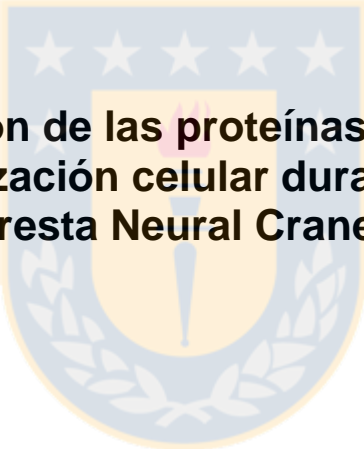




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magíster en Bioquímica y
Bioinformática



**Estudio de la función de las proteínas G α 2 y Ric-8A en la
morfología y polarización celular durante la migración de
células de la Cresta Neural Craneal en *Xenopus***

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

SORAYA CONSTANZA VILLASECA HERRERA
CONCEPCIÓN-CHILE
2017

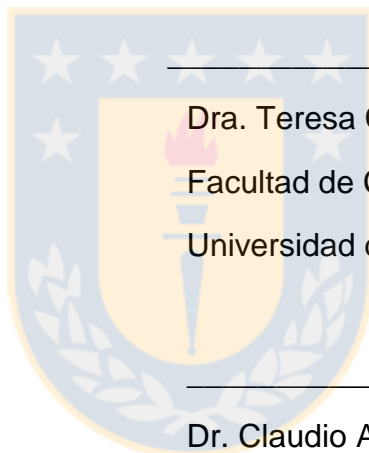
Profesor Guía: Marcela Torrejón Quezada
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

Dra. Marcela Torrejón Quezada
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Claudio Araya García
Instituto de Ciencias Marinas
Universidad Austral de Chile

Director de Programa:

Dra. Violeta Morín
Facultad de Ciencias Biológicas

Tabla de Contenido

Lista de Figuras	iv
Abreviaturas	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
Introducción	1
1. Cresta Neural (CN)	1
1.1. Formación de la CN.....	2
1.2. Migración colectiva de las células de CN: Polarización, Direccionalidad y Quimiotaxia	3
1.3. Remodelación del citoesqueleto de actina y tubulina durante la migración celular	8
1.4. Adhesión focal mediada por Integrina	9
2. Proteína G heterotrimérica	12
2.1. Proteína G durante la migración celular	13
2.2. Resistencia a Inhibidores de Colinesterasa 8 (Ric-8)	14
2.3. Función Gai y Ric-8A.....	14
Hipótesis	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
Materiales	18
Métodos	20
1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas.....	20
1.1. Obtención de embriones de <i>Xenopus tropicalis</i>	20
1.2. Microinyección de embriones	21

1.3. Fijación de embriones.....	22
1.4. Hibridación <i>in situ</i>	22
1.5. Explantes de Crestas Neurales Craneales	24
1.6. Ensayos de inmunodetección por microscopía de fluorescencia.....	24
1.7. Ensayos de “ <i>time-lapse</i> ”	25
1.8. Estudio de la polaridad celular.....	26
2. Técnicas de Biología Molecular	27
2.1. Construcción de plásmido pCS2+XtGai2V5	27
2.2. Purificación de plásmidos a gran escala.....	30
2.3. Síntesis de sonda y ARN mensajero <i>in vitro</i>	31
2.4. Lisis de embriones.....	32
2.5. Detección de proteínas.....	32
2.6. Co-inmunoprecipitación.....	34
2.7. Transfección de células HEK 293T para expresión transiente de Gai2-V5.....	34
2.8. Ensayo de estimulación con quinpirol.....	35
Resultados	36
Objetivo 1: Determinar si Gai2 regula junto con Ric-8A la migración de células de la Cresta Neural Craneal durante el desarrollo embrionario de <i>Xenopus tropicalis</i>	36
Objetivo 2: Estudiar la localización de Gai2 en las células de la CNC de <i>Xenopus tropicalis</i> y su interacción con Ric-8A	43
Objetivo 3: Analizar la función de Ric-8A y Gai2 en la morfología y polaridad celular durante la migración de las células de CNC.....	48
Discusión	61

I) Gai2 y Ric-8A regulan la migración de las células de CNC61

II) Gai2 y Ric-8A regulan las propiedades de adhesión de las células migratorias64

III) Gai2 y Ric-8A regulan la morfología y polaridad celular durante la migración colectiva67

IV) Modelo Final71

Conclusiones.....73

Agradecimientos74

Referencias75

Anexos89



Lista de Figuras

Figura I. Formación de la Cresta Neural	7
Figura II. CIL, CoA y quimiotaxia: las fuerzas que controlan la migración direccionada.....	11
Figura III. Patrón de expresión de Ric-8A y Gai2 en estadios de néurula durante el desarrollo embrionario de <i>Xenopus tropicalis</i>	16
Figura 1. Construcción del plásmido pCS2+Gai2V5	37
Figura 2. Ensayo de epistasis empleando la subunidad Gai2 en embriones morfantes para Ric-8A	39
Figura 3. Ensayo de pérdida de función de Gai2 durante la migración in vivo de las células de CNC de <i>Xenopus</i>	40
Figura 4. Efecto de la sobreexpresión de Gai2 durante la migración in vivo de las células de CNC de <i>Xenopus</i>	42
Figura 5. Estudio del efecto de la pérdida de función de Gai2 sobre la migración in vitro de las células de CNC de <i>Xenopus</i>	44
Figura 6. Localización subcelular de Gai2 y Ric-8A en explantes de células de CNC y su interacción.....	46
Figura 7. Localización subcelular de Gai2 y Ric-8A en explantes de células de CNC morfantes para Ric-8A.....	47
Figura 8. Cambios en la estructura del citoesqueleto de tubulina en células morfantes para Gai2 y Ric-8A	50
Figura 9. Estudio de los cambios en la estructura del citoesqueleto de actina y en el largo de las protrusiones en células morfantes para Gai2 y Ric-8A	51

Figura 10. Estudio de la expresión de cadherinas en explantes controles y morfantos para Gai2 en estadios pre-migratorios y migratorios de CNC	54
Figura 11. Análisis del efecto de la pérdida de función de Gai2 y Ric-8A en la formación de las adhesiones focales	55
Figura 12. Expresión de Rac1 activa en células de CNC controles durante CIL..	58
Figura 13. Expresión de Rac1 activa en células de CNC morfantos para Gai2 durante CIL.....	59
Figura 14. Localización de Par3 en células de la CNC controles y morfantos para Gai2.....	60
Figura 15. Modelo Final.....	72
Anexo I.....	89



Abreviaturas

ADN, Ácido Desoxirribonucleico
ARN, Ácido Ribonucleico
ARNm, Ácido Ribonucleico mensajero
BMP, Proteínas Morfogenéticas de Hueso
BSA, Albúmina de Suero Bovino
CIL, Inhibición de la Locomoción por Contacto
CN, Crestas Neurales
CNC, Crestas Neurales Craneales
Co-IP, Co-inmunoprecipitación
CoA, Co-Atracción
DFA, “Danilchik's for Amy”
FAK, Quinasa de Adhesión Focal
FGF, Factor de Crecimiento de Fibroblastos
GAP, Proteína Activadora de actividad GTPasa
GDI, Inhibidores de Disociación de nucleótidos de guanina
GEF, Factor Intercambiador de nucleótidos de Guanina
GPCR, Receptores Acoplados a Proteína G
HCG, Gonadotrofina Coriónica Humana
Hif-1, Factor de Transcripción 1 inducible por Hipoxia
LB, “Luria-Bertani”
LiCl, Cloruro de Litio
LPA, “Lysophosphatidic acid”
MAB, Acido Maleico Buffereado
MEF, Fibroblastos de Embriones de Ratón
MO, Morfolino
MR, “Modified Ringer’s solution”
NAM, Medio normal de anfibio
Par3, Proteína Partición defectiva 3
PBS, Fosfato salino buffereado
PCP, Polaridad Celular Planar

PI3K, "Phosphoinositide 3-kinase"

PLC, "Phospholipase C"

RLC, "Regulatory Light Chain"

ROCK, Quinasa asociada a Rho

Sdf1, Factor derivado de estroma 1 (también llamado CXCL12)

SDS, Sodio Dodecyl Sulfato

SDS-PAGE, Sodio Dodecyl Sulfato Electroforesis en gel de poliacrilamida

SSC, Citrato Sodio Salino

TAE, Tris base, Ácido acético y EDTA

TBS, Tris Salino Buffereado



Resumen

La cresta neural (NC) es una población de células embrionarias transitoria inducida en el borde de la placa neural que migra extensivamente para diferenciarse en otros tejidos durante el desarrollo. Se ha demostrado que Ric-8A, un GEF para la subunidad $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica estaría regulando la migración de las células de Cresta Neural Craneal (CNC) en *Xenopus*. Por otro lado también se ha descrito que la proteína G heterotrimérica, a través de su subunidad $G\alpha$, estaría participando en procesos de migración en varios tipos celulares, pero sería específicamente la subunidad $G\alpha i2$ la que estaría controlando la distribución y quimiotaxia en distintos tipos celulares derivados del sistema inmune. Es por esta razón que en esta tesis se estudió la relación entre $G\alpha i2$ y Ric-8A en el mecanismo que controla la migración de las células de CNC.

Para ello se evaluó el efecto de la pérdida y ganancia de función de $G\alpha i2$ y el rescate del fenotipo morfante para Ric-8A sobre la migración de las células de CNC *in vivo* e *in vitro*, donde se encontró que ambas proteínas estarían participando en la misma vía de señalización. Por otro lado también se encontró que Ric-8A y $G\alpha i2$ estarían colocalizando en el borde director de las células migratorias y además se encontrarían interaccionando o al menos formando parte de un complejo de interacción. Asimismo, las células morfantes para Ric-8A y $G\alpha i2$ presentaron cambios en la morfología celular, principalmente a nivel de la distribución del citoesqueleto de actina, la longitud de las protrusiones, y tubulina. Las células morfantes para Ric-8A presentaron además problemas a nivel de las adhesiones focales, siendo estas de menor número y área. Por otro lado las células morfantes para $G\alpha i2$ presentaron adhesiones focales de mayor longitud, en comparación a las células controles, además de defectos en la polaridad celular colectiva mediada por Rac1 y Par3. Estos resultados sugieren que Ric-8A, a través de la vía $G\alpha i2$, estaría controlando la migración de las células de CNC a través de la organización polarizada del citoesqueleto y dinámica de adhesiones focales.

Abstract

The neural crest (NC) is a transient embryonic cell population induced at the border of the neural plate that migrates extensively in order to differentiate in other tissues during development. Ric-8A, a GEF for G α subunits of heterotrimeric G protein has been shown to be involved during cranial NC cells migration in *Xenopus*. On the other hand, the heterotrimeric G protein through its G α subunit has been found participating in migration processes in several cell types and Gai2 specifically has been described controlling the distribution and chemotaxis of immune cells. Therefore, in this thesis we aim to study the relationship between Gai2 and Ric-8A on the mechanism that controls the migration of cranial NC cells.

