
7	Materiales & Métodos:	16
7.1	Utilización de animales:	16
7.2	Cultivo primario de neuronas hipocampales y corticales:	17
7.3	Cultivo de líneas celulares:	17
7.4	Experimentos de transfección:	18
7.5	Transfección para neuronas hipocampales de rata:	18
7.6	Inmunofluorescencia:	18
7.7	Preparación de RIPA 1X & Extracción de proteínas:	19
7.8	Western-Blotting:	19
7.9	Anticuerpos utilizados para Western-blott:	20
7.10	Microscopia confocal fluorescente:	20
7.11	Análisis de imágenes:	20
7.12	Análisis estadístico:	20
8	Resultados:	21

8.1	Expresión y localización endógena de Rab36 en neuronas primarias durante la adquisición de la polaridad neuronal.....	21
8.2	Expresión y localización endógena de RILP-L1 en neuronas primarias durante la adquisición de la polaridad neuronal.....	23
8.3	Expresión de los vectores de Rab 36 en líneas celulares:.....	25
8.4	Evaluación del rol de Rab36 en la polaridad neuronal:.....	28
9	Discusión:.....	33
9.1	Polarización neuronal.....	33
9.2	Las proteínas Rab y el tráfico vesicular:.....	33
9.3	Proteínas Rabs en el desarrollo neuronal.....	34
9.4	Polaridad neuronal y el proceso de tráfico vesicular:.....	35
9.5	Posible participación de Rab36 en un mecanismo de activación:.....	36
10	Conclusión:.....	37
10.1	Objetivo 1:.....	37
10.2	Objetivo 2.....	37
11	Bibliografía:.....	38

3 Introducción:

3.1 Desarrollo de la polaridad neuronal

Las neuronas son las células del cerebro responsables de la rápida comunicación de información (Lovinger et al 2008). La especificidad sináptica se ha examinado tradicionalmente sobre la base de células completas, la morfología neuronal excepcionalmente polarizada (Yogev et al., 2018). Estructuralmente, las neuronas poseen un soma acompañado de varias extensiones citoplasmáticas denominadas dendritas y una larga prolongación denominada axón. Las neuronas adquieren su morfología característica a través de un proceso denominado establecimiento de la polaridad neuronal que tiene lugar temprano en el desarrollo embrionario, y que se ha estudiado *in vitro* principalmente usando neuronas del hipocampo y de la corteza cerebral (Wang et al., 2020). En este proceso se han descrito 5 etapas bien caracterizadas (Dotti et al., 1988; Banker et al., 2018) (Figura 1). La primera etapa consta de neuronas postmitóticas que presentan formas esféricas con ausencia de prolongaciones, comprendiendo la etapa 1. Luego, las neuronas comienzan a desarrollar extensiones denominadas neuritas menores, las cuales se mantienen dinámicamente alargándose y retrayéndose, correspondiendo a la etapa 2. Posteriormente, una de estas neuritas menores se diferencia y comienza a generar una extensa estructura denominada axón, finalizando con la etapa 3. Durante la transición entre las etapas 2 y 3, la neurona se polariza estableciéndose los compartimentos somato-dendríticos y axonal, esenciales para la neurotransmisión. Posteriormente, comienza la maduración estructural y funcional de estos compartimentos (etapa 4) y la formación de espinas dendríticas y contactos sinápticos (etapa 5) (Funabashi et al., 2020) (Figura 1).

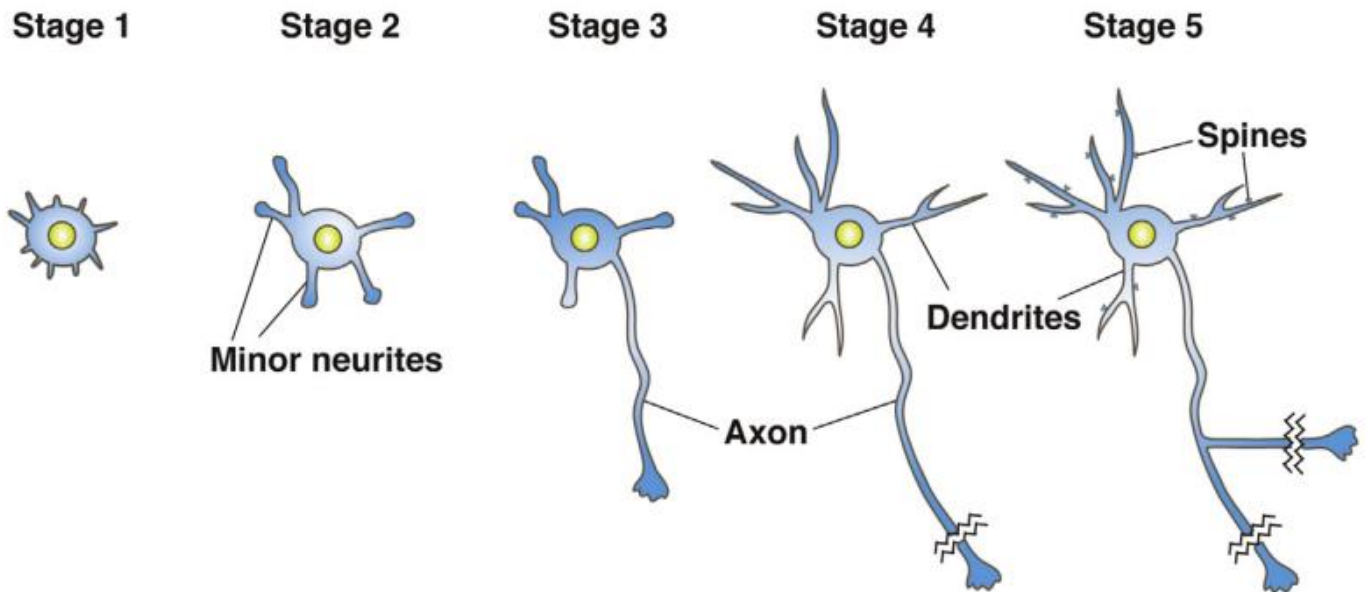


Figura 1. Establecimiento de la polaridad neuronal *in vitro*. Etapas del desarrollo de neuronas primarias hipocampales o corticales en cultivo. A partir de la etapa 1, una neurona esférica con filopodios se desarrolla en distintos procesos menores para dar lugar a la etapa 2. Posteriormente uno de estos procesos menores se diferencia en el compartimiento axonal, abordando así la etapa 3. Posteriormente, los compartimentos somato-dendríticos y axonal maduran (etapa 4), concluyendo su proceso de desarrollo formando espinas dendríticas y contactos sinápticos en la etapa 5. Modificado de (Funahashi et al.,2020).

El proceso de polarización neuronal involucra numerosos cambios celulares y moleculares que favorecen la adquisición de una morfología polarizada, como el transporte y tráfico vesicular vectorialmente organizado, la dinámica del citoesqueleto, la degradación selectiva de proteínas y la formación de dominios de exclusión dentro de la propia neurona, entre otros. Uno de los aspectos importantes a considerar dentro de la célula es el transporte vesicular (Horton & Ehlers, 2003).

3.2 Tráfico vesicular y proteínas Rabs:

El tráfico vesicular incluye la formación de vesículas a partir de la membrana donante, el transporte de vesículas y la fusión de vesículas con la membrana objetivo (Cui et al.,2022), este proceso está también relacionado con el proceso de la polarización celular. El tráfico vesicular de membrana es mediado principalmente por la familia Rab de GTPasas pequeñas. Las proteínas Rabs están conservadas en todas las células eucariotas y se conocen 70 proteínas Rabs en mamíferos, regulan en varios pasos del tráfico de membrana, incluyendo la carga de vesículas, el movimiento de vesículas, el acoplamiento de vesículas a membranas específicas y la fusión de vesículas (Mori et al.,2012).

Estas proteínas Rab están localizadas en las membranas de la cara citoplasmática de los compartimentos celulares membranosos (Figura 2) (Song et al.,2018), (Bhuin et al., 2014). Las proteínas Rabs son conocidas como “interruptores moleculares” (*molecular switches*) ya que ciclan entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. Este ciclo depende específicamente de proteínas GEFs (factor de intercambio de nucleótidos de guanina) que promueven el intercambio de nucleótidos (GDP por GTP) (Grosshans et al.,2006) activando así a la proteína Rab. Una vez que esta proteína se activa (unida a GTP) interactúa específicamente con un efector. Esta interacción genera una señalización río abajo a través de otras proteínas resultando así la modulación del tráfico vesicular (Figura 2) (Modificado de Song et al., 2018).