We evaluated the effect of loss and gain function of Gai2 and the rescue of Ric-8A morphant phenotype over cranial NC cells migration in *Xenopus*, demonstrated that Ric-8A acts upstream of Gai2 to control cranial neural crest cells migration. On the other hand, we had found that Ric-8A and Gai2 are colocalizing at the leading edge of migratory cells and both proteins are interacting. Also, the Ric-8A and Gai2 morphant cells show changes on cell morphology due to changes on the actin cytoskeleton, specifically on the protrusions length and tubulin cytoskeleton. Ric-8A morphant cells show less number of focal adhesion and these adhesions are shorter than control cells. However, Gai2 morphant cells show longer focal adhesions than control cells and collective cell polarity defects through Rac1 and Par3. We suggest that Ric-8A through Gai2 could be controlling adhesion dynamic and microtubules organization of cranial NC cells to regulate directional migration.

Introducción

La migración celular es un proceso fundamental en el desarrollo y mantenimiento de organismos pluricelulares. La respuesta inmune, la cicatrización y reparación de tejidos, el proceso de hematopoyesis y la formación de capas germinales durante el desarrollo embrionario, requieren de movimientos celulares sincronizados hacia lugares específicos [Mitchison y col., 1996]. La migración celular **colectiva** tiene un papel clave durante la morfogénesis y la renovación de tejidos en el adulto, y está involucrada directamente en la propagación del cáncer [Weijer y col., 2009; Friedl y col., 2009]. Además de mostrar un comportamiento migratorio coordinado, las células se mueven más eficientemente que si migraran por separado, lo que indica que se producen interacciones entre el grupo celular y a su vez con señales de su entorno, las cuales favorecen el movimiento coordinado. Estos mecanismos se basan tanto en interacciones físicas directas que coordinan la respuesta celular, como en el comportamiento colectivo de las células que genera un ambiente óptimo para que la migración dirigida sea eficiente [Wang y col., 2014; Mayor y col., 2016]. Además, estudios recientes han descrito cómo las células líderes en los grupos celulares son las encargadas de impulsar la migración y cómo las comunicaciones entre las células “seguidoras” y “líderes” ayuda a que el movimiento colectivo sea más eficiente [Mayor y col., 2016].

Un modelo de estudio por excelencia para entender el fenómeno de migración celular colectiva lo constituye la Cresta Neural (CN), la cual es una estructura discreta formada en estadios tempranos del desarrollo embrionario y es característica de organismos vertebrados [Gilbert, 2006].

1. Cresta Neural (CN)

La cresta neural (CN) es una estructura embrionaria transitoria, inducida por diversas señales químicas en los bordes laterales de la placa neural, entre el neuroectodermo y el ectodermo no neural. Es capaz de dar origen a varios tipos celulares, como neuronas y células gliales en el sistema nervioso periférico, el tejido conectivo de estructuras cráneo-faciales, células pigmentadas de la piel,

tejido muscular liso, cartílago y hueso [Steventon y col., 2009; LeDouarin y Kalcheim, 1999; Fuentealba J., 2012].

Las células de la CN se originan en la zona más dorsal del tubo neural (Fig. IA), donde una vez iniciado el cierre del tubo neural, éstas sufren una transición epitelio-mesénquima (TEM) para luego migrar extensamente (Fig. IB) y diferenciarse en los distintos tejidos, nombrados anteriormente [Mayor y col., 2014]. Estudios sugieren que este destino final de diferenciación de las células de la CN se determina luego de iniciada la migración [Basch y col., 2004]. Para dar origen a este tejido deben ocurrir procesos de inducción, especificación, polarización y posteriormente de migración, lo que implica la activación de varias señales moleculares y sus respectivas vías de señalización [Steventon y col., 2009]. Es así como las células de la CN pueden ser divididas en 4 tipos principales (debido a su localización dentro del eje neuro-axial): las **CNs craneales (CNC)**, las CNs cardíacas, las CNs troncales, y las CNs sacral-vagales [Gilbert, 2013; Theveneau y col., 2012]. En esta tesis sólo se estudiaron las células de CNC, las cuales migran para dar origen principalmente al esqueleto cráneo-facial del embrión y otros tipos celulares como neuronas craneales, glía, células pigmentadas y tejido conectivo [Hall, 2008].

1.1. Formación de la CN

La inducción de la CN se puede definir como el proceso por el cual las células del ectodermo reciben una señal de especificación para convertirse en células precursoras de la CN. Principalmente ocurre durante la gastrulación temprana, en el borde de la placa neural (ectodermo neural) y el ectodermo no-neural o epidermis [Hall, B. K., 2008]. Estudios realizados en pollo, pez cebra y *Xenopus* han identificado algunas de las señales moleculares que participan en el proceso de inducción de la CN: entre ellas se encuentra la señalización vía BMPs y otras señales de posteriorización del tubo neural como Wnt, Notch, FGF y ácido retinoico [LaBonne y Bronner-Fraser, 2000; Steventon y col., 2005]. Por otro lado, estas mismas moléculas participan en el proceso de especificación de la CN, regulando la expresión de **genes especificadores del borde de la placa neural**

como *Zic1*, *Msx1*, *Pax3*, entre otros [Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008]. Estos genes son capaces de otorgar a las células de esta región la capacidad de recibir señales apropiadas que determinarán su destino en la formación de la CN. Al mismo tiempo, éstos controlan un segundo grupo de genes **especificadores de la CN**, los cuales se expresan en etapas tempranas de inducción y también en algunas etapas migratorias (*FoxD3*, *Sox9*, *Sox10*, *Snail*, *Snail2* y *Twist*) [Steventon y col., 2009], por lo que fueron usadas en esta tesis como marcadores específicos de CN.

1.2. Migración colectiva de las células de CN: Polarización, Direccionalidad y Quimiotaxia

Para que las células de la CN adquieran la capacidad de migrar, en primer lugar éstas deben sufrir un proceso denominado Transición Epitelio-Mesénquima (TEM). Esto ocurre en la zona más dorsal del tubo neural, donde las futuras CNs cambian su patrón de expresión génica y fenotipo para adquirir las características necesarias para la migración [Kuriyama y col., 2008]. En primer lugar, las células de la CN sufren el proceso de “delaminación”, separándose así del neuroepitelio para posteriormente migrar (en *Xenopus*, las células de CNC llevan a cabo este proceso de una sola vez como un tejido cohesivo) [Alfandari y col., 2010]. Por otro lado, las moléculas de adhesión celular juegan un papel fundamental durante la TEM en la CNC. En primer lugar durante la inducción neural, las células deben cambiar su tipo de conexión celular mediada por cadherinas: de E-cadherina a N-cadherina, esta última se expresa durante la migración colectiva temprana de las CNC en *Xenopus* [Nandadasa y col., 2009; Theveneau y col. 2010]. Es así como se rompen las adhesiones epiteliales, se expresa N-cadherina y se pierde la polaridad ápico-basal, lo que es fundamental para la correcta migración de las células de la CN [Scarpa y col., 2015]. Una vez delaminadas, las células de CNC específicamente migran en sentido dorso-lateral, separándose en pequeños grupos, y lo hacen a través de tres rutas o “corrientes” migratorias previamente caracterizadas: mandibular, hioidea y branquial [Gilbert, 2006; Le Douarin y Kalcheim, 1999]. Sin embargo para que las células de CNC puedan migrar

eficientemente a través de estas tres corrientes, necesitan tanto señales intracelulares como extracelulares [Gilbert, 2006; Kuriyama y col., 2008]. Con respecto a la señalización intracelular, las células de CN expresan proteínas que son capaces de recibir señales del medio extracelular (como por ejemplo de la matriz) y señales de otras células para así migrar de forma colectiva (Fig. IIA). Existen al menos dos mecanismos claves para la migración celular colectiva de estas células: La inhibición de la locomoción por contacto (CIL) y la Co-Atracción (CoA) [Carmona-Fontaine y col 2008; Scarpa y col., 2015].

El proceso de inhibición de la locomoción por contacto (CIL) es el principal mecanismo celular y molecular propuesto para promover la migración colectiva, por el cual las células de la CNC migran en ausencia de señales externas. A nivel celular, este proceso consiste en el colapso dinámico de las protrusiones y la posterior repolarización, después del contacto con otra célula mediante colisiones, restringiendo así las protrusiones y otorgándole la polaridad antero-posterior durante la migración (Fig. IIB) [Mayor y col., 2010; Theveneau y col., 2011]. Se ha descrito que serían fundamentalmente los componentes de la polaridad celular planar (PCP, "Planar Cell Polarity"), como Frizzled-7 (Fz-7) y Dishevelled (Dsh), factores claves para el mecanismo de CIL en la migración de la CNC [Carmona-Fontaine y col., 2008]. Asimismo se ha observado que la migración es altamente dependiente de las uniones de N-cadherinas entre las células, al menos en etapas migratorias tempranas [Theveneau y col., 2010]. Por otro lado, también se ha demostrado que la vía Wnt no canónica estaría actuando sobre la proteína Rho presente en el borde posterior de las células migratorias, causando una inhibición de las protrusiones por inactivación de la proteína Rac1, ambas proteínas G pequeñas participantes en la remodelación del citoesqueleto [Carmona-Fontaine y col., 2008]. Esto permite que las células que se encuentran en el borde (las células líderes) exhiban movimientos migratorios hacia afuera del grupo, lo que promueve la migración de forma radial en ausencia de señales quimiotácticas, y la migración direccionada en presencia de estas señales [Carmona-Fontaine y col. 2008; Mayor y col., 2013; Mayor y

col., 2016]. Existe un mecanismo adicional que permite la migración celular de forma colectiva, lo que caracteriza a las células de la CNC; esto es la Co-atracción o atracción mutua, “CoA” (Fig. IIB). Las células, si bien son capaces de alejarse del grupo (mediante CIL), vuelven a él debido a que secretan una molécula quimioatrayente denominada factor del complemento C3a. A su vez expresan el receptor C3aR, el cual se encuentra acoplado a proteína G heterotrimérica y permite que la célula se repolarize [Carmona-Fontaine y col., 2011]. Es así como fuerzas totalmente opuestas, CoA y CIL, permiten mantener el sistema en constante equilibrio entre la atracción y la repulsión, lo que facilita la migración colectiva [Theveneau y col., 2012]. Cuando este mecanismo es bloqueado, interrumpe los movimientos coordinados y colectivos de estas células, perdiendo la capacidad de responder eficientemente a las señales extracelulares [Carmona-Fontaine y col., 2011].

Por otro lado, las señales extracelulares que permiten la migración de las células de la CN consisten en señales positivas (atractantes) y negativas (repulsivas) que están presentes en rutas migratorias pre-establecidas. Las señales negativas para las células de la CNC son capaces de controlar la migración de éstas, y a nivel sub-celular actúan induciendo el colapso de sus protrusiones celulares, lo que restringe su entrada en zonas específicas del embrión y así actúan como señales inhibitorias para la migración, como las *efrinas Eph*, *neuropilinas/plexinas*, *versican*, etc. [Kuriyama y col., 2008; Theveneau y col., 2011; Szabó y col., 2016]. Los reguladores positivos de la migración, en cambio, se consideran como factores permisivos ya que promueven la motilidad grupal e individual. Los componentes de la matriz extracelular y quimioatrayentes son los encargados de conducir las células de la CN hacia lugares específicos. Para migrar a través de las corrientes migratorias pre-establecidas (CNC: mandibular, hioide y branquial), las células de la CNC deben ser atraídas por señales quimioatrayentes. Estas células, por lo tanto, se encuentran polarizadas y responden a gradientes de **Sdf1** (Factor derivado del estroma 1), ya que expresan el receptor **Cxcr4** (Receptor acoplado a proteína G heterotrimérica). Particularmente en *Xenopus*, la señalización del par quimiotáctico Sdf1/Cxcr4 es esencial para la migración de

este tipo celular y fuentes locales de Sdf1 son suficientes para atraer a las células de la cresta neural *in vivo* e *in vitro* [Theveneau y col., 2010]. Este péptido es secretado por las Placodas (Fig. IIC), las cuales constituyen un tejido de origen epitelial (ectodermo no neural) adyacente a la CN. Esto permite la migración direccionada y colectiva de las células de la CN y a su vez de las mismas placodas, a través del fenómeno denominado como “*Chase and run*” (Fig. IIC) [Szabó y col., 2015; Theveneau y col., 2013].



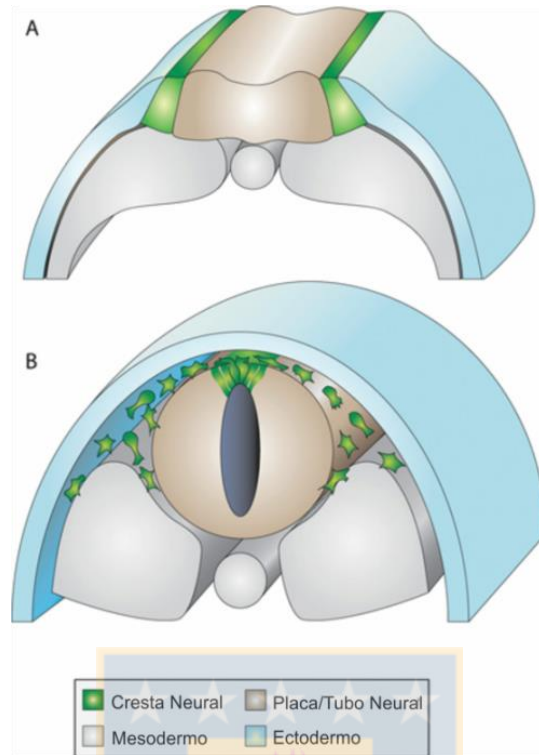


Figura I. Formación de la Cresta Neural

(A) Diagrama que muestra una sección transversal de un embrión de vertebrados en etapa de neurula. Células de la cresta neural (en verde) se inducen en los bordes de la placa neural, entre el neuroectodermo (marrón) y el ectodermo no neural (azul). **(B)** La placa neural se pliega formando el tubo neural, quedando los precursores de la cresta neural situados en su región dorsal. Las células de la cresta neural luego sufren una transición epitelio-mesénquima y dejan el tubo neural para migrar por todo el embrión [Fuente: Mayor y col., 2014].

1.3. Remodelación del citoesqueleto de actina y tubulina durante la migración celular

Para que las células puedan migrar de forma direccionada dentro del embrión deben estar polarizadas. A nivel celular, esto comprende el establecimiento de un borde director que formará protrusiones localizadas hacia su destino, con una reorganización del citoesqueleto de forma laminal para la formación de lamelipodios, o digitiformes para la formación de filopodios [Jaffe y col., 2005]. Este proceso es ejecutado gracias a reguladores claves que pertenecen a la familia Rho de las proteínas G pequeñas, dentro de las cuales se encuentra Rac1, RhoA y Cdc42. Esta última es la GTPasa que inicialmente responde a la señal de polarización de la célula, ya que es necesaria para la regulación de la dinámica de microtúbulos a través del complejo Par3/Par6/aPKC, de la correcta orientación de los microtúbulos hacia la dirección de la migración y del posicionamiento del centrosoma y golgi frente al núcleo, además del transporte de diferentes cargos hacia el borde director (Fig. IIA, células líderes). Por lo tanto, Cdc42 es considerado un regulador maestro de la polaridad a través de su papel en el control de la protrusión en el borde director, el posicionamiento nuclear y la organización de microtúbulos en respuesta a las señales móviles [Etienne-Manneville y col., 2003; Ridley y col., 2003].

Por otro lado, se ha descrito que Par3 (proteína que es parte del complejo Par3/Par6/aPKC) regula la inhibición de la locomoción por contacto durante la migración de las células de la CN a través del proceso conocido como “catástrofe de microtúbulos” (que consiste en la inestabilidad dinámica producto de la despolimerización de los microtúbulos), por lo tanto participa en establecer la polaridad celular durante la migración colectiva [Moore y col., 2013].

La proteína G pequeña Cdc42 también es capaz de activar la GTPasa Rac1 (la cual se encuentra activa en el borde director, Fig. IIB). Esta proteína Rac1 se relaciona principalmente con la remodelación del citoesqueleto de actina y formación de lamelipodias en el borde director, además de regular de forma

adicional el reclutamiento de moléculas de adhesión y receptores quimiotácticos en el borde director de la célula [Nobes y col., 1995; Ridley y col., 2015]. Rac1, a su vez inhibe a RhoA (la cual en su forma activa se localiza en el borde posterior, Fig. IIB), proteína encargada de activar a la serina treonina quinasa ROCK para el control de la contracción de los filamentos de actina (a través de la activación de la miosina II, producto de la fosforilación de la cadena liviana regulatoria de la miosina, “RLC”) y la formación de adhesiones focales [Nobes y col., 1999; Vicente-Manzanares y col., 2009; Spiering y col., 2011; Ridley y col., 2015]. Por lo tanto, estas proteínas se encuentran reguladas espacial y temporalmente de forma dinámica, de tal manera que también es posible encontrar a RhoA en el borde director previo a la activación de Rac1 [Machacek y col., 2009].

1.4. Adhesión focal mediada por Integrina

La adhesión celular es un factor esencial, ya que es capaz de mantener la integridad de los tejidos de origen epitelial, apoya los contactos funcionales entre células especializadas y puede facilitar la migración dirigida (por ejemplo, la glía radial puede guiar las células progenitoras neuronales a capas específicas del cerebro) [Curtis y col., 1964]. La adhesión célula-matriz es la forma de adhesión más estudiada, ya que regula la migración celular. Debido a su naturaleza altamente localizada y “puntiforme”, las adhesiones de la célula con la matriz son conocidas como **adhesiones focales**, las cuales fueron descritas por primera vez en células de cultivo [Curtis y col., 1964; Lazarides y col., 1975; Izzard y col., 1976; Heath y col., 1978]. Durante la migración celular, las protrusiones se extienden desde el borde director y sus receptores de adhesión (integrinas) entran en contacto con la matriz extracelular a través de ligandos específicos, lo que envía la señal al medio intracelular para el reclutamiento de las proteínas adaptadoras que formarán el complejo de adhesión focal [Zaidel-Bar y col., 2003; Parri y col., 2010].

Las adhesiones nacientes son las primeras estructuras adhesivas que se forman desde el lamelipodio. Éstas son pequeñas, transitorias (alta actividad de ensamblaje y des-ensamblaje) y por lo tanto no se observan fácilmente en todos los tipos celulares [Alexandrova y col., 2008; Choi y col., 2008]. Por otro lado, los

complejos focales son adhesiones en las primeras etapas de maduración, son más grandes que las adhesiones focales nacientes, dependen de la miosina II para su formación y mantenimiento, residen en el borde del lamelipodio y al igual que las adhesiones focales nacientes, los complejos focales presentan una alta tasa de dinámica de ensamblaje y des-ensamblaje [Rottner y col., 1999; Giannone y col., 2007]. Posteriormente los complejos focales maduran hacia adhesiones focales, las que son de tamaño mayor y más estables [Zaidel-Bar y col., 2003].

Las integrinas son receptores de moléculas de la matriz extracelular (heterodímero formado por una subunidad α y una β), las cuales se presentan en dos conformaciones alostéricas: inactiva, de baja afinidad por el ligando y activa, de alta afinidad por el ligando. La conformación inactiva es estabilizada por interacciones citoplasmáticas entre las cadenas α y β , adyacentes al dominio transmembrana. La unión de la proteína adaptadora talina al dominio citoplasmático de la beta integrina induce un cambio conformacional que se propaga a lo largo de la estructura y favorece la forma activa de alta afinidad de las integrinas [Zamir y col., 2001].

Por otro lado, la activación de GTPasas de la familia Rho en el mecanismo de adhesión involucra una serie de interacciones moleculares con las integrinas y con la familia de las quinasas Src. Si bien aún no está del todo claro qué proteínas están regulando este proceso, la activación de diferentes proteínas con actividad GAP (proteína activadora de GTPasa) y GEF (factor intercambiador de nucleótido de guanina) para estas proteínas G pequeñas, permiten modular la dinámica de ensamblaje y des-ensamblaje de estas estructuras [Parsons y col., 2010]. Por otro lado existen proteínas llamadas “adaptadoras” las cuales se encargan de regular mediante fosforilación el anclaje de la adhesión focal a las fibras de actina [Parsons y col., 2010]. Asimismo, las integrinas son capaces de reclutar a proteínas con actividad tirosina quinasa. La quinasa de adhesión focal (FAK) una vez reclutada a la adhesión, se auto-fosforila para reclutar a Src, la cual fosforila a Paxilina y vuelve a fosforilar a FAK, generándose una cadena de eventos de fosforilaciones sucesivas que modulan la dinámica de ensamblaje [Parsons y col., 2010].

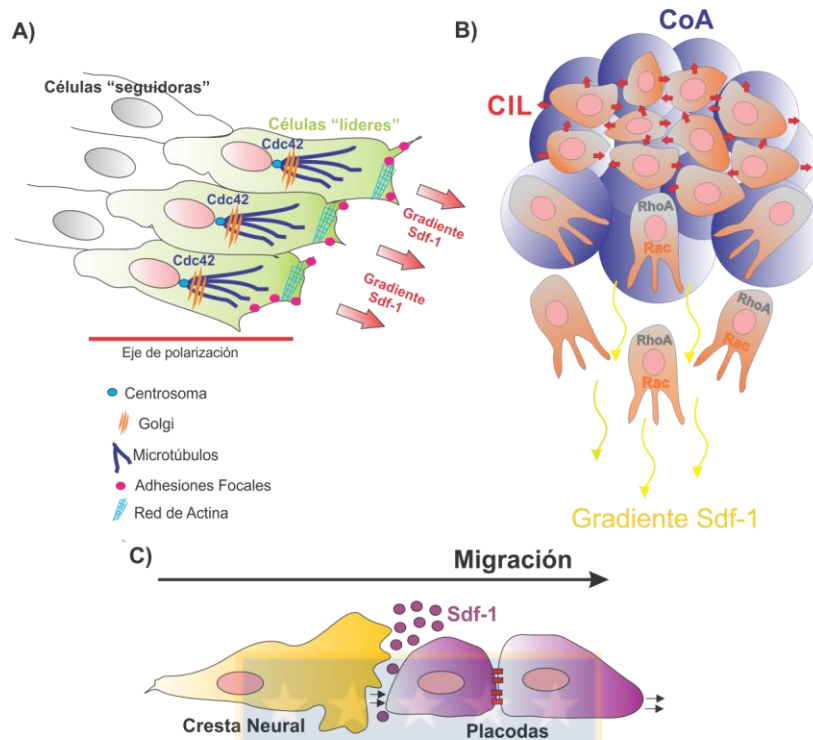


Figura II. CIL, CoA y quimiotaxia: las fuerzas que controlan la migración direccionada.