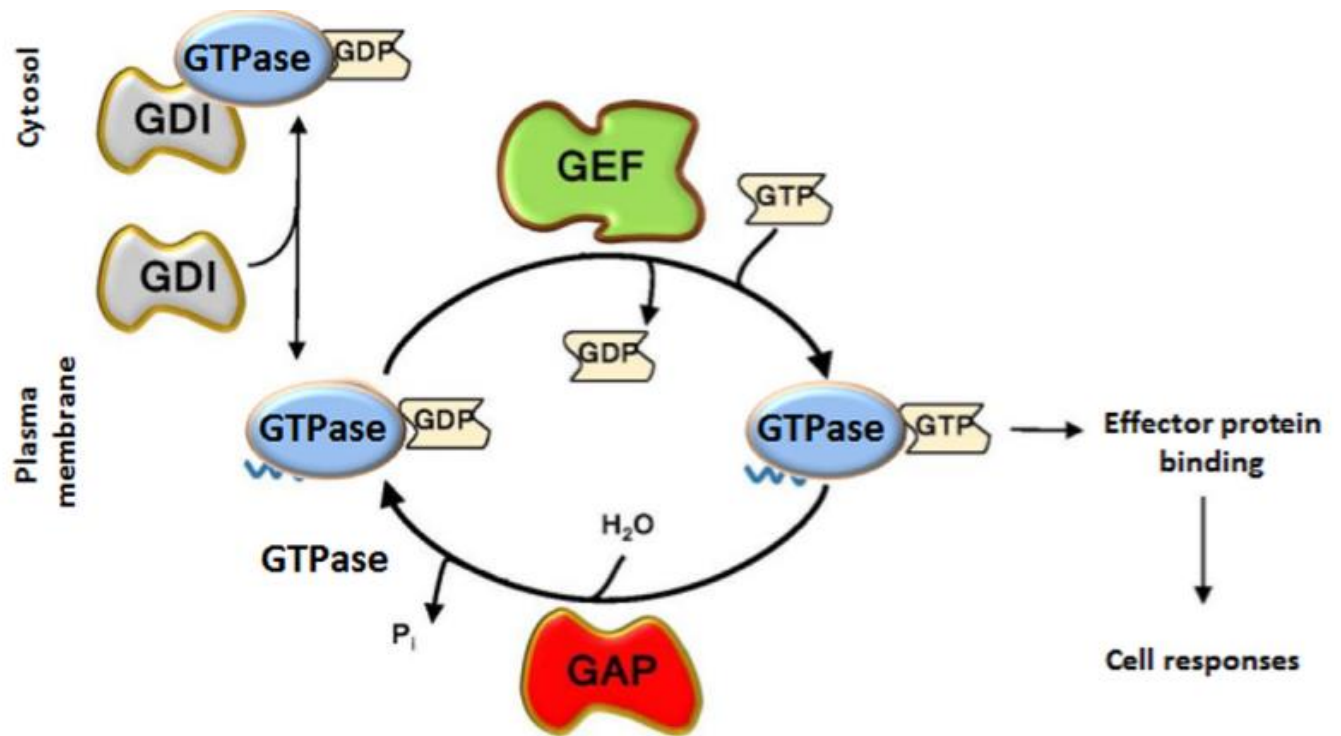


Figura 2. Mecanismo regulado de activación e inactivación de las proteínas Rabs. Durante el ciclo de activación de las Rabs, estas proteínas que se encuentra en el citoplasma son translocadas hacia la membrana plasmática para ser activada por sus proteínas GEFs específicas mediante el intercambio de GDP por GTP. Este intercambio de nucleótido y activación de las proteínas Rabs permite su interacción proteínas efectoras específicas y genere una señalización río abajo y una respuesta celular como la regulación del tráfico vesicular (Modificado de Song et al., 2018). GDI: inhibidor de disociación de GDP. Una vez que las Rab se active y generan una respuesta celular, estas proteínas Rab se inactivan. Esta inactivación es mediada por GAP más conocido como proteína activadora de GTPasa. Las GAP realizan el intercambio de GTP por GDP, inactivando la proteína (Rivera-Molina et al., 2009)

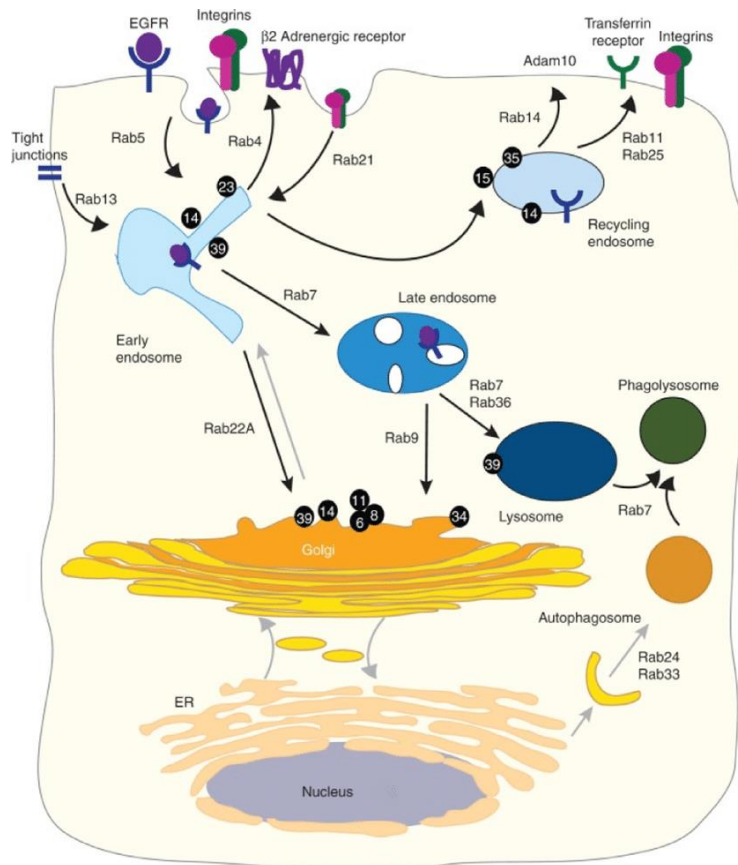


Figura 3. Descripción general sobre la participación de distintas proteínas Rabs en el tráfico vesicular y en el sistema endosomal. Las proteínas Rab GTPasas modulan los procesos de internalización de membrana, reciclaje, vías de degradación lisosomal, entre otros (Song et al.,2018)

Rol de las proteínas Rabs en el sistema nervioso:

El tráfico intracelular a larga distancia de los cargos es esencial para la función neuronal. Las proteínas Rab juegan un rol importante mediando el transporte de membrana y de proteínas esenciales para el desarrollo del axón y dendritas. Además, las proteínas Rabs también juegan un rol crucial en la exocitosis y reciclaje de los neurotransmisores, manteniendo así la comunicación neuronal como también una fisiología celular normal (Veleri et al.2018). Se ha logrado describir el rol de Rab17 a partir del knockdown de Rab17 y resultó que hubo una reducción en el número de espinas dendríticas (Mori et al., 2012). Además, se ha descrito que el tráfico vesicular está relacionado con la polaridad neuronal. Por ejemplo, Rab 4 que se localiza en los endosomas tempranos y los endosomas de reciclaje, promueven la elongación del axón. De igual manera, se

ha logrado dilucidar que Rab 11 promueve la elongación neurita-axón y la regeneración axonal (Rozéz-Salvador et al., 2020). Esto nos da una noción del importante rol que poseen las proteínas Rab mediando el tráfico y regulando la polaridad neuronal.

Por otro lado, evidencia acumulada sugiere el rol y participación de varias proteínas Rabs que contribuyen activamente en la formación del axón y propician el desarrollo neuronal temprano (Villarroel-Campos et al, 2014; Villarroel-Campos et al, 2016a). En adición, en investigaciones de nuestro laboratorio se ha descrito el rol de algunas Rabs en el proceso de la polaridad neuronal y crecimiento axonal. Por ejemplo, se ha descrito que Rab35 es importante para la elongación axonal (Villarroel-Campos et al, 2016b) durante el desarrollo neuronal temprano. La expresión de la versión constitutivamente activa (CA) de Rab35 (Q67L) resultó en un incremento de la elongación axonal de neuronas de hipocampo en comparación con el control, mientras que la expresión de la versión dominante negativa (DN) de Rab 35 (S22N) resultó en la disminución del largo axonal (Villarroel-Campos et al, 2016b). Por otro lado, se ha descrito que la expresión de la versión CA de Rab8 promovió el crecimiento axonal mientras que la versión DN de Rab8 redujo el largo axonal, comparados con el control (Urrutia et al, 2021), en conjunto sugiriendo un rol importante en el desarrollo temprano de los compartimentos neuronales

Interesantemente, se ha descrito que Rab35 promueve el reclutamiento de Rab8 y la proteína Rab36 durante la extensión de neuritas inducidas por NGF (*nerve growth factor*) en la línea celular PC12 (Kobayashi et al, 2014). Sin embargo, se desconoce algún rol de Rab36 en el desarrollo neuronal temprano.

3.3 Rab36:

La proteína Rab36 pertenece a la familia Rab de las proteínas GTPasas pequeñas. Esta proteína tiene un peso molecular de 37 kDa. Se ha descrito que Rab36 se expresa y está enriquecida en varios tejidos de ratón, incluyendo el cerebro (Matsui et al. 2012). Dada su naturaleza y participación en el tráfico vesicular, se ha descrito que Rab34 se localiza en el aparato de Golgi, específicamente en la red trans-Golgi (TGN) y participación en la regulación de la distribución espacial de los endosomas tardíos y lisosomas (Chen et al, 2010). Por otro lado, Rab36 también ha sido descrita como una proteína relacionada al transporte retrógrado de en melanosomas en melanocitos (Matsui et al.2012). En adición, se describió que la sobre-expresión de la versión *wild type* (WT) de Rab36 está asociada a una distribución perinuclear mientras que mutaciones en Rab36 redujeron esta agregación perinuclear en melanocitos (Matsui et al, 2012). Sin embargo, a pesar de que se ha descrito diversos roles de Rab36 en la regulación del tráfico vesicular, no se ha descrito algún rol de Rab36 en el desarrollo del sistema nervioso.

3.4 RILP-L1:

La Proteína RILP (*Rab Interacting Lysosomal Protein*) o proteína lisosomal que interactúa con Rab, es una proteína efectora de Rab36. Evidentemente, esta interacción tiene lugar cuando Rab36 está activa unida a GTP o en su versión constitutivamente activa Rab36-Q67L (Matsui, et al 2012). Esta proteína efectora pesa 47 kDa. Se ha descrito que RILP participa en el transporte retrogrado que está mediado por el complejo de dineínas y dinactinas en neuronas corticales de rata (Khobreakar et al., 2020) motor molecular esencial para el flujo vesicular retrógrado. Se ha descrito que RILP y el complejo dineínas/dinactina juega un papel crucial en el transporte de organelos, y su interacción cumple una importante función en la maquinaria de transporte celular, por lo que tales procesos de tráfico vesicular podrían depender de la proteína Rab36. Sin embargo, se desconoce la expresión de la proteína efectora RILP durante el desarrollo neuronal temprano y durante la adquisición de la polaridad neuronal.

3.5 Problema:

La proteína Rab36 y su efector RILP han sido asociados a la regulación del tráfico vesicular y endosomal intracelular. Sin embargo, se desconoce la expresión y localización de estas proteínas involucradas en el tráfico de membranas durante el desarrollo neuronal temprano. Además, se desconocen las consecuencias de la modulación de la proteína Rab36 durante el proceso de polaridad neuronal y extensión axonal.

4 Hipótesis:

La proteína Rab36 contribuye al crecimiento axonal durante el establecimiento de la polaridad de neuronas de hipocampo *in vitro*.

5 Objetivo General:

Estudiar el rol de Rab36 durante el establecimiento de la polaridad neuronal en cultivo.

6 Objetivos específicos:

- 6.1 Evaluar la expresión y distribución de Rab36 y su efector RILP-L1 en neuronas durante la adquisición de la polaridad neuronal.
- 6.2 Evaluar los efectos de la modulación de Rab36 durante el establecimiento de la polaridad neuronal.

7 Materiales & Métodos:

7.1 Utilización de animales:

Para el manejo de los animales se utilizaron ratas Sprague-Dawley (E18.5) que fueron eutanasiadas mediante el uso de sobredosis anestésica inhalatoria con isoflurano, y posterior a esto se realizó toracotomía bilateral como método físico secundario. Posteriormente se extrajeron los embriones y fueron puestos en hielo para generar congelamiento gradual, evitando contacto directo con la superficie fría (según AVMA, 2020). Posteriormente se procedió a decapitarlos con las tijeras adecuadas. Posterior a la eutanasia, se realizó la disección del cerebro y de regiones específicas (hipocampo y corteza cerebral), para los cultivos primarios de neuronas.

7.2 Cultivo primario de neuronas hipocampales y corticales:

Los covers de vidrio fueron tratados previamente (día anterior) con Poli-L-lisina (1mg/ml) (Sigma-Aldrich). Las neuronas hipocampales y/o corticales fueron disectadas en medio HBSS (Hank's balanced Salt Solution). Para las neuronas hipocampales y/o corticales disectadas se colocaban en una placa P60 con 4.5 ml o 4ml de HBSS 1X respectivamente. Luego de obtener los tejidos de interés llevamos los tejidos a la cámara de cultivo. Se agregaron 500 uL de Tripsina 2.5% (Tripsina 10X) para completar los 5 ml. En el caso de las neuronas corticales E18.5, usamos 4ml de HBSS más 500 uL de Tripsina 2.5% más 500 uL de DNAsa. La incubación se realizó por 20-25 min para neuronas hipocampales a 37 °C en incubador y 25-30 min para neuronas corticales respectivamente.

Las neuronas deben pasar por un proceso de disgregación mecánica. Para esto primero se prepararon pipetas Pasteur de vidrio con algodón. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 2 ml de HBSS 1X estéril. Con el fin de diluir y lavar los tejidos de la Tripsina. Luego se agregan 2 ml de medio MEM 10% HS a los tejidos y con pipetas Pasteur de un diámetro diferente se realiza la disgregación mecánica, hasta que los tejidos logren homogenizarse con el medio.

Una vez realizado esto, se preparó un tubo 1.5 ml. Una mezcla de 10 uL de azul de tripán y se estimaron posteriormente el número de neuronas presentes en los 2 ml o por cada uL, utilizando la cámara de Neubauer. Finalmente se sembró la cantidad de neuronas necesarias para el diseño experimental requerido. Una vez plaqueado se espera 1 hora para la adherencia de las neuronas la placa se realiza cambio de medio MEM 10 % HS (con suero) por el medio Neurobasal de Mantención (sin suero).

7.3 Cultivo de líneas celulares:

Las líneas celulares COS-7 y N2A en placas P100 respectivamente crecieron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) previamente temperado en el baño termo regulado, logrando así la confluencia deseada. Posteriormente se tripsinizó en placa P24 well plate. Se realiza un plaqueo de las células respectivas considerando un 50-55% de confluencia. Las placas se guardan en el incubador de cultivo a 37 grados Celsius hasta obtener una confluencia deseada.

7.4 Experimentos de transfección:

7.5 Transfección para neuronas hipocampales de rata:

Para este experimento se cultivaron 60.000 neuronas hipocampales de rata por cover de 13mm (Inmunofluorescencia). Las neuronas fueron transfectadas por Lipofectamina 2000 (Invitrogen™), siguiendo el protocolo de Lipofectamina 2000, utilizando los siguientes plásmidos: 1) GFP (348 ng/μL), 2) Rab36 Q67L (585.5 ng/μL), 3) Rab36 DN (447.5 ng/μL), 4) Rab35 Q67L (271 ng/μL).

7.6 Inmunofluorescencia:

Se sembraron células con la confluencia necesaria para que posteriormente se realice el lavado con PBS 1X (Buffer fosfato salino) a 37 °C. Una vez realizado esto, se prepara PFA al 4% (½ Paraformaldehído 8% & ½ Sacarosa 8 %). Con este PFA 4 % se procedió a fijar las células con 500 ul por pocillo y se dejó 30 minutos en la incubadora a 37 °C. Una vez pasado el tiempo, se recuperó el PFA 4% y procedió a lavar con PBS 1X temperado por 5 minutos, repitiendo este proceso 3 veces. Una vez fijada la muestra, se realizó la permeabilización con 500ul de PBS Triton X-100 0.2% durante 5 min. Posteriormente se lavó con PBS 1X por 5 minutos repitiendo este lavado 3 veces, luego se procedió a bloquear con 500ul de BSA/PBS 5% durante una hora a temperatura ambiente. Durante este proceso de bloqueo se realizó la preparación del anticuerpo primario en BSA/PBS 1% y se colocó 50 ul de anticuerpo primario en contacto directo con las células, dejándolo así overnight. Al día siguiente se retiraron los covers para poder lavarlos con PBS 1X durante 5 minutos para lograr quitar el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario conjugados con Alexa Fluor en similares condiciones que el proceso de incubación del anticuerpo primario se incubó por 45 minutos para que después se realizaran lavados con PBS 1X.

Montaje de muestra con Fluor Save:

Se deposita 9-10 μL de Fluor Save en el portaobjeto, y se coloca el cubreobjeto. Una vez colocado el cubreobjeto, se debe esperar que el Fluor Save se seque completamente para la observación en el microscopio.

Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Inmunofluorescencia:

Se utilizó RILP-L1 (Rabbit; 1:500) Lifespan Bioscience LS-B9574, Rab36 (Rabbit; 1:500) proporcionado por Fukuda *et al.*, DAPI (1:1000), Faloidina, Alfa-Tubulina (Mouse; 1:1000), MAP-2 (Rabbit;1:500), Tau-1(Mouse;1:500). Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios asociados a Alexa Flúor: AF-546 y AF-647 (1:500)

7.7 Preparación de RIPA 1X & Extracción de proteínas:

RIPA 1X está constituido por RIPA 2X 0.5M Tris-HCL, pH7.4,2.5% de ácido desoxicólico, 10% NP-40, 10mM EDTA. Inhibidor de proteasa 200X, PMSF 100X (Ser/Thr & acido fosfatasa), Caliculina 1000X y agua estéril. Posteriormente se utiliza PBS1X para realizar los primeros dos lavados, para después se utilice RIPA 1X al centro de la placa y con un scraper realizar fuerza mecánica para soltar las células de la placa y, colocarlas en los tubos Falcón 1.5ml durante 15 minutos en hielo. Seguidamente centrifugar 20 min a 4 grados Celsius a 14000 RPM.

Finalmente se toman los extractos y se guardan a -80 grados Celsius si se desea guardar para más adelante o bien posteriormente cuantificarlo por el método de Bradford. Una vez cuantificado se coloca Buffer de carga 5X y Agua para lograr la concentración deseada.

7.8 Western-Blotting:

Los extractos de proteínas se obtuvieron de líneas celulares o cultivos neuronales primarios. Las células se lisaron con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA), se sometieron a geles SDS-PAGE al 10% es una cámara Mini-protean (Bio-Rad) y se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa o difluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en solución TBS-Tween-20(TBS-T) (0.05% v/v) en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Las transferencias se sondaron con los anticuerpos primarios y secundarios apropiados (HRP), y las señales de inmunorreactividad se visualizaron con un sustrato quimioluminiscente mejorado (Thermo Scientific).

7.9 Anticuerpos utilizados para Western-blott:

Para este trabajo se utilizó RILP-L1 (Rabbit; 1:1000), anti-GFP (mouse; 1:1000). Estos anticuerpos se prepararon en leche al 1% con TBS-T en las concentraciones adecuadas para cada anticuerpo.

7.10 Microscopia confocal fluorescente:

Las imágenes fueron tomadas por el microscopio confocal de fluorescencia LSM 710 de la Universidad de Chile, Logrando recopilar imágenes de luz transmitida, así como imágenes de fluorescencia convencionales y confocales. El visor objetivo utilizado fue el 63X y los Lasers (405nm diode laser, Argon/2 (458,488,514 nm), Hene1(543/561nm) and HeNe2 (633 nm). Software ZEN 2011 software para controlar el microscopio, escaneo, laser y herramientas para el proceso de imágenes. Filtros fluorescentes DAPI (azul), Rhodamina (rojo) y FITC (verde).

7.11 Análisis de imágenes:

Para el análisis de imágenes se utilizó ImageJ - Fiji, un software gratuito que facilita poder montar las imágenes, generando datos para el posterior análisis por medio de GraphPad 8 creando así los gráficos a partir de los datos previamente recolectados.

7.12 Análisis estadístico:

Para el análisis estadístico se utilizó GraphPad 8. Todos los resultados analizados fueron por comparaciones entre más de dos grupos usando ANOVA de una vía considerando significancia de $p < 0.05$.

8 Resultados:

Objetivo 1: Evaluar la expresión y distribución de Rab36 y su efector RILP-L1 en neuronas durante la adquisición de la polaridad neuronal.

8.1 Expresión y localización endógena de Rab36 en neuronas primarias durante la adquisición de la polaridad neuronal.

Se ha descrito la expresión de la GTPasa pequeña Rab36 en tejido de cerebro de ratón y se ha descrito asociada al aparato de Golgi (Hutagalung et al.,2011) y a los endosomas tardíos y lisosomas (Chen., et al 2010) en HeLa y NRK. Sin embargo, no se ha descrito su expresión ni localización durante el desarrollo neuronal temprano. Con el objetivo de evaluar la expresión de Rab36 en neuronas de rata *in vitro* durante el proceso de polarización neuronal, se extrajeron proteínas de neuronas corticales cultivadas por 24, 48 y 72 h (1-3 DIV) y se determinó la expresión de Rab36 mediante ensayos de western blot (Figura 4-A). Encontramos que esta GTPasa pequeña (37 kDa) está presente durante la adquisición de la polaridad neuronal (Figura 4-A).

Rab36 participa en el tráfico vesicular retrógrado (Maruta et al.,2022; Matsui et al.,2012). Mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal estudiamos la expresión, localización y distribución celular de Rab36 en neuronas de hipocampo durante la polarización neuronal (Figura 4-B). La GTPasa pequeña Rab36 fue detectada y se localizó en el soma y neuritas menores de neuronas en estadio 2. Además, Rab36 fue detectada en neuronas polarizadas (estadio 3) tanto en el soma y neuritas menores como en el compartimento axonal (Figura 4-B). La señal de fluorescencia detectada muestra un patrón vesicular tal como se espera de esta GTPasa involucrada en tráfico. En conjunto, estos resultados sugieren que la GTPasa Rab36 está presente durante las etapas en que ocurre la adquisición de la polaridad neuronal.