(A) Durante la migración colectiva, las células “líderes” son las que controlan la señalización dependiente de Sdf-1, polarizándose en el sentido de la migración. Esta polarización comprende un reordenamiento dependiente de microtúbulos, los cuales ubican el núcleo cercano al borde posterior de la célula, luego el centrosoma y posteriormente Golgi. En rosado se observan las adhesiones focales generadas a partir de la remodelación de actina, cuyo ensamblaje y des-ensamblaje depende del transporte de diferentes cargos hacia la membrana celular (a través de la red de microtúbulos), los cuales formarán el complejo de adhesión focal [Adaptado de Mayor y col., 2016]. **(B)** Los contactos entre células de CN inducen CIL (flechas rojas), lo que produce un colapso de las protrusiones vía RhoA (gris). El sistema depende de CIL, CoA (burbujas azules) y de la quimiotaxia para que así exista una migración coordinada. En amarillo se muestra el gradiente de Sdf1, el cual mantiene las protrusiones hacia la dirección de la señal mediante la activación de la proteína Rac (naranja) [Adaptado de Carmona-Fontaine y col., 2008; Carmona-Fontaine y col., 2011]. **(C)** Las células de la Cresta Neural (CN) son atraídas por las Placodas, a través de la quimiotaxia dependiente de Sdf1. Esta atracción permite la migración de las placodas gracias al mecanismo conocido como “*chase and run*” [Fuente: Adaptado de Theveneau y col., 2013].

La migración celular también ha sido estudiada en modelos celulares distintos a la CNC, y dentro de las vías de transducción encontradas en estos estudios se ha descrito la señalización vía proteínas G heterotrimérica. Se ha descrito en células del Sistema Inmune, que éstas para llegar hasta el sitio de inflamación migran a través de quimioquinas, entre ellas CXCL12 (también llamado Sdf1) [Klein y col., 2004]. Además, linfocitos T de ratones que son *knock out* para Gai2 presentan deficiencias en la migración *in vitro*, inducida por CXCL12 [Hwang y col., 2007]. Asimismo, se ha visto que todas las subunidades α de la proteína G estarían involucradas en eventos de migración [Cotton y col., 2009].

2. Proteína G heterotrimérica

La proteína G heterotrimérica se constituye por las subunidades α , β , y γ . Los sistemas de transducción de señales, mediados por proteínas G heterotriméricas, interpretan y propagan señales externas a través de complejos proteicos asociados a la membrana plasmática. Están compuestos por el receptor, una proteína G transductora de la señal y un efector, que es el sistema que amplifica la señal [Birbaumer y col., 2007]. Cuando un receptor acoplado a proteína G une un ligando específico, ocurre un cambio conformacional en su dominio intracelular, lo que se traduce en el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, junto con la disociación del heterotrímico. El resultado de la disociación son dos especies activas, $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$, capaces de regular la actividad de distintos efectores [Goldsmith y col., 2007]. La señalización se acaba por la hidrólisis de GTP a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$. $G\alpha$ -GDP luego se vuelve a asociar con $G\beta\gamma$, volviendo a conformarse un heterotrímico inactivo [Sato y col., 2006]. Las subunidades $G\alpha$ en mamíferos se agrupan en cinco subfamilias (Gs, Gq, G12/13, Gi y Gv), diferenciándose entre ellas en la identidad de secuencias y la especificidad por proteínas efectoras [Oldham y col., 2008; Oka y col., 2009].

Por otra parte, existen otras proteínas que son capaces de regular la actividad de la proteína G heterotrimérica de forma independiente del receptor [Miller y col., 2000]. Entre ellas existen proteínas accesorias denominadas Factores

Intercambiadores de Nucleótidos de Guanina (GEF), que son los encargados de inducir el cambio de GDP por GTP, promoviendo así la activación de la subunidad $G\alpha$ de la proteína G. Estos activadores de proteína G constituyen lo que llamamos GEF no-canónicos, entre los cuales destaca la proteína citosólica Ric-8A [Miller y col., 2000; Pierce y col., 2002].

2.1. Proteína G durante la migración celular

Múltiples estudios han permitido relacionar a 4 familias de proteínas G heterotriméricas ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q/11}$ y $G_{\alpha 12/13}$) con la migración celular, donde efectores de las distintas cascadas de señalización activarían a miembros de la familia de las proteínas Rho GTPasas, regulando así la remodelación del citoesqueleto durante el movimiento celular [Cotton M. y col., 2009].

Las familias de proteínas G más estudiadas en el proceso de migración corresponden a $G_{\alpha 12/13}$ y $G_{\alpha i/o}$. Ambas familias se han vinculado a la migración y dispersión de células del sistema inmune, como también en el caso particular de $G_{\alpha 12/13}$ en el proceso de gastrulación (epibolia) en el pez cebra [Lin y col., 2005]. Para el caso del sistema inmune, por un lado, $G_{\alpha 12/13}$ se ha descrito en la migración de neutrófilos y leucocitos [Kelly P. y col., 2007], mientras que por otro lado se ha relacionado a la familia de las proteínas $G_{\alpha i}$ con la migración quimiotáctica en leucocitos y macrófagos. Específicamente se ha asociado al subtipo $G_{\alpha i2}$ (el más abundante en sistema inmune) regulando la polarización en respuesta a diferentes quimioattractantes, paso necesario para la reorganización del citoesqueleto durante la migración de macrófagos [Wiege K. y col., 2012]. Además, $G_{\alpha o}$ (que es parte de la familia $G_{\alpha i/o}$) es requerida para la migración de neuronas entéricas, donde los niveles de expresión de la proteína se relacionan directamente con los periodos de migración durante el desarrollo embrionario de *M. sexta* [Horgan A. y col., 1994].

2.2. Resistencia a Inhibidores de Colinesterasa 8 (Ric-8)

Como se mencionó, la proteína citosólica Ric-8 es un GEF para la subunidad G α de la proteína G heterotrimérica, se encuentra conservada evolutivamente y participa en vías de señalización dependiente e independiente de GPCR [Tall y col., 2003]. En mamíferos se han descrito dos genes parálogos para Ric-8, estos son Ric-8A y Ric-8B. Se ha descrito que Ric-8A presenta actividad GEF *in vitro* para G α i, G α q y G α 12/13 (no para G α s) [Tall y col., 2003], mientras que Ric-8B tiene mayor afinidad por G α s y G α q [Romo y col., 2008]. Dentro de las funciones descritas para Ric-8 destaca su papel regulador del mecanismo que controla la división celular asimétrica en embriones de *C. elegans* [Miller y col., 2000] y de neuroblastos de *Drosophila* [Wang y col., 2005]. Por otro lado, se sabe que Ric-8A es importante en la embriogénesis debido a que embriones de ratones knock-out para Ric-8 (homocigotos -/-) no son viables y mueren en etapas tempranas durante el desarrollo [Tõnissoo y col., 2006]. Por otro lado, en nuestro laboratorio se demostró que durante el desarrollo embrionario de *Xenopus*, los niveles de Ric-8A son cruciales para la migración de las células de la cresta neural y su posterior diferenciación en tejido cráneo-facial, lo que sugiere nuevamente la participación importante de la proteína G heterotrimérica en el procesos de migración celular [Fuentealba y col., 2013; Toro-Tapia y col., 2017].

2.3. Función G α i y Ric-8A

Una de la funciones más importantes descrita para Ric-8 además de su actividad GEF, sería la de chaperona, estabilizando el plegamiento de las subunidades G α y permitiendo su correcta localización en la membrana [Gabay y col., 2011]. En relación a esta función, se ha descrito que los niveles de G α i2 y G α q son regulados a través de sistema de degradación ubiquitina-proteosoma, la cual se ve disminuida cuando ambas proteínas se encuentran interaccionando con Ric-8A [Chishiki y col., 2013]. Al mismo tiempo, en nuestro laboratorio se demostró que Ric-8A y la subunidad G α i de la proteína G interaccionan *in vitro*, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación [Arriagada C., 2012], lo cual concuerda con lo descrito anteriormente donde ha sido definida la función de Ric-8A como GEF y

chaperona de Gai [Tall y col., 2003; Gabay y col., 2011]. Asimismo en un estudio se observó que, en células precursoras del órgano sensorial de *Drosophila* (las cuales son polarizadas), Ric-8 sería necesario tanto para la polarización de Gai en la zona anterior, como para su localización en la región cortical. Por lo tanto, estos resultados sugieren que Ric-8, a través de su función como GEF, participaría durante la división asimétrica, regulando la polarización celular [David y col., 2005; Hampoelz y col., 2005; Wang y col., 2005]. Por otro lado, un trabajo realizado en nuestro laboratorio comprobó que Ric-8A estaría participando en establecer la polaridad de células de “animal cap” a través de la vía de señalización de Gai, en estadios tempranos de gástrula en embriones de *Xenopus tropicalis* [Arriagada C., Tesis de Magíster, 2012]. A su vez, en nuestro laboratorio se determinó que Ric-8A como GEF para la subunidad α de la proteína G heterotrimérica sería crucial para la migración de las Células de la CNC de *Xenopus*, cuya expresión (mediante hibridación *in situ*) se encuentra en las rutas migratorias de la CN (Fig. IIIA) [Fuentealba y col., 2013; Maldonado-Agurto y col., 2011]. Asimismo se determinó la expresión de la proteína Gai2 por hibridación *in situ*, encontrándose tanto en la zona de la Cresta Neural y de las Placodas (Fig. IIIB) [Fuentealba y col., 2016]. Todos estos resultados nos sugieren que Gai2 podría estar cumpliendo un papel importante a este nivel junto con Ric-8A, posiblemente regulando la migración de las células de la Cresta Neural a través del establecimiento de la polaridad celular (debido a que Ric-8A y Gai regulan la polaridad de neuroblastos de *Drosophila* y la división asimétrica en *C. elegans*, entre otros tipos celulares) [Wang y col., 2005; Afshar y col., 2005]

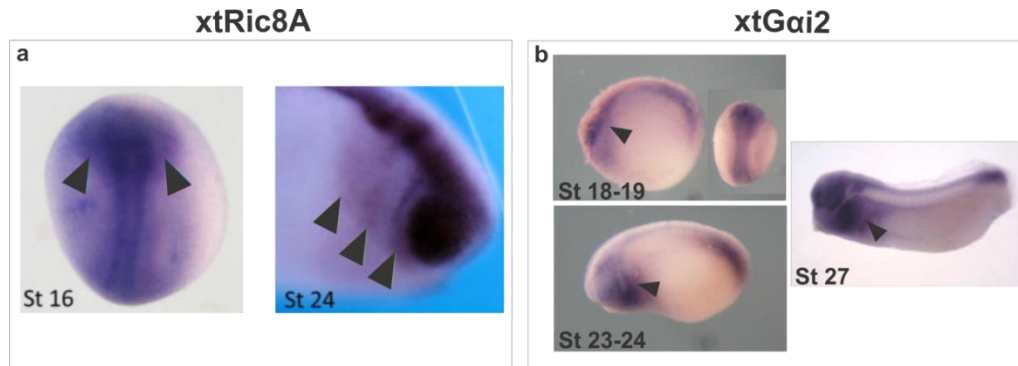


Figura III. Patrón de expresión de Ric-8A y Gai2 en estadios de néurula durante el desarrollo embrionario de *Xenopus tropicalis*

(A) Vista dorsal y lateral de embriones de *Xenopus tropicalis* en estadio 16 (néurula temprana) y estadio 24 (néurula tardía), respectivamente. Las cabezas de flecha muestran la expresión de Ric-8A en estadios tempranos (St. 16) a nivel de la Cresta Neural (CN) y Placodas. En estadios más avanzados (St. 24) su expresión es a nivel de las corrientes migratorias de la CNC. **(B)** Vista lateral de embriones de *Xenopus tropicalis*. Las cabezas de flecha muestran la expresión de Gai2 a nivel de la CN y Placodas en todos los estadios analizados (St. 18-19; St. 23-24; St. 27) [Fuente: Adaptado de Fuentealba y col., 2013; Fuentealba, Toro-Tapia y col., 2016].