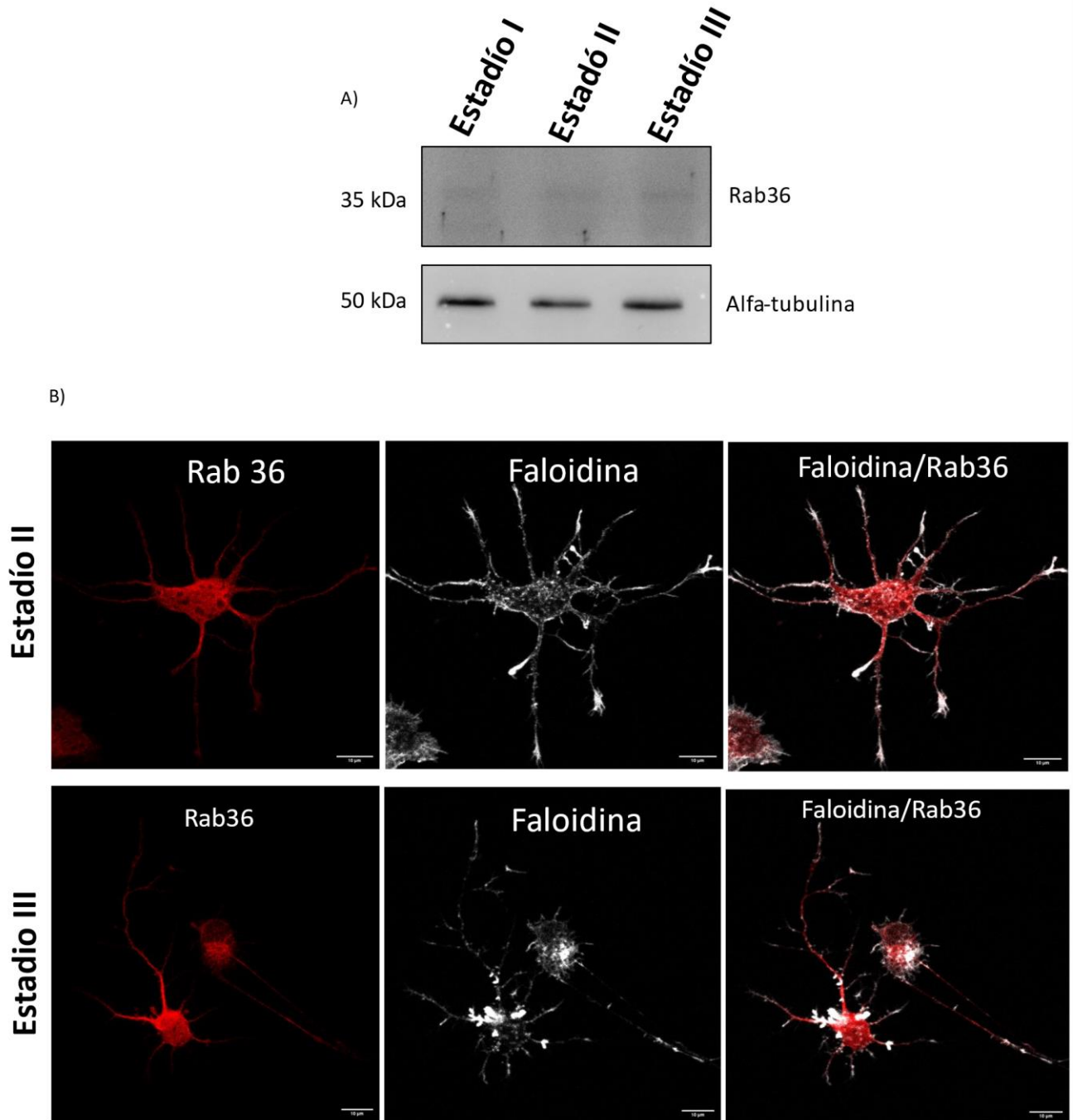


Figura 4.: Expresión endógena de Rab36 en neuronas hipocámpales E18.5: A) Western-blot de neuronas corticales E 18.5 expresando Rab36 durante los primeros tres días *in vitro*, tiempo en el cual ocurre la polarización neuronal (n=2). B) Expresión endógena de Rab36 durante la polarización neuronal (etapas 2 y 3) en cultivo de neuronas hipocámpales de rata.

8.2 Expresión y localización endógena de RILP-L1 en neuronas primarias durante la adquisición de la polaridad neuronal.

Debido a que la señalización río abajo de Rab36 depende de su efector RILP-L1, evaluamos la expresión de este efector en neuronas de rata *in vitro* durante el proceso de polarización neuronal. Para ello, mediante ensayos de western blot se estudió la expresión de RILP-L1 durante los primeros tres días *in vitro* (Figura 5). Encontramos que el efector RILP-L1 (47 kDa) se expresa durante la adquisición de la polaridad neuronal (Figura 5-A), sugiriendo que esta proteína se expresa durante los primeros tres días del desarrollo temprano de la neurona.

Luego de confirmar la presencia de RILP-L1 durante la polaridad neuronal, mediante ensayos de inmunofluorescencia, estudiamos su expresión y distribución en los compartimentos neuronales. Encontramos que RILP-L1 se distribuye tanto en el soma y neuritas menores como en el compartimento axonal (5-B).

En conjunto, estos datos sugieren que la proteína efectora de Rab36, RILP-L1, se expresa durante las etapas de la adquisición de la polaridad neuronal.

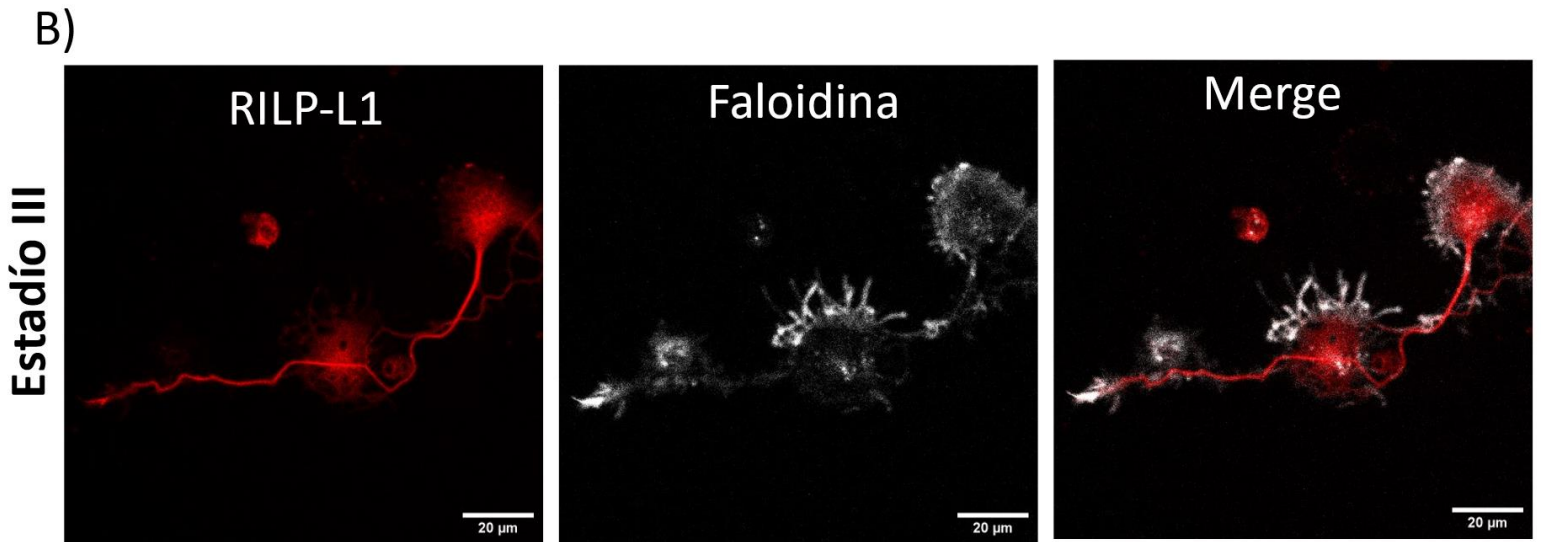
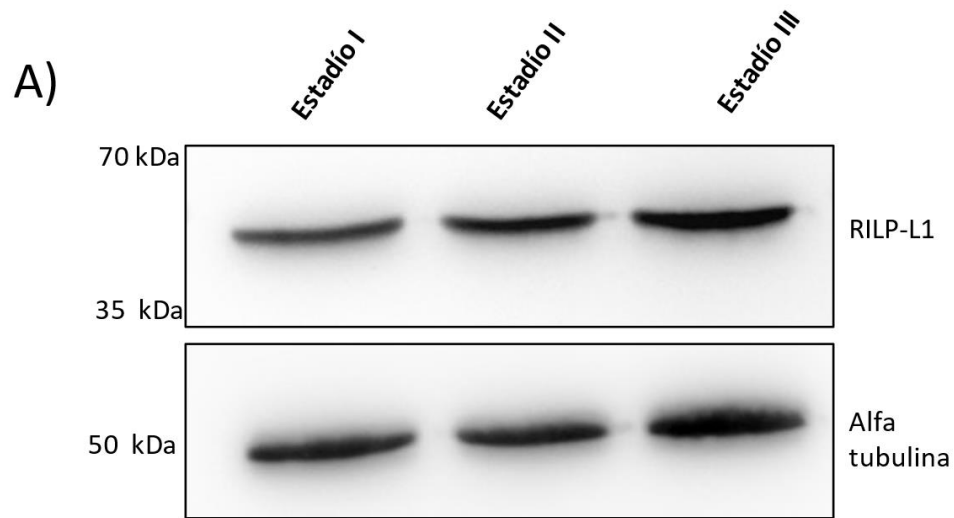


Figura 5. Expresión endógena de RILP-L1 en neuronas hipocampales (etapa 3).

A) Detección mediante ensayo de Western blot de neuronas corticales, mostrando la expresión de RILP-L1 en los primeros días *in vitro*. **B)** Detección de RILP-L1 mediante ensayos de inmunofluorescencia de neuronas hipocampales polarizadas en etapa 3.

Objetivo 2: Evaluar los efectos de la modulación de Rab36 durante el establecimiento de la polaridad neuronal.

8.3 Expresión de los vectores de Rab 36 en líneas celulares:

Con el fin de evaluar los efectos de la modulación de la actividad de Rab36 durante el desarrollo neuronal temprano, primero evaluamos la correcta expresión de los plasmidios utilizados. Tanto la versión constitutivamente activa (CA) de Rab36 (Q67L) y dominante negativa (DN) de Rab36 (T22N) están fusionadas a GFP. Se realizó la evaluación de expresión de estos vectores en líneas celulares y fueron analizadas primeramente por medio de ensayos de western blot. Cultivos celulares de COS7 y N2A fueron transfectadas con la versión DN de Rab 36 o CA de Rab36 o la expresión de GFP soluble como condición control (Figura 6A-B). Una vez realizada la transfección se realizaron extractos de proteínas para el análisis de expresión. Se utilizó anti-GFP para la detección de los vectores en inmunoblotting. Encontramos que tanto las versiones mutantes de Rab36 (CA y DN) como el control GFP se expresaron en ambas líneas celulares (Figura 6A-B), corroborando su correcta expresión en nuestras condiciones experimentales.