Hipótesis

Previamente se ha descrito que Ric-8A, un GEF para la subunidad $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica, estaría cumpliendo un papel importante durante diferentes procesos migratorios. A su vez, se ha observado a la proteína Gai2 en la regulación de la migración quimiotáctica de células del sistema inmune frente a CXCL12 (Sdf-1). Por otro lado, tanto Ric-8A como Gai estarían regulando la polaridad celular en el proceso de división asimétrica en distintos modelos de estudio, formando parte de un mismo complejo proteico. Por otro lado, para estos procesos de polaridad y migración es necesario que ocurran cambios en la morfología de la célula, por lo tanto, para este trabajo proponemos como hipótesis que:

“Ric-8A, a través de Gai, regula la morfología y polaridad celular durante la migración de células de la Cresta Neural Craneal de *Xenopus tropicalis*”

Objetivo general

“Estudiar la función de Ric-8A y Gai2 en la morfología y polaridad celular en eventos de migración de las Células de la Cresta Neural Craneal de *Xenopus tropicalis*”

Objetivos específicos

1. Determinar si Gai2 regula junto con Ric-8A la migración de células de la Cresta Neural Craneal durante el desarrollo embrionario de *Xenopus tropicalis*.
2. Estudiar la localización subcelular de Gai2 en las células de la Cresta Neural Craneal de *Xenopus tropicalis* y su interacción con Ric-8A.
3. Analizar la función de Ric-8A y Gai2 en la morfología y polaridad celular durante la migración de las células de CNC.

Materiales

Oligonucleótidos Morfolino

Oligonucleótido morfolino control (MOCtl):

5'- CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A -3'

Oligonucleótido morfolino contra XtRic-8A (MORic-8A):

5'- GAG GGT ACC CGG ATC CAT GGC TGG C -3'

Oligonucleótidos morfolino contra XtGai2 (MOXtGai2):

5'- CGA CAC AGC CCC AGA TAG TGC GT -3'

Vectores plasmidiales

Plásmidos para la síntesis de sondas y ARN mensajero mediante transcripción *in vitro*:

Para la síntesis de sonda:

Gen	Vector
<i>Snail2</i>	pSP72/Slug
<i>Twist</i>	pBlueScriptK/Twist



Para la síntesis de ARN mensajero:

- pCSC2+/6MycXtRic-8A
- pCS105/eGFP-CAAX
- pCS2+/mCherrymembrana
- pCS2+XtGai2-V5
- pCS2+H2B-cherry
- pCS2+H2B-GFP
- pCS2+pGBD-GFP (para detección de Rac-1 activo)

Anticuerpos y Fluoróforos

(I: Inmunofluorescencia; WB: “Western Blot”; HIS: Hibridación *in situ*)

- Fluoresceína, Life Technologies
- Rodamina dextrano, Life Technologies
- Anticuerpo anti Digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina, Roche (HIS: 1:3000)
- Anticuerpo anti Myc monoclonal de ratón, Santa Cruz 9E10 (I: 1:200; WB: 1:5000)
- Anticuerpo anti GAPDH de ratón, Novus Biologicals 1D4 (WB: 1:1000)
- Anticuerpo anti V5-probe monoclonal de ratón, Santa Cruz sv5-pk (I: 1:100; WB: 1:5000)
- Anticuerpo anti Gai2 monoclonal de ratón Santa Cruz, L5 (I: 1:50; WB: 1:1000)
- Anticuerpo anti Ric-8A monoclonal de ratón 1H6, Sigma (I: 1:100)
- Anticuerpo anti-IgG de ratón cadena liviana conjugado con HRP (“Horseradish peroxidase”, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-035-003)
- Anticuerpo anti α -Tubulina T9026, Sigma-Aldrich (I: 1:100, WB: 1:5000)
- Anticuerpo anti Par-3 sc-5598, Santa Cruz (I: 1:25)
- Anticuerpo anti β -Integrina, Hybridoma (I: 1:25)
- Anti-paxilina (pY118), Invitrogen. (I: 1:20)
- Anticuerpo anti N-Cadherina (MNCD2), Hybridoma (I: 1:10)
- Anticuerpo anti E-Cadherina (5D3), Hybridoma (I: 1:10)
- Anticuerpo anti mouse Alexa fluor 488, Life Technologies (I: 1:200)
- Anticuerpo anti mouse Alexa fluor 546, Life Technologies (I: 1:200)
- Anticuerpo anti rabbit Alexa fluor 488, Life Technologies (I: 1:200)
- Anticuerpo anti rabbit Alexa fluor 546, Life Technologies (I: 1:200)
- Anticuerpo anti rabbit Alexa fluor 647, Jackson Immunoresearch (I: 1:200)
- Anticuerpo normal mouse IgG sc-2025, Santa Cruz.
- Anticuerpo normal rabbit IgG sc-2027, Santa Cruz.
- Faloidina 546 y 633, Life Technologies (I: 1:200)
- Hoechst, Thermo Fisher Scientific. (I: 1:1000)

Resinas

Proteína A-agarosa para inmunoprecipitación (Santa Cruz)

Enzimas

Enzimas de restricción: NotI, XhoI, XbaI (Biolabs), BglII (Promega)

Sp6 ARN polimerasa (Biolabs)

T7 ARN polimerasa (Biolabs)

Proteinasa K (Fermentas)

ADNasa I (Ambion)

T4 ADN Ligasa (Fermentas)

Métodos

1. Manipulación de animales y técnicas embriológicas

1.1. Obtención de embriones de *Xenopus tropicalis*

Todos los métodos utilizados para la mantención y utilización del modelo *Xenopus* fueron previamente evaluados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas. La metodología de eutanasia de anfibios utilizada se basó en los métodos descritos en el trabajo de Close y colaboradores (1996). La obtención de embriones de *Xenopus tropicalis* se realizó por medio de la técnica de fertilización *in vitro*. La ovulación de las ranas hembras seleccionadas, fue inducida previamente mediante la inyección sub-cutánea de hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG). La noche anterior a la fertilización, tanto hembras como machos fueron inyectados con 20 unidades de HCG. Al día siguiente (cuatro horas previas a la fertilización) nuevamente todas las ranas fueron inyectadas con 200 unidades de HCG. Para la extracción de los testículos desde los machos, el individuo fue anestesiado en benzocaína y luego sacrificado, diseccionando los testículos a través de una incisión abdominal. Luego, estos últimos fueron macerados en medio L15 suplementado con 10% de FBS. Posteriormente, los huevos fueron extraídos y fertilizados con gotas de macerado de testículo e

incubados por 20 minutos en solución 1/9x MR (0.1 M NaCl, 1.8 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5.0 mM Hepes-NaOH pH 7.6). A continuación, el medio de las placas de fertilización se reemplazó con una solución de cisteína al 3% en 1/9x MR pH 7.9, con el objetivo de disolver la capa gelatinosa que los protege, proceso conocido como “desgelatinización”. Finalmente, los embriones fueron lavados e incubados en 1/9x MR a 26°C. Dos horas post-fertilización, el medio se reemplazó por 1/20x MR con gentamicina a 100 g/mL, manteniendo la misma temperatura hasta alcanzar los estadios de néurula temprana y néurula tardía (Modificación de la metodología descrita por Sive y col., 2000).

1.2. Microinyección de embriones

Las microinyecciones se llevaron a cabo utilizando un microinyector Narishige IM300, observando a través de un estereoscopio de luz visible. Utilizando capilares de borosilicato como agujas finas para la microinyección, se inyectaron 2,1 nL de cada solución en embriones posicionados sobre placas de microinyección con 1/9x MR y 2% Ficoll. Posteriormente, el medio fue reemplazado por 1/20x MR con gentamicina a 100 g/mL hasta alcanzar los estadios requeridos.

Para el desarrollo de esta tesis se diseñaron dos oligonucleótidos morfolino (MO), ambos sintetizados por GeneTools®. En primer lugar, se diseñó un MO contra Ric-8A (MOXtRic-8A), el cual es capaz de hibridar con el ARN mensajero de Ric-8A, impidiendo de esta forma la traducción de dicho mensajero. El mismo mecanismo de acción se consideró para sintetizar un segundo morfolino, el cual sería específico contra el ARN mensajero de la proteína Gai2 de *Xenopus tropicalis* (MOXtGai2). Los niveles de silenciamiento de Ric-8A mediados por MOXtRic-8A fueron previamente determinados mediante “Western Blot” (datos no mostrados, Fuentealba y col., 2013 y Maldonado-Agurto, 2010, tesis de magíster). Por otro lado, con el fin de determinar la toxicidad de ambos morfolinos utilizados, se inyectaron también concentraciones equimolares de un MO control (MOctl) no relacionado. Para ello, cada uno de los morfolinos fue inyectado en conjunto con el

marcador de linaje Rodamina-Dextrano o Fluoresceína al 1%, permitiendo de esta forma identificar el lado inyectado del embrión mediante fluorescencia. Para los ensayos de pérdida de función de Ric-8A, la cantidad de MOXtRic-8A utilizada fue de 15 ng (descrita previamente en Fuentealba y col., 2013), mientras que las cantidades de MOXtGai2 utilizadas fueron de 15 ng, 20 ng y 25 ng, inyectando un blastómero ventral y uno dorsal del embrión en estadio de ocho células, de manera de silenciar sólo un lado del embrión y mantener el otro lado como control. Para los ensayos de epistasis y rescate de fenotipo se utilizó una única concentración de MOXtRic-8A (15 ng) y MOXtGai2 (20 ng), la cual se logró estandarizar para un fenotipo de silenciamiento severo. Durante estos ensayos, el protocolo para la microinyección de embriones fue el mismo descrito previamente, teniendo en cuenta consideraciones propias de la manipulación de los oligonucleótidos morfolino. Momentos previos a la microinyección, los morfolidos fueron incubados a 65°C por varias horas, luego fueron centrifugados (centrífuga Force mini, *Bioproducts*) y cuantificados realizando las respectivas diluciones a inyectar. Este procedimiento fue necesario llevarlo a cabo debido a la baja solubilidad de estas moléculas y la facilidad con la que precipitan (Metodología descrita por Harland *Xenopus tropicalis* Site).

1.3. Fijación de embriones

Una vez que los embriones alcanzaron el estadio requerido, fueron fijados en una solución de MEMFA para ensayos de Hibridación *in situ* (FA: 3,7% p/v, 100 mM MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, pH 7.4) por 4 horas a temperatura ambiente y, posteriormente, fueron lavados y almacenados en etanol 100% a -20°C (Modificación de la metodología descrita por Sive y col., 2000).

1.4. Hibridación *in situ*

El protocolo es una modificación del descrito en el sitio web Harland Lab *Xenopus tropicalis* y probado previamente en el laboratorio. Consiste en una etapa de hidratación de los embriones previamente fijados a concentraciones crecientes de

PTw (1X PBS + 0.1% Tween-20) para tratarlos después con 5mg/ml de proteinasa K por 3 minutos. Se realizaron dos lavados con 100mM de trietanolamina pH 7-8 por 5 minutos, dos lavados con trietanolamina/anhídrido acético por 5 minutos, seguido de cinco lavados con PTw por 5 minutos, todos ellos a temperatura ambiente y en agitación.

Se volvió a fijar los embriones en 3,7% formaldehído/ PTw por 20 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se realizaron reiterados lavados con PTw. Se realizó una pre-hibridación con "buffer" de hibridación (50% formamida, 5X SSC, 1mg/ml tórula de RNA, 100µg/ml heparina, 1X "Denhart's solution", 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS, 10mM EDTA) por al menos 30 minutos a 65°C, para posteriormente reemplazar la solución por una mezcla del "buffer" de hibridación con la sonda (*Snail2/Twist*) a una concentración final de 1µg/ml, incubándolo toda la noche a 65°C. Al día siguiente, se realizaron lavados a 65°C con formamida al 50%, 25% y 12,5% en 2X SSCTw ("Saline Sodium Citrate": 1X SSC; 150mM NaCl, 17mM Citrato de sodio, pH 7.0) por 10 minutos cada uno, terminando los lavados con 2X y 0,2X de SSCTw por 10 y 30 minutos, respectivamente. Se realizaron dos lavados con PTw y MAB ("Maleic Acid Buffer"; 100mM ácido maleico, 150mM NaCl, pH 7.5) previos al bloqueo con "Blocking Reagent" (Roche) al 2% en MAB por al menos 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina a una dilución de 1:3000 toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron múltiples lavados con MAB, luego se incubaron los embriones con "buffer" AP ("Alkaline Phosphatase buffer": 100mM Tris-HCl 9.5pH, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) dos veces por 5 minutos y se reveló con NBT/BCIP ("Nitro-Blue Tetrazolium Chloride /5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt"). Se detuvo la reacción cromogénica con MAB y luego se fijaron los embriones nuevamente con la solución de Bouin (70% ácido pícrico saturado, 5% ácido acético glacial, 25% formaldehído) toda la noche. Se lavaron los embriones con una solución de etanol al 70% en PTw hasta acabar con la tinción amarilla, para seguidamente realizar lavados hidratantes a concentraciones decrecientes de etanol en 1X SSC. Después se blanquearon los embriones con solución blanqueadora (0.5X SSC, 5% formamida, 1% peróxido, y agua destilada)

incubando bajo luz blanca a temperatura ambiente, eliminando los pigmentos naturales de los embriones. Se mantuvieron los embriones en PBS para realizar la foto documentación, y se almacenaron en etanol 100%. La foto documentación se realizó en un estereoscopio Olympus SZ61 utilizando una cámara Leica DFC450.

1.5. Explantes de Crestas Neurales Craneales

Para explantar las células de la cresta neural craneal (CNC), en primer lugar fue necesario remover la membrana vitelínica de los embriones en estadio 17 en medio 1/9X MR con el uso de pinzas n° 5 (*"Fine science tools"* N° 11252-00) Posteriormente los embriones fueron inmovilizados en una placa con plastilina y las células de CNC fueron cuidadosamente disectadas usando una "navaja" confeccionada con una ceja. Cada explante fue colectado en una placa con medio DFA (53mM NaCl, 5mM Na₂CO₃, 4.5mM Gluconato de potasio, 32mM Gluconato de sodio, 1mM MgSO₄, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 8.3 (Ajustado con 1M de Bicina)) por un tiempo máximo de 30 minutos previo a ser pasados a un cubreobjeto de vidrio con fibronectina (50 µg/mL), en medio DFA. El tiempo de adhesión de los explantes al sustrato fue de aproximadamente 30 minutos. Para el caso de los ensayos de dispersión se utilizó placa de vidrio la cual, luego de los 30 minutos fue llenada totalmente con medio DFA y tapada para ser posteriormente invertida. Ensayos de explantes sobre cubreobjetos de vidrio fueron usados para llevar a cabo análisis de inmunodetección y sobre placas de vidrio para estudios de *"time-lapse"*. Estas técnicas se detallan en la sección siguiente.

1.6. Ensayos de inmunodetección por microscopía de fluorescencia

Luego de cultivar las células en fibronectina, éstas fueron fijadas en 3.7% formaldehído en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente y lavadas en PBS 1X. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas por medio de dos lavados en hielo con una solución de tritón al 0.2% en PBS 1X previamente enfriada. Las células fueron lavadas con PBS 1X y bloqueadas con suero al 2% en PBS 1X a temperatura ambiente por 30 minutos previo a incubar con el anticuerpo

primario toda la noche a 4°C. El anticuerpo primario fue removido mediante lavados cortos con PBS 1X para luego incubar con el anticuerpo secundario, Hoescht (tinción nuclear) y Faloidina (tinción citoesqueleto de actina) por 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario fue lavado con PBS 1X y las muestras fueron montadas con una solución de Dako. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

Anticuerpo anti Ric-8A monoclonal a una concentración de 1:100 (Sigma-Aldrich) y anti Gai2 monoclonal 1:50 (Santa Cruz) para el estudio de la localización de ambas proteínas en células de CNC de *Xenopus*,

Anticuerpo anti α -tubulina monoclonal a una concentración de 1:100 (Sigma-Aldrich T9026) y Faloidina 546 1:200 (Life Technologies) para el estudio de la morfología celular (cambios en el citoesqueleto de actina y tubulina).

Anticuerpo anti fosfo-paxilina policlonal usado a una concentración de 1:25 (Invitrogen) y β 2-Integrina 1:25 (Hybridoma) para estudiar el número y longitud de adhesiones focales en las distintas condiciones celulares.

Anticuerpo anti-Par3 policlonal usado a una concentración de 1:50 (Santa Cruz) como marcador de polaridad celular.

1.7. Ensayos de “*time-lapse*”

Posterior a que los explantes fueron adheridos a la placa de vidrio con fibronectina (como se explicó en la sección 1.5) se obtuvieron imágenes de cada explante en lapsos de 3 minutos por 4 horas para el estudio de dispersión celular, y lapsos de 2 minutos por 1 hora para el estudio de polaridad celular. Para el estudio de la dispersión celular se utilizó un sistema de estereomicroscopía de fluorescencia automatizado y motorizado (axioZoom V16 Zeiss) y para el estudio de polaridad (localización espacio temporal de Rac-1) se utilizó el equipo de microscopía confocal espectral LSM780 NLO Zeiss (objetivo 60X). La primera se describirá a continuación y la segunda, en la sección siguiente:

Dispersión celular

Para medir el grado de dispersión celular en explantes de crestas neurales, se determinó el cociente entre el área final ocupada por un explante (luego de 4 horas de migración) y el área inicial del mismo (al comienzo del ensayo, tiempo 0). Las áreas entre las células fueron calculadas a través del método de triangulación de Delaunay (MATLAB), demarcando las células de forma manual (Image J 1.49q NIH, USA) al tiempo 0 (inicial) y 4 horas (final). Se evaluó la significancia con el test de ANOVA mediante comparaciones múltiples y los gráficos fueron procesados en Prism 6.

1.8. Estudio de la polaridad celular

Para ello se utilizaron dos criterios:

a) Localización espacio-temporal de la proteína Rac-1 activada

Para evaluar el cambio de polaridad se estudió la localización de la proteína G pequeña Rac-1 en explantes de células de CNC en condición control y morfante para G*ai*2. Para ello se microinyectaron 150 pg de la sonda pGBD-GFP en embriones control y morfantes para G*ai*2 (en estadio de ocho células). Doce horas post-fertilización las células fueron explantadas y sembradas en una matriz de fibronectina sobre una placa de vidrio para la visualización *ex vivo* del comportamiento de la GTPasa. Se obtuvieron imágenes de cada explante con el equipo de microscopía confocal espectral LSM780 NLO Zeiss (objetivo 60X), con intervalos de 2 minutos por 1 hora a 26°C, tiempo y temperatura suficientes para favorecer la dispersión de las células control. Los resultados fueron analizados con el plugin de pseudo-color de Image J 1.49q (NIH, USA).

b) Localización de la proteína Par3

Se ha descrito que en células polarizadas, como por ejemplo las células epiteliales, Par3 se encuentra asociado a complejos de adhesión célula-célula controlando el establecimiento de la polaridad apico-basal. Por otro lado también se sabe que Par3 estaría controlando CIL (“Contact inhibition of locomotion”) en las células de CNC de *Xenopus*, a través de la catástrofe o despolimerización de los microtúbulos [Moore y col., 2013]. Es por esta razón que en esta tesis se utilizó la localización de Par3 como marcador de polaridad celular durante la migración colectiva. Para ello, doce horas post-fertilización, las células de la Cresta Neural fueron explantadas y sembradas en cubreobjetos con fibronectina para el análisis de la localización de Par3 en células control y ensayos de pérdida de función de Gai2 mediante inmunofluorescencia. Las imágenes fueron obtenidas con el equipo de microscopía confocal espectral LSM780 NLO Zeiss (objetivo 60X) y analizadas con el software Image J 1.49q (NIH, USA).

2. Técnicas de Biología Molecular

2.1. Construcción de plásmido pCS2+XtGai2V5

Para llevar a cabo esta tesis, se generó la construcción del plásmido pCS2+XtGai2V5 para la detección de la proteína Gai2 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y western-blot (gracias al epítotope V5) y para ensayos de sobreexpresión de Gai2. Esta construcción se llevó a cabo a partir de los plásmidos pCS2+ vacío (el cual fue digerido con las enzimas XhoI y XbaI) y el plásmido pCS2+MT/6MycXtGai2 desde el cual se generó el fragmento de PCR Gai2V5 con sitios XhoI y XbaI, para ser posteriormente digerido con las enzimas correspondientes.