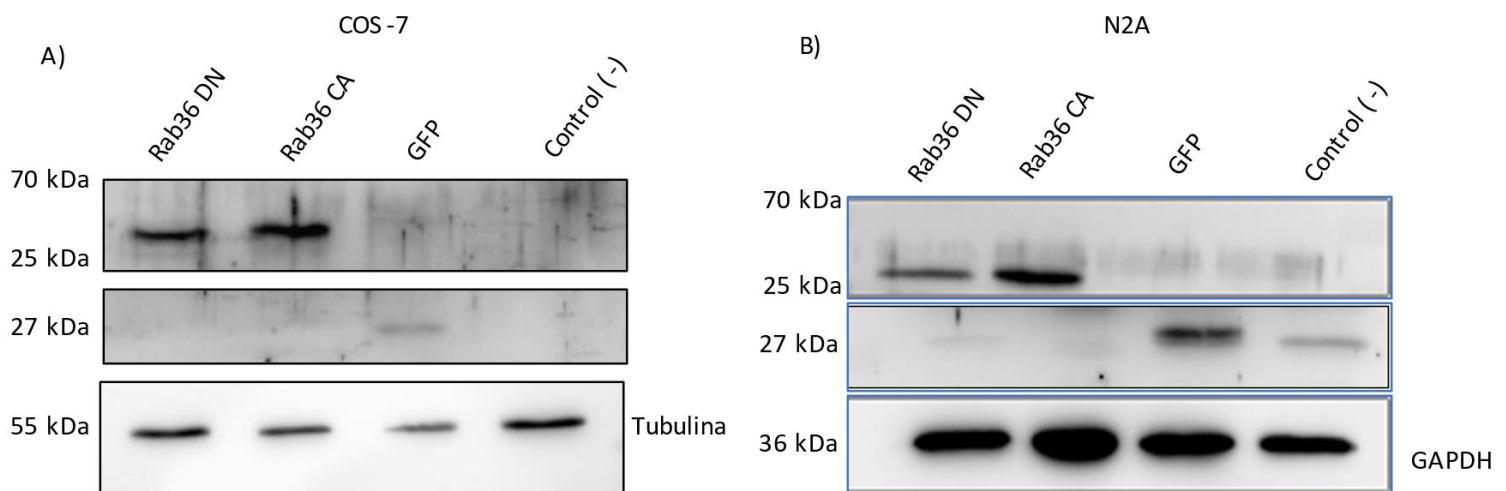
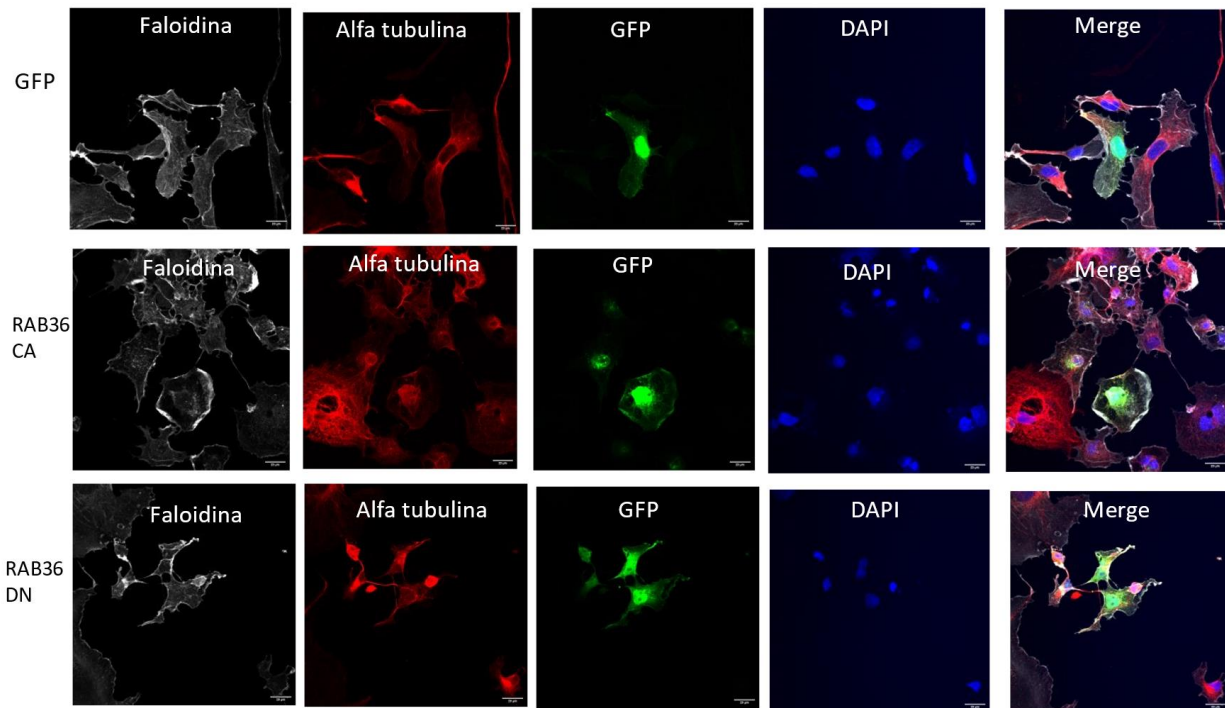


Figura 6. Expresión de los vectores en líneas celulares: **A)** Western blot de células COS-7 transfectadas por RAB36 DN, Rab36 CA, GFP, marcando con anti-GFP las proteínas mutantes. **B)** Western blot de células N2a transfectadas con Rab36 DN, Rab36 CA y GFP. Marcando con anti-GFP

Se ha descrito que Rab36 participa en el tráfico vesicular de la red trans-golgi (TGN), sistema endosomal y tráfico retrógrado (Chen et al.,2010; Matsui et al.,2012), pero no se ha descrito las consecuencias morfológicas celulares por la modulación de esta Rab. Por tanto, las mutantes de Rab36-GFP o el control GFP fueron transfectadas en células COS-7 (Figura 7-A) con el objetivo de evaluar posibles cambios en la morfología celular dependientes de la expresión de estas mutantes. Después de su expresión, las células fueron fijadas, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Posteriormente, se adquirieron imágenes de fluorescencia mediante microscopía confocal de tales condiciones y se realizaron análisis cuantitativos relacionados a la morfología celular tales como área (μm^2), perímetro (μm) y circularidad que, en conjunto, reflejan aspectos morfológicos de las células (Figura 7-B). En primer lugar, no observamos cambios en el área celular al expresar ambas mutantes de Rab 36 comparado con el control GFP (Figura 7B). En segundo lugar, observamos que la expresión de las mutantes de Rab36 CA y DN redujeron el perímetro celular comparado con el control (Figura 7B). Si bien no hubo diferencias significativas del perímetro celular al compararlas entre ambas mutantes, encontramos que la expresión de Rab36 CA redujo significativamente el perímetro comparado con el control. Finalmente, analizamos el parámetro de circularidad, en términos biológicos se refiere a la forma y la estructura de la célula. Los valores entre 0 y 1 reflejando que tan circular es la célula. Encontramos que la expresión de la mutante CA de Rab36 incrementó notable y significativamente la circularidad de las células comparado con el control GFP. También observamos un incremento de este parámetro al expresar la versión DN de Rab36 (Figura 7B).

En conjunto, la expresión de las mutantes CA o DN de Rab36 altera algunos aspectos de la morfología celular sugiriendo que la alteración del tráfico vesicular mediado por Rab36 podría estar contribuyendo a la morfología de células COS7.

A)



B)

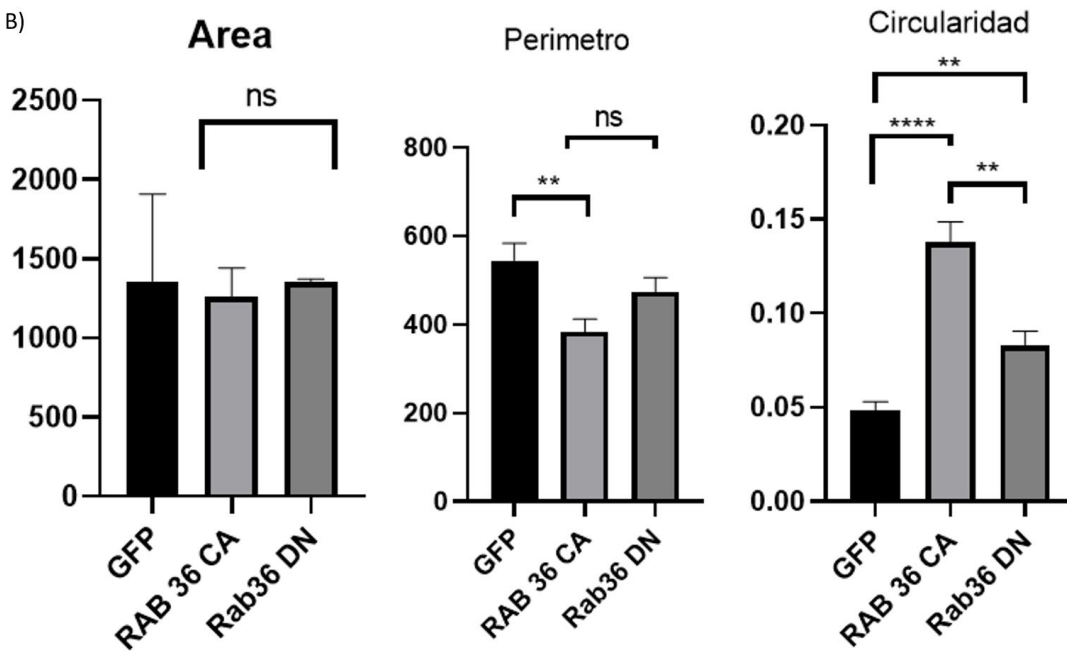


Figura 7. Expresión de las mutantes de Rab36 altera la morfología celular. A) Inmunofluorescencia de células COS-7 expresando las versiones mutantes de Rab36 (CA o DN) y GFP como control. Se realizó inmunodetección con alfa-tubulina, Faloidina y DAPI. **B)** Análisis morfológicos de células COS-7 después de la expresión de mutantes Rab36 CA y DN. Se evaluaron los parámetros de área, perímetro y circularidad (N=2).