Digestión analítica y preparativa

Las digestiones analíticas se realizaron en un volumen final de 20 μL con 0.5 μg de ADN, 1 unidad de la enzima de restricción respectiva, 0.1 volúmenes de BSA10x y 0,1 volúmenes del “buffer” 10x adecuado. Luego se incubó la reacción por 4 horas a 37°C y se analizó el patrón de digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón 0.5x TAE (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1.14 mL/L ácido acético glacial, pH 7.8) teñido con bromuro de etidio. Las digestiones preparativas fueron desarrolladas en un volumen final de 100 μL con 10 μg de ADN.

Para purificar el ADN lineal digerido, se utilizó el método de extracción desde geles de agarosa, para lo cual se siguió el protocolo del kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel)*. Las eluciones se realizaron en agua “nucleasa free” pre-calentada a 55°C, y el ADN fue luego almacenado a -20°C.

Ligación

Los plásmidos purificados, junto a los fragmentos a subclonar fueron incubados en una relación molar 3: 1 (inserto: vector) en presencia de la enzima T4 ADN Ligasa (Fermentas) y su buffer respectivo, a 16°C por 16 horas. Como control, se llevó a cabo la misma reacción en ausencia del inserto, por ejemplo fragmento Gai2V5 (control de vector re-ligado). Finalmente, los productos de ligación fueron transformados en bacterias quimiocompetentes (descrito posteriormente), para luego el ADN plasmidial ser extraído y purificado mediante la técnica de minilizado.

Purificación de ADN plasmidial por mini lisado

De las colonias transformadas producto de la ligación se seleccionaron 10 colonias al azar y se incubaron en 3 mL de medio LB/Ampicilina por toda la noche a 37°C. A partir del cultivo de bacterias crecidas, se tomaron 1,5 mL y se

centrifugó a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada Smart R17). El “pellet” formado se resuspendió en 300 µl de “buffer” TENS (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0,1 N NaOH, 0,5% SDS), se agitó por inmersión y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 150 µl de Acetato de Sodio 3 M pH 5.2 agitando vigorosamente, se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 12.000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le añadieron 3 volúmenes de EtOH 100%, previamente enfriado a -20°C para precipitar el ADN. Luego, se volvió a centrifugar por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el “pellet” fue resuspendido en agua “nanopure” en presencia de ARNasa (20 µg/mL).

Finalmente, se realizó una digestión analítica a los plásmidos, verificando que los clones elegidos liberarán el inserto correspondiente, de manera de corroborar que se tratara de la construcción esperada. Esto se verificó mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y finalmente el constructo de ADN se envió a secuenciar.

Transformación de bacterias quimiocompetentes por Calcio

La transformación de bacterias quimiocompetentes fue necesaria también para la preparación a gran escala de los diferentes plásmidos utilizados para la síntesis *in vitro* de los distintos ARN mensajeros inyectados y sondas utilizadas para Hibridación *in situ*. Para ello, bacterias DH5α químicamente competentes por Ca⁺² fueron transformadas con los plásmidos de interés utilizados. Se incubaron 10 ng de plásmido en 50 µL de bacterias durante 30 minutos en hielo. Luego, éstas fueron sometidas a un golpe de calor por 2 minutos a 42°C y luego a 4°C por 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 250 µL de medio LB sin antibiótico y se incubaron las bacterias a 37°C por 45 minutos en agitación. Finalmente, 50 µL de bacterias fueron sembradas en placas LB/Agar/Ampicilina e incubadas por toda una noche a 37°C.

2.2. Purificación de plásmidos a gran escala

Todos los plásmidos utilizados durante esta tesis, tanto los que codifican para las sondas antisentido como los distintos plásmidos utilizados para la síntesis de ARNm, fueron preparados a gran escala mediante la técnica de polietilenglicol (PEG) [Sambrook y col., 1989].

En primer lugar se inoculó una colonia aislada de la placa con bacterias previamente transformadas y se creció en 2 mL de medio LB/Ampicilina por toda una tarde, a 37°C en agitación hasta turbidez óptima. Luego, este inóculo se traspasó a 250 mL de medio LB/Ampicilina y se volvió a incubar a 37°C por toda la noche, en agitación. El cultivo fue centrifugado a 5.000 rpm (centrífuga Hitachi CR226III) por 15 minutos a 4°C, y el “pellet” se resuspendió en 5 mL de solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8.0). Las bacterias fueron lisadas con 10 mL de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) mezclando por inversión e incubando de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de adicionar 5 mL de solución III (CH₃COONa 3M, CH₃COOH 0.2M), se mezcló por inversión y se incubó por 10 minutos en hielo. La suspensión fue centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C y del sobrenadante se precipitaron los ácidos nucleicos con 0.6X de volumen de isopropanol dejando por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugando a 16.000 x g por 15 minutos a 4°C. El precipitado fue lavado con 1 mL de etanol al 70% y luego disuelto en 3 mL de “buffer” TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) más 3 mL de LiCl, dejando reposar en hielo por 10 minutos para precipitar los ARN de alto peso molecular. Se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos y luego se recuperó el sobrenadante para añadir 1 volumen de isopropanol. Se mezcló bien y se centrifugó a 10.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue desechado y se eliminó el exceso de isopropanol lavando con 1 mL de etanol al 70%. El precipitado fue disuelto en 500 µL de “buffer” TE pH 8.0 conteniendo 20 µg/mL de ARNasa A para digerir los ARNs de bajo peso molecular, por 30 minutos a temperatura ambiente. El ADN plasmidial fue precipitado con 500 uL de PEG 8000 13% p/v NaCl 16.0 M por 10 minutos a temperatura ambiente, y fue luego centrifugado a 13.000 rpm por 10

minutos a 4°C en una micro centrífuga. Se removió el sobrenadante y se lavó con 1 mL de etanol al 70%, centrifugando a 13.000 rpm por 10 minutos. Luego, el precipitado fue disuelto en 400 µL de “buffer” TE pH 8.0, incubando toda la noche a 4°C, debido a su dificultad para resuspender. Posteriormente, se realizó extracción de las proteínas adicionando a la solución 1 volumen de fenol/cloroformo, repitiendo este último paso unas 2 o 3 veces, y centrifugando a 13.000 xg por 5 minutos. De esta mezcla, la fase acuosa fue recuperada evitando tomar el precipitado blanco presente en la fase intermedia. Finalmente, el ADN plasmidial fue recuperado por precipitación con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3.0 M y dos volúmenes de EtOH 100% para luego centrifugar a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. El “pellet” formado fue lavado con 1 mL de etanol al 70%, centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos y luego resuspendido en un volumen adecuado de agua “nanopure” y libre de nucleasas. Finalmente, el ADN plasmidial fue cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm, y posteriormente se verificó la construcción mediante digestión con las enzimas de restricción correspondientes, a través de un análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

2.3. Síntesis de sonda y ARN mensajero *in vitro*

Tanto las sondas como los mensajeros de ARN se sintetizaron en el laboratorio, los cuales fueron empleados en ensayos de hibridación *in situ* y sobreexpresión de genes específicos en embriones, respectivamente.

Para la síntesis de ambos, sondas y mensajeros, primero se linealizó el ADN plasmidial que contiene el gen de interés con una enzima de restricción que se encuentre cerca del extremo 5' en el caso de la sonda y 3' en el caso del ARNm, los cuales generarán un ARN antisentido y sentido, respectivamente. Luego se purificó por gel de agarosa el fragmento linealizado empleando el kit de extracción *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL)*. Se cuantificó por gel, analizando la banda generada a través de densitometría comparando con marcador de peso molecular (*Riboruler low range*) empleando Image J 1.49q (NIH,

USA) y luego se utilizó 1.5 µg de ADN purificado como templado para comenzar la transcripción *in vitro*. La transcripción de la sonda se llevó a cabo en presencia de dig-UTP (nucleótidos de uridina marcados con digoxigenina) junto al resto de la mezcla de nucleótidos y la ARN polimerasa correspondiente, según las especificaciones de la enzima en cuestión (Sp6, T7 o T3, Promega). Por otro lado, para la generación de ARN mensajero se empleó el kit de transcripción *in vitro* *mMESSAGE mMACHINE SP6*, según recomendaciones de la empresa (Life Technologies). Ambas reacciones se realizaron en agua libre de nucleasas. Con el uso de ADNasas, se removió el ADN inicial y posteriormente se purificaron los mensajeros a través de precipitación con LiCl, agregando 30 µl a la reacción final, para luego centrifugarla por 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C, o alternativamente purificándolos mediante kit de extracción de ARN (*Nucleospin RNAll*, *MACHEREY-NAGEL*).

2.4. Lisis de embriones

Se colectaron los embriones y se agregó 20µl de “buffer” de lisis por embrión (0.5% Igepal CA030, 10mM Hepes pH7.9, 1mM DTT, 100mM NaCl, 0.5mM PMSF) adicionando inhibidores de proteasas (*complete Mini EDTA free*, *Roche*). Se re-suspendieron los embriones por pipeteo “*up and down*” hasta obtener una solución gris homogénea. Luego se centrifugó la solución a 400g por 10 minutos a 4°C. Se extrajo la fase intermedia, y se volvió a centrifugar repetitivamente hasta no observar pellet. Se cuantificaron las proteínas a través del método de Bradford.

2.5. Detección de proteínas

Se separaron las proteínas a través de electroforesis en gel denaturante al 10% de acrilamida (SDS-PAGE) para luego realizar la inmunodetección a través de la técnica de “western blot”. Se emplearon geles de 0.75mm para la detección de proteínas sobre-expresadas y 1.5mm para las co-inmunoprecipitaciones.

Las muestras de proteínas se incubaron por 5 minutos a 95°C con “buffer” de carga (62.5mM TrisHCl pH6.8, 2%SDS, 10% glicerol, 0.01% azul de bromofenol) en presencia de 0.1M de DTT. Luego las muestras se sembraron junto al estándar pre-teñido Fermentas) en el gel, para posteriormente correrlas a 100V constantes en solución de corrida (25mM Tris, 250mM glicina, 0.1% SDS). Se cargaron 30 µg de proteínas totales para la detección de proteínas sobre-expresadas en HEK293T y entre 50-100 µg para embriones de *Xenopus*. Posteriormente las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa en solución de transferencia (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanol) durante 1 hora (para geles delgados) y 2 horas (para geles gruesos) a 4°C a 250 mA constantes. Para verificar la correcta transferencia, se tiñó la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau. Luego se realizaron múltiples lavados de la membrana con agua destilada, para luego bloquearla con leche descremada al 5% en TBS-Tween (150mM NaCl, 10mM Tris, 0.05%Tween20) durante 1 hora. Después se incubó con el anticuerpo primario y luego el secundario por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C cada uno, realizando tres lavados con TBS-Tween por 10 minutos después de cada incubación de anticuerpo.