8.4 Evaluación del rol de Rab36 en la polaridad neuronal:

Luego de corroborar la expresión de las mutantes de Rab36 en líneas celulares y evaluar aspectos morfológicos asociados a la actividad de esta Rab GTPasa, nos enfocamos en estudiar la expresión de las mutantes de Rab36 CA y DN en cultivo primario de neuronas hipocampales *in vitro*. Para lo anterior, las neuronas fueron transfectadas a DIV I con las versiones CA y DN de Rab36, expresadas por 48 h y fueron fijadas en estadio 3. Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-Rab36 con el objetivo de amplificar la señal GFP de la expresión del constructo y verificar una similitud de la señal. Encontramos que la sobreexpresión de Rab36 es similar con la marca fluorescente al utilizar el anticuerpo contra Rab36 (Figura 8) y con reconocimiento adicional de la señal lo que sugeriría la detección endógena de Rab 36, además de la sobre-expresada. En adición, la señal fluorescente por la expresión ectópica de Rab36 tanto de la mutante CA como DN presentaron un patrón vesicular, similar a la inmuno-detección endógena (Figura 4-B), y se distribuyeron en el compartimento somato-dendrítico y en el compartimento axonal. No obstante, interesantemente, se observó que la distribución de la versión DN de Rab36 está más restringida en el soma neuronal comparado con la versión CA, consistente con el hecho de que en la versión DN esté inactiva y, por tanto, afectando negativamente el tráfico vesicular (Figura 8).

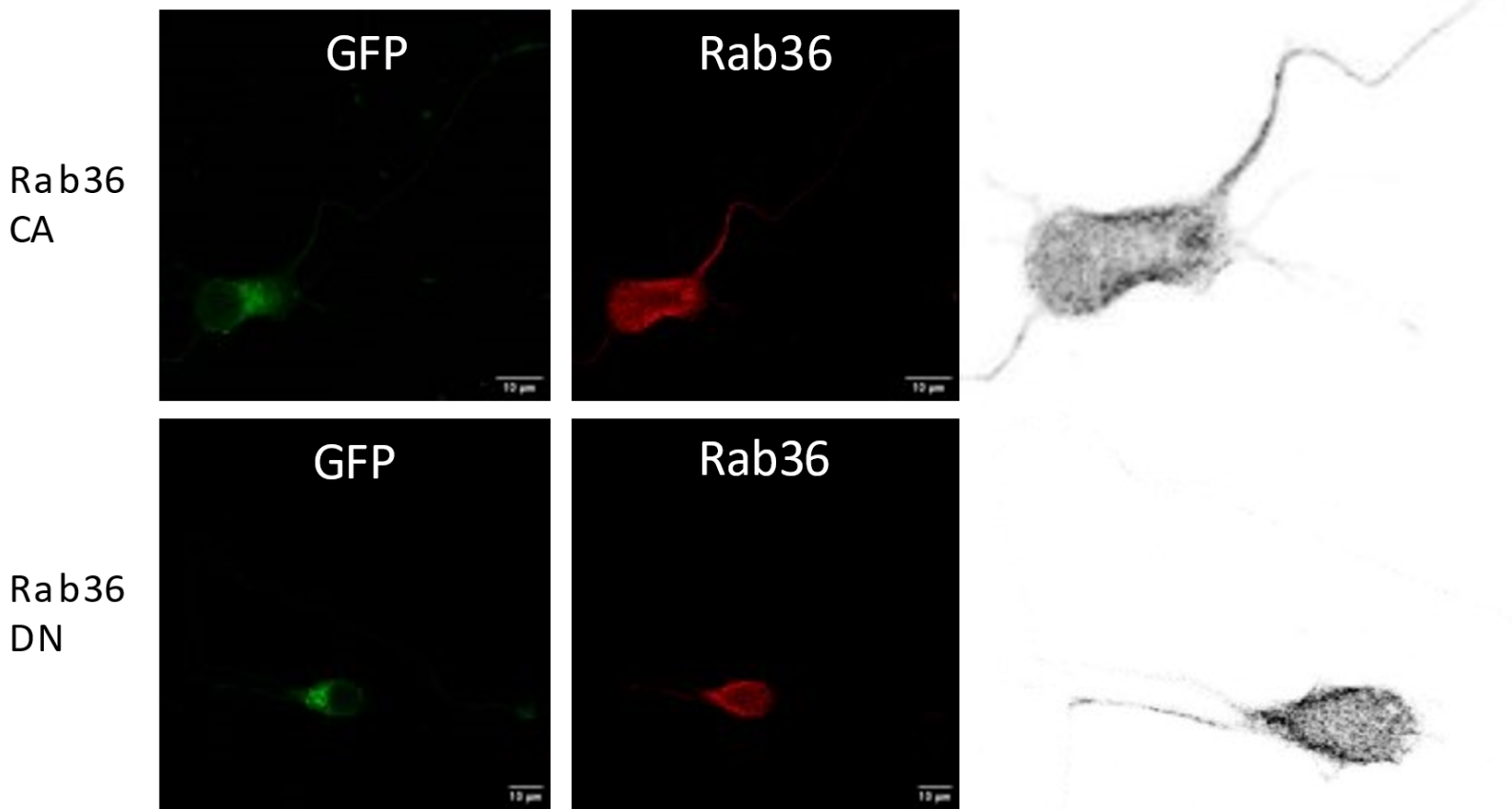


Figura 8. Distribución de Rab36 en neuronas hipocámpales transfectadas con Rab36 DN y Rab36 CA (Estadio 3): Inmunofluorescencia de Neuronas de hipocampo en DIV III transfectadas con Rab36 CA, marcadas con anti-Rab36. Se logra observar la distribución de Rab36 en los compartimentos neuronales. La señal de GFP que da cuenta de la expresión de cada mutante es amplificada con la tinción anti Rab36.

Luego de confirmar la sobre-expresión de las mutantes de Rab36 en neuronas hipocampales, estudiamos las consecuencias morfológicas de neuronas hipocampales al sobre-expresar las mutantes DN y CA de Rab36. Para ello, similar a la aproximación experimental anterior, transfectamos las neuronas a DIV I con Rab36 DN, CA o con GFP como control, y luego de 48 h de expresión fueron fijadas. Luego, realizamos ensayos de inmunofluorescencias utilizando los marcadores neuronales MAP2 y TAU-1, identificando los compartimentos somato-dendrítico y axonal, respectivamente. (Figura 9-A). Además, incluimos la expresión de la proteína Rab35 CA como control de la elongación axonal tal como se describió previamente (David-Villaroel et al.,2016). Luego de la adquisición de imágenes, evaluamos el largo axonal de las condiciones mencionadas.

Encontramos que las neuronas transfectadas con la versión dominante negativa de Rab36 presentaron una reducción del largo axonal comparado con el control de GFP. Por el contrario, las neuronas transfectadas con la versión constitutivamente activa de Rab36 presentaron un incremento en el largo axonal comparado con el control. Sin embargo, a pesar de observar cambios en el largo o disminución axón, estos cambios no fueron significativos. (Figura 9-B). Por otro lado, se observó que la expresión de Rab35 CA promovió el crecimiento axonal tal como se esperaba (David-Villaroel et al.,2016) pero tampoco fue significativo cuando se compara Rab35 CA con Rab36 CA respectivamente.

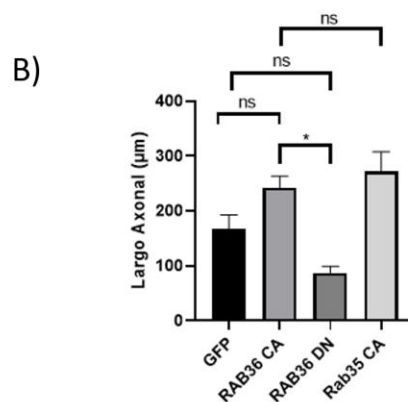
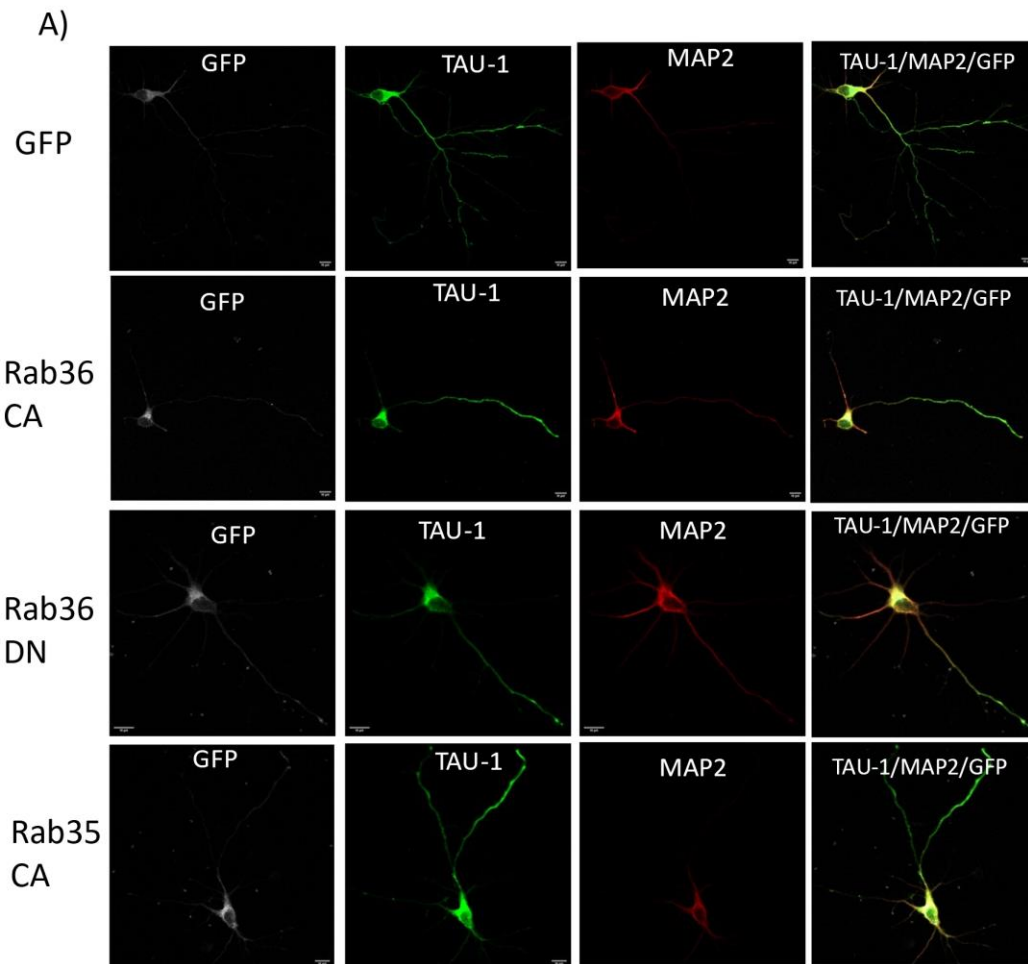


Figura 9. Contribución de Rab36 durante la elongación axonal. A) Neuronas hipocámpales expresando las versiones Rab36 CA, Rab36 DN, Rab35 CA o GFP como condición control. Marcarje con TAU-1 y MAP2. B) Análisis cuantitativo de la longitud axonal de neuronas hipocámpales del panel A.

En adición, encontramos que la expresión de Rab36 CA, además de promover el largo axonal, generó en algunos casos, la presencia de neuronas con más de un axón, lo cual es presentado de forma cualitativa (Figura 10).

A)

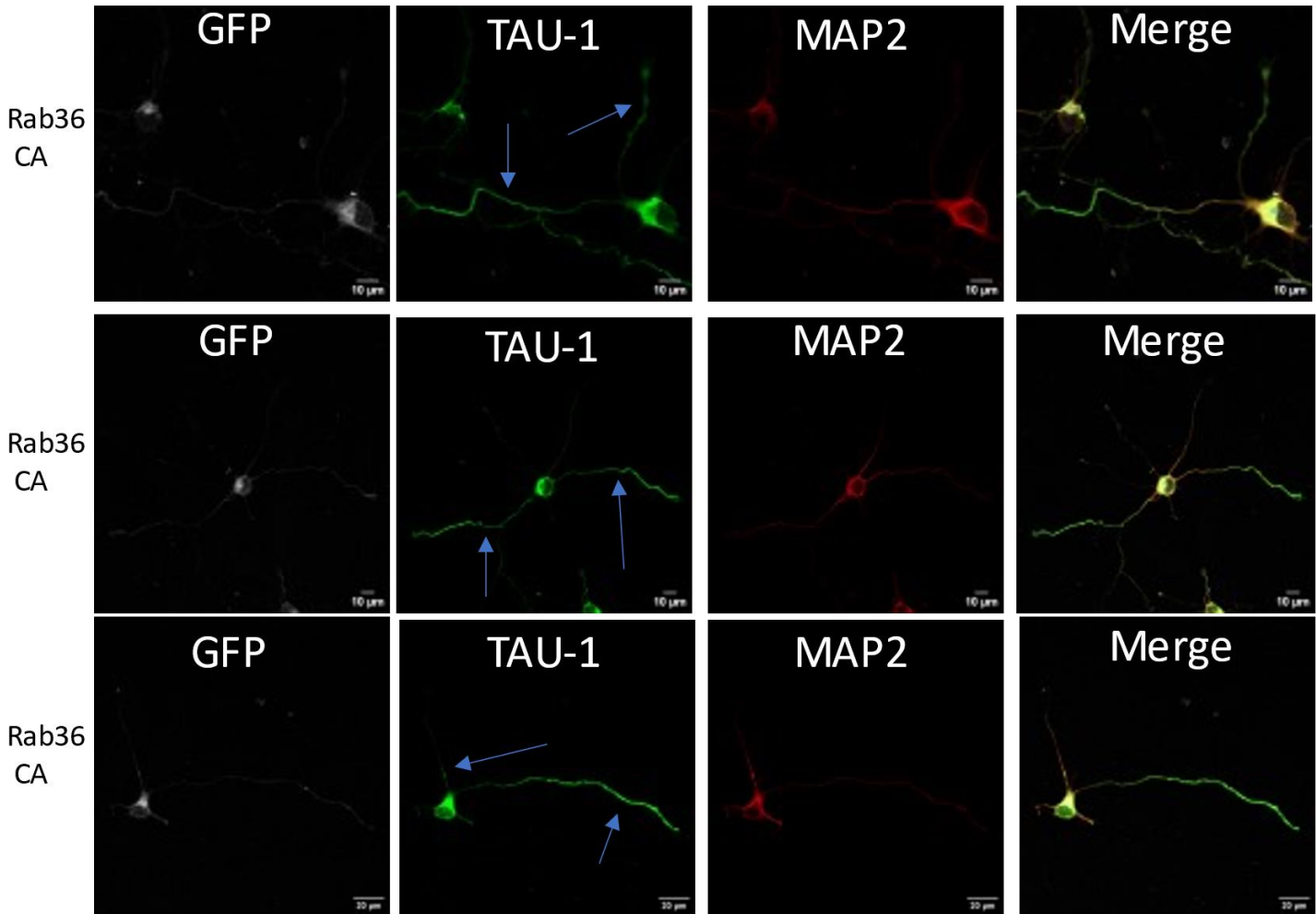


Figura 10: Análisis cualitativo de la expresión de Rab36 CA en la formación neuronas multiaxónicas: Ejemplo de neuronas hipocámpales transfectadas con el vector constitutivamente activo de Rab36, presentaron más de un axón positivos para TAU-1. Las flechas indican los axones marcados por TAU-1.

En conjunto, estos datos sugieren que la activación de Rab36 promueve la elongación axonal mientras que la inactivación de Rab36 afecta negativamente el crecimiento axonal, indicando un rol en el desarrollo neuronal temprano.

9 Discusión:

Nuestros resultados sugieren que la proteína Rab36 podría contribuir al desarrollo neuronal temprano de neuronas de hipocampo *in vitro*, aportando la evidencia de otra proteína Rab involucrada en el proceso de polarización neuronal y crecimiento axonal, que hasta el momento no había sido descrita respecto su expresión, distribución y su participación en el desarrollo neuronal temprano.

9.1 Polarización neuronal.

Las neuronas representan uno de los tipos celulares más polarizados y especializados ya que contienen dos compartimentos que son estructural y funcionalmente distintos: el compartimento somato-dendrítico y el compartimento axonal. Estos compartimentos son altamente especializados y permiten la comunicación con otras neuronas. Importantemente, la aparición de estos compartimentos ocurre temprano en el desarrollo durante la adquisición de la polaridad neuronal. Este proceso de polarización (transición entre estadio 2 y estadio 3) es esencial para la correcta formación del sistema nervioso y su correcto funcionamiento.

Se han descrito varios procesos intracelulares que promueven la polarización neuronal incluyendo el citoesqueleto celular y los procesos de tráfico de membranas (Namba et al 2015). Dentro de los integrantes que modulan el tráfico celular se encuentran las proteínas Rab GTPasas. En humanos se conocen más de 60 miembros de las proteínas Rab y están localizadas en distintas membranas intracelulares (Stenmark et al.,2009). Sin embargo, si bien se conoce gran parte de las funciones de estas proteínas en el tráfico vesicular, hay poca evidencia del rol que podrían cumplir la familia de las Rabs en el desarrollo neuronal temprano.

9.2 Las proteínas Rab y el tráfico vesicular:

La familia de proteínas Rabs son definidas como proteínas maestras reguladores del sistema endosomal. Esto significa que participan modulando el sistema vesicular en distintos niveles como los procesos de la vía endocítica, exocítica, tráfico entre compartimentos intracelulares, entre otros.

Estas proteínas tienen un funcionamiento molecular característico conocido como “switch” molecular, es decir, un ciclado entre estados de activación e inactivación que está relacionado con el intercambio entre GDP y GTP (Grosshans et al., 2006; Pfeffer et al., 2013). Este proceso de intercambio es catalizado por el factor de intercambio de guanina o conocido por la sigla en inglés (GEF) en el cual es capaz de reconocer los residuos específicos en la región de switch que facilitan la liberación del GDP (Stenmark et al., 2009). Cuando las proteínas Rabs se activan presentan mayor afinidad e interactúan específicamente con proteínas efectoras que señalizan y modulan el tráfico vesicular. La familia de proteínas Rab están asociadas a diversos compartimentos y median en varios pasos el tráfico de vesículas (Namba et al., 2022). Se ha descrito el rol de varias Rabs que participan activamente en el tráfico intracelular. Por ejemplo, Rab5, Rab4 y Rab 11 en la vía endosoma temprana (Chavrier et al., 1990). Además, Rab5 y Rab7 participan y se relacionan en la maduración de los endosomas tempranos y los endosomas tardíos (Villarroel-Campos et al, 2016; Rink et al., 2005). La GTPasa Rab7 está relacionada con la vía endosomal tardía asociándose a los lisosomas regulando también la fusión de los endosomas tardíos a los lisosomas (Bucci et al., 2000). Se ha demostrado que Rab 7 es un regulador crítico de la degradación endosómica mediando también la maduración de los endosomas tempranos a endosomas tardíos en el cual es mediado por el complejo HOPS. Pero también se ha evidenciado que Rab 7 está presente en la biogénesis de los lisosomas, fagosomas, auto fagosomas y otros lisosomas asociados a organelos (Zhang et al., 2022). En conjunto, lo anterior sugiere que una proteína Rab pueden cumplir o mediar varias funciones en la célula y participar en diferentes niveles del sistema endosomal.

9.3 Proteínas Rabs en el desarrollo neuronal.

Si bien todas las proteínas Rabs participan en diferentes etapas del tráfico vesicular, creciente evidencia muestra que algunas Rabs específicas son importantes para el desarrollo neuronal temprano. Sin embargo, aún son varias las proteínas de las cuales se desconoce su rol en el desarrollo neuronal. Por ejemplo, se ha comprobado que Rab1 está involucrado en el desarrollo neuronal y la formación de neuritas mientras Rab 4 facilita el crecimiento axonal mediante la vía de reciclaje (Akhtar et al.,2023).

9.4 Polaridad neuronal y el proceso de tráfico vesicular:

Una célula nerviosa esférica es capaz de diferenciarse en una neurona polar con compartimentos tan especializados como lo son el axón y las dendritas. Estructuras que facilitan la comunicación entre ellas.

Rab36 es una proteína GTPasa que media el transporte retrogrado de melanosomas en melanocitos (Matsui et al.,2012), y el transporte retrogrado está relacionado directamente por el complejo de dineína/dinactina, proteínas que transportan el cargo desde el axón hacia el soma de la neurona. El complejo dineína/dinactina es esencial para los eventos de tráfico en la célula como el tráfico del retículo endoplásmico hacia el Golgi y la motilidad lisosomal (Caviston et al.,2007).

RILP-L1 es conocido por el nombre de Proteína lisosomal que interactúa con Rab. Se ha evidenciado que RILP-L1 es un efector de Rab36 y Rab 34 (Matsui et al.,2012). Las RAB que se unen a proteínas efectoras para dirigir procesos de tráfico, incluida la unión de membranas, la fusión y el movimiento mediados por motores moleculares (Reck-Peterson et al.,2018). Pero este efector no estaría afectando el tráfico de lisosomas (Schaub et al.,2013).

A pesar de eso, nuestros resultados sugieren que cuando se sobre expresa la proteína Rab36 DN (dominante negativa) (Figura. 9-B) el desarrollo del axón se ve comprometido. Esto puede estar relacionado con los eventos de tráfico que están mediados por el efector. Ya que al no activarse Rab36, RILP-L1 no se estaría uniendo al complejo dineína/dinactina afectando así el tráfico retrogrado. Por lo que se sugiere que Rab36 estaría modulando el transporte y así contribuyendo al desarrollo del axón. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis se deberían realizar ensayos de pérdida y ganancia de función de RILP-L1, observando si en presencia de una Rab 36 activada (CA) y RILP-L1 DN hay efectos en la polaridad neuronal. Esto nos ayudaría entender con mayor detalle el rol del efector de RILP-L1 durante la polaridad.

9.5 Posible participación de Rab36 en un mecanismo de activación:

Se ha logrado describir los mecanismos regulatorios de Rab asociados a una cascada de GEF, en el cual una Rab puede modular la activación de otra Rab generando un efecto “dominó” (Yamasaki et al., 2013). De igual forma, se ha evidenciado que Rab8, Rab13 y Rab36 funcionan río debajo de Rab35 y MICAL-L1 como mediadores para el crecimiento de neuritas (Kobayashi et al., 2014). Por lo que una de las cosas que podría estar pasando es que Rab35 podría estar modulando la activación de Rab36 y posteriormente cuando Rab 36 se activa, RILP-L1 se une a la forma activa de Rab36 generando efectos en la polaridad neuronal. Como se ha logrado ver en nuestros resultados, las proteínas Rab modulan la morfología en neuronas de cultivo primario (Figura 9-B)

Sugiriendo que las proteínas Rab modulan en varios niveles el desarrollo temprano de la neurona.

10 Conclusión:

10.1 Objetivo 1:

Los ensayos de inmunodetección indican que la GTPasa pequeña Rab36 se expresa y se distribuyen en los compartimentos somato-dendríticos y axonal de neuronas en cultivo durante las etapas en que ocurre la adquisición de la polaridad neuronal.

De forma similar, los ensayos de inmunodetección indican que la proteína RILP-L1, una proteína efectora de Rab36, se expresa y se distribuye en todos los compartimentos neuronales durante la adquisición de la polarización neuronal.

10.2 Objetivo 2

La expresión de las versiones mutantes de Rab36 (CA y DN) alteran la morfología celular en la línea COS-7.

A pesar de que fueron detectados en los compartimentos somato-dendríticos y axonal, la expresión de Rab36 CA y Rab36 DN presentan un patrón diferencial de distribución en función de su estado de activación en neuronas polarizadas.

La expresión de las mutantes de Rab35 CA promueven el crecimiento axonal mientras que las mutantes DN de Rab36 redujeron la extensión axonal, sugiriendo que Rab36 contribuye al proceso de elongación axonal durante el desarrollo neuronal temprano.

11 Bibliografía:

1. Akhtar, S. N., Bunner, W. P., Brennan, E., Lu, Q., & Szatmari, E. M. (2023). Crosstalk between the Rho and Rab family of small GTPases in neurodegenerative disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, Article 1084769. [10.3389/fncel.2023.1084769](https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1084769)
2. Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., & van Deurs, B. (2000). Rab7: A Key to Lysosome Biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 11(2), 467–480. doi: 10.1091/mbc.11.2.467. PMID: 10679007. PMCID: PMC14786.
3. Banker, G. (2018). The Development of Neuronal Polarity: A Retrospective View. *Journal of Neuroscience*, 38(8), 1867-1873. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1372-16.2018>
4. Chen, L., Hu, J., Yun, Y., & Wang, T. (2010). Rab36 regulates the spatial distribution of late endosomes and lysosomes through a similar mechanism to Rab34. *Molecular Membrane Biology*, 27(1), 23-30. doi: 10.3109/09687680903417470. PMID: 19961360
5. Caviston, J. P., Ross, J. L., Antony, S. M., & Holzbaur, E. L. F. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10045-10050. [10.1073/pnas.0610628104](https://doi.org/10.1073/pnas.0610628104)
6. Cui, L., Li, H., Xi, Y., Hu, Q., Liu, H., Fan, J., Xiang, Y., Zhang, X., Shui, W., & Lai, Y. (2022). Vesicle trafficking and vesicle fusion: mechanisms, biological functions, and their implications for potential disease therapy. *Molecular Biomedicine*, 3, 29. Doi:10.1186/s43556-022-00090-3
7. Dotti, C. G. C., Sullivan, A., & Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *Journal of Neuroscience*, 8(4), 1454-1468. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.08-04-01454.1988.

8. Funahashi, Y., Watanabe, T., & Kaibuchi, K. (2020). Advances in defining signaling networks for the establishment of neuronal polarity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(8), 1571–1586. [10.1016/j.ceb.2019.12.009](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.009)
9. Grosshans, B. L., Ortiz, D., & Novick, P. (2006). Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 11821-11827. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601617103>
10. Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiological Reviews*, 91(1), 119-149. doi: [10.1152/physrev.00059.2009](https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009)
11. Hou, L., Wang, L., Zhao, Z., Xu, W., Wang, Y., & Cui, G. (2022, February 15). Regulation of dendrite growth by Cdc42 effector protein-4 in hippocampal neurons in vitro. *Medical Molecular Research*,. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12644>
12. Horton, A. C., & Ehlers, M. D. (2003). Neuronal polarity and trafficking. *Neuron*, 40(2), 277-295. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00629-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00629-9)
13. Khobrekhar, N. V., Quintremil, S., Dantas, T. J., Valle, R. B. (2020). The dynein adaptor RILP controls neuronal autophagosome biogenesis, transport, and clearance. *Developmental Cell*. *CellPress*. [10.1016/j.devcel.2020.03.011](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.03.011)
14. Khobrekhar, N. V., & Vallee, R. B. (2020). A RILP-regulated pathway coordinating autophagosome biogenesis with transport. *Autophagy*, 16(8), 1537–1538. doi: [10.1080/15548627.2020.1778294](https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1778294). PMID: 32597306. PMCID: PMC7469469.
15. Kobayashi, H., Etoh, K., Ohbayashi, N., & Fukuda, M. (2014). Rab35 promotes the recruitment of Rab8, Rab13 and Rab36 to recycling endosomes through MICAL-L1 during neurite outgrowth. *Biology Open*, 3(9), 803–814. doi.org/10.1242/bio.20148771
16. Lovinger, D. M. (2008). Communication Networks in the Brain: Neurons, Receptors, Neurotransmitters, and Alcohol. *Alcohol Research & Health*, 31(3), 196–214. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3860493/>

17. Maruta, Y., & Fukuda, M. (2022). Large Rab GTPase Rab44 regulates microtubule-dependent retrograde melanosome transport in melanocytes. *Journal of Biological Chemistry*. Open Access. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102508
18. Matsui, T., O.N., & Fukuda, M. (2012). The Rab interacting lysosomal protein (RILP) homology domain functions as a novel effector domain for small GTPase Rab36: Rab36 regulates retrograde melanosome transport in melanocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(34), 28619-31. doi: 10.1074/jbc.M112.370544. PMID: 22740695; PMCID: PMC3436592.
19. Mori, Y., Matsui, T., Furutani, Y., Yoshihara, Y., & Fukuda, M. (2012). Small GTPase Rab17 regulates dendritic morphogenesis and postsynaptic development of hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 8963-8973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314385>
20. Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., & Novick, P. (2013). GTPase networks in membrane traffic. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 429-456. doi:10.1146/annurev-biochem-052810-093700
21. Namba, T., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Xu, C., Takano, T., & Kaibuchi, K. (2015). Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity. *Physiological Reviews*, 95(3), 995-1024. doi: 10.1152/physrev.00025.2014.
22. Pfeffer, S. R. (2013). Rab GTPase regulation of membrane identity. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(4), 414-419. doi: 10.1016/j.ceb.2013.04.002. PMID: 23639309. PMCID: PMC3729790.
23. Pfeffer, S. R., Dirac-Svejstrup, A. B., & Soldati, T. (1995). Rab GDP Dissociation Inhibitor: Putting Rab GTPases in the Right Place. *Journal of Biological Chemistry*, 270(29), 17057-17059. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17057>

24. Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122(5), 735-749.
25. Rozés-Salvador, V., González-Billault, C., & Conde, C. (2020). The Recycling Endosome in Nerve Cell Development: One Rab to Rule Them All? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 603794. [10.3389/fcell.2020.603794](https://doi.org/10.3389/fcell.2020.603794)
26. Reck-Peterson, S. L., Redwine, W. B., Vale, R. D., & Carter, A. P. (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 382–398. doi: [10.1038/s41580-018-0004-3](https://doi.org/10.1038/s41580-018-0004-3)
27. Rivera-Molina, F. E., & Novick, P. J. (2009). A Rab GAP cascade defines the boundary between two Rab GTPases on the secretory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14408-14413. Doi:10.1073/pnas.0906536106
28. Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 513–525. Published: 15 July 2009. doi: 10.1038/nrm2728.
29. Song, S., Cong, W., Shurong, Z., Shi, Y., Dai, W., Zhang, H., Wang, X., He, B., Zhang, Q. (2018). Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14. doi: [10.1016/j.ajps.2018.06.004](https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.06.004)
30. Schaub, J. R., & Stearns, T. (2013). The Rilp-like proteins Rilpl1 and Rilpl2 regulate ciliary membrane content. *Molecular Biology of the Cell*, 24(4), 453–464. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-08-0598>
31. Urrutia, P. J., Bodaleo, F., Bórquez, D. A., Homma, Y., Rozes-Salvador, V., Villablanca, C., Conde, C., Fukuda, M., & González-Billault, C. (2021). Tuba activates Cdc42 during neuronal polarization downstream of the small GTPase Rab8a. *Journal of Neuroscience*, 41(8), 1636-1649. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0633-20.2020>

32. Veleri, S., Punnakkal, P., Dunbar, G. L., & Maiti, P. (2018). Molecular Insights into the Roles of Rab Proteins in Intracellular Dynamics and Neurodegenerative Diseases. *Neuromolecular Medicine*, 20(1), 18-36. doi: 10.1007/s12017-018-8479-9. PMID: 29423895.
33. Villarroel, D., Henriquez, D. R., Bodaleo, F. J., Oguchi, M. E., Bronfman, F. C., Fukuda, M., & Billault, C. G. (2016). Rab35 function in axon elongation is regulated by P53-related protein kinase in a mechanism that involves Rab35 protein degradation and the microtubule-associated protein 1B. *The Journal of Neuroscience*, 36(27), 7298-7313.
34. Villarroel-Campos, D., Bronfman, F. C., & Billault, C. G. (2016). Rab GTPase signaling in neurite outgrowth and axon specification. *Cytoskeleton*, Month (00), 00–00. doi: 10.1002/cm.21303.
35. Wang, J., Fourriere, L., & Gleeson, P. A. (2020). Local Secretory Trafficking Pathways in Neurons and the Role of Dendritic Golgi Outposts in Different Cell Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, Article597391. doi:10.3389/fnmol.2020.597391
36. Yogev, S. (2014). Cellular and Molecular Mechanisms of Synaptic Specificity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 417-437. 10.1146/annurev-cellbio-100913-012953
37. Zhang, J., Jiang, Z., & Shia, A. (2022). Rab GTPases: The principal players in crafting the regulatory landscape of endosomal trafficking. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 4464–4472. Doi:10.1016/j.csbj.2022.08.016