Finalmente, las proteínas en la membrana se revelaron con líquidos quimioluminiscentes (“Western Lightning Plus-ECL”, Perkin Elmer) y se expuso a un film auto radiográfico (Ultracruz Autoradiography Film Blue, Santa Cruz Biotechnology). Luego, con el fin de detectar otra proteína en el mismo gel, se realizó “*stripping*” sobre la membrana con solución de bajo pH (“Low pH Stripping Solution”, 25mM Glicina-HCl, 1% p/v SDS) por 45 minutos con el fin de soltar los anticuerpos, para luego realizar dos lavados con PBS y dos lavados con TBS-Tween por 5 minutos cada uno, y así continuar con un nuevo “western blot”. Se realizaron análisis densitométricos de los films revelados utilizando el programa ImageJ 1.49q (NIH, USA).

2.6. Co-inmunoprecipitación

Para cada inmunoprecipitación se empleó 1.5mg (2.5mg para el experimento con FAK) de proteína total por ensayo donde se consideran como muestras: la inmunoprecipitación de la proteína en cuestión, el control con anticuerpo no relacionado, y el control con proteína A/G (Thermo Scientific) agarosa sola. Primero se equilibraron los tubos con 25µl proteína A/G agarosa realizando tres lavados con 500µL de “buffer” de lisis (0.5% Igepal CA030, 10mM Hepes pH 7.9, 1mM DTT, 100mM NaCl) en agitación, seguidos de centrifugaciones a 2000g por 2 minutos a 4°C. Luego se incubó la proteína A/G agarosa con los anticuerpos respectivos por 2 horas a 4°C en agitación. En paralelo se realizó el “pre-clearing” del lisado, utilizando proteína A/G agarosa previamente equilibrada, incubando el lisado de proteínas por 2 horas en agitación a 4°C. Después se realizaron centrifugaciones por 2 minutos a 2000g a 4°C. Se descartó el sobrenadante de todos los tubos, menos del “pre-cleared”, para luego distribuir el sobrenadante de este último entre todos los tubos restantes. Se realizó la inmunoprecipitación incubando por 4 horas o toda la noche en presencia de inhibidores de proteasas.

Luego se centrifugó nuevamente a 2000g y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron cinco lavados con “buffer” de lisis seguido de una centrifugación, tal como se describió anteriormente. Finalmente se agregó 10µL de “buffer” de carga 5X para posteriormente separar las proteínas en gel de poliacrilamida e inmunodetectarlo con la técnica de “western blot”.

2.7. Transfección de células HEK 293T para expresión transiente de Gai2-V5

Se emplearon células HEK293T cultivadas a un 50% de confluencia en placas de 10cm en medio HyClone DMEM (GE Lifesciences) 10% FBS, suplementado con 4mM glutamina, 50µg/ml penicilina y 50µg/ml estreptomina. Posteriormente el medio de cultivo fue reemplazado por medio DMEM sin suero conteniendo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 3µg de los plásmidos que contienen los genes a

expresar. Las células fueron incubadas por 5-6 horas a 37°C, para luego reemplazar el medio por DMEM con suero. Se realizó la lisis celular a las 18 horas post-transfección en 500µL de “buffer” de lisis (0.5% Igepal CA030, 10mM Hepes pH7.9, 1mM DTT, 100mM NaCl, 0.5mM PMSF) en presencia de inhibidores de proteasas.

2.8. Ensayo de estimulación con quinpirol

Para comprobar que la proteína Gai2 fusionada al epítipo V5 es funcional, se realizó un ensayo de estimulación con quinpirol (ligando para el GPCR acoplado a la proteína Gai) de manera de favorecer la translocación de la subunidad Gai a la membrana hasta la desensibilización del receptor y su posterior endocitosis. Para ello se transfectaron células HEK293T con la construcción PCS2+XtGai2-V5 sobre cubreobjetos de vidrio previamente tratados con polyilisina. Luego, 16 horas post-transfección las células fueron nuevamente privadas de suero. Se estimuló con 1 µM de quinpirol por 15, 30 y 60 minutos y se dejó un control sin estimular. Luego se lavó con PBS 1X para quitar el quinpirol y las células fueron inmediatamente fijadas con solución de formaldehído al 3,7% / PBS 1X para la inmunodetección con anticuerpo anti-V5 (Santa Cruz).

Resultados

Objetivo 1: Determinar si Gai2 regula junto con Ric-8A la migración de células de la Cresta Neural Craneal durante el desarrollo embrionario de *Xenopus tropicalis*.

Como ya se mencionó en la introducción, Ric-8A es un GEF no canónico para la subunidad α de la proteína G heterotrimérica [Tall y col., 2003]. Asimismo, en nuestro laboratorio se demostró que Ric-8A estaría regulando la migración de las células de CNC en *Xenopus* [Fuentealba y col., 2013], sin embargo aún no se conoce con detalle el mecanismo vía proteína G heterotrimérica a través del cual regula este proceso. Si bien todas las subunidades α de la proteína G se han visto involucradas en eventos de migración [Cotton y col., 2009], particularmente se estudió la migración de linfocitos T de ratones que son *knock out* para Gai2 y se observaron deficiencias en la migración *in vitro* e *in vivo* inducida por CXCL12 (Sdf-1), el cual es ligando para el GPCR Cxcr4 [Hwang y col., 2007]. Este receptor regula la migración quimiotáctica de las células de CNC en *Xenopus* [Theveneau y col., 2010; Fuentealba y col., 2013] y es por esta razón que en esta tesis se estudió la participación de la subunidad Gai2 junto con Ric-8A en la migración celular de la CNC. Para esto, al igual que con Ric-8A [Fuentealba y col., 2013], se realizaron ensayos de silenciamiento y sobreexpresión de Gai2 en células de CNC para evaluar la migración *in vivo*. Con el fin de evaluar la localización subcelular de Gai2 sobreexpresada y su interacción con Ric-8A, en primer lugar se realizó la construcción del plásmido pCS2+Gai2V5 con epítipo hacia el extremo carboxilo (Fig. 1A-B), ya que la construcción disponible en el laboratorio contaba con el epítipo V5 en el extremo amino de Gai2, lo que interfiere con la miristoilación necesaria para llevar la proteína a la membrana celular. Se observó por inmunofluorescencia que al tratar con el ligando para el GPCR acoplado a proteína Gai (quinpirol) las células HEK293T transfectadas con el plásmido pCS2+Gai2V5, la proteína Gai2 es correctamente translocada a la membrana (Fig. 1A). Se verificaron por western blot los niveles de sobreexpresión de Gai2V5 (43 kDA) tanto en células HEK 293T transfectadas como en embriones microinyectados con el ARN mensajero de la construcción (Fig. 1B).

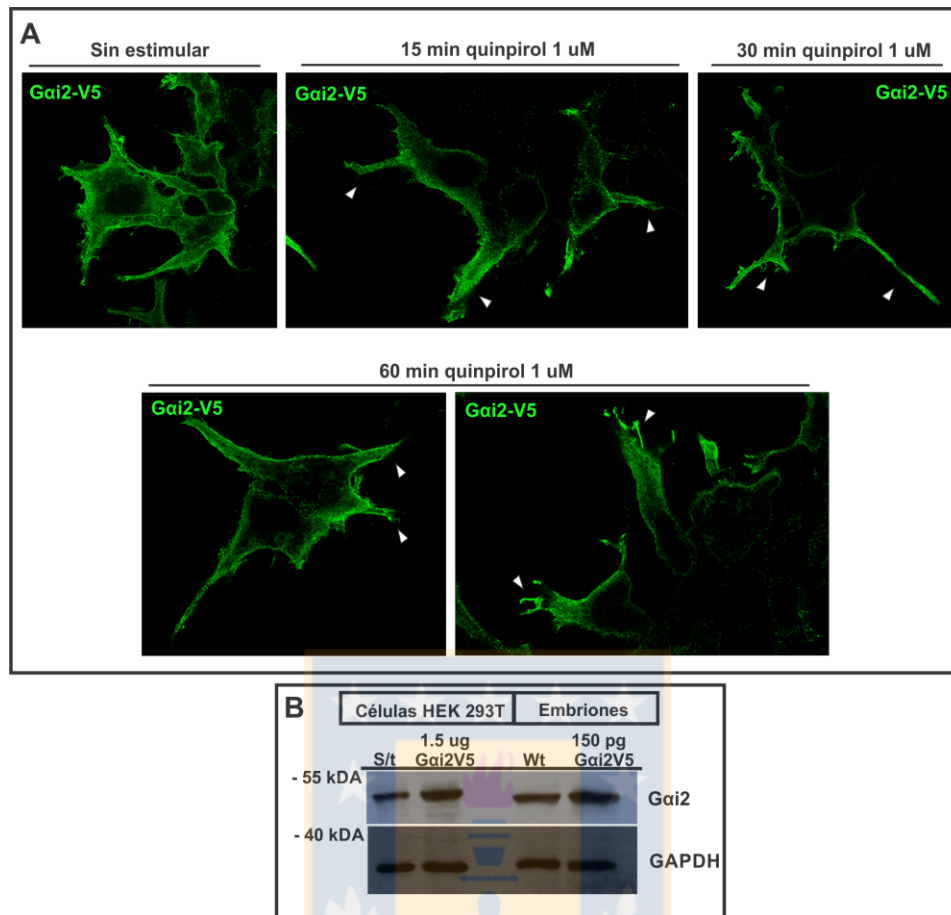


Figura 1. Construcción del plásmido pCS2+Gai2V5

En **(A)** se muestra inmunofluorescencia de células HEK293T transfectadas con la construcción pCS2+Gai2V5, las cuales fueron estimuladas con 1 μ M de quinpirol por 15, 30 y 60 minutos, lo que se comparó con un control de células transfectadas sin estimular. Gai2V5 se muestra en verde (anticuerpo anti-V5) y se observa una correcta translocación de Gai2 a la membrana (puntas de flecha blancas). **(B)** Western blot que muestra los niveles de sobreexpresión de Gai2V5 tanto en células HEK293T como en embriones de *Xenopus*. Para ello se transfectó 1.5 μ g de la construcción pCS2+Gai2V5 y se comparó con un control sin transfectar (en el gel se cargó 30 μ g por condición). También se microinyectó 150 pg del ARNm de Gai2V5 en embriones en estadio de 8 células (en un blastómero dorsal y en uno ventral) y se comparó con un control de embriones “wild-type” (Wt) (se cargó 50 μ g de proteína por condición). Se realizó inmunoblot contra la proteína Gai2 para observar también la proteína Gai2 endógena (anticuerpo anti- Gai2). Se utilizó como control de carga la detección de GAPDH.

Con el fin de dilucidar si Gai2 está involucrada en la regulación de la migración de las células de la CNC junto con Ric-8A, se estudió si Gai2 es capaz de rescatar el fenotipo migratorio *in vivo* en embriones de *Xenopus* deficientes en Ric-8A, para lo cual se realizaron ensayos de epistasis (silenciando Ric-8A y sobreexpresando Gai2). Para ello, se co-inyectó el ARN mensajero que codifica para Gai2 con epítotope V5 y un morfolino específico contra Ric-8A en embriones en estadio de 8 células (Fig. 2A). La migración de las células de CNC se analizó en embriones completos a través de hibridación *in situ* empleando una sonda contra el ARN mensajero de *Snail2* como marcador específico de CNC (Fig. 2B), fenotipo que fue cuantificado en base a un número total de embriones con marca visible (n total = 49). Se observó que ya con 50 pg de ARNm inyectados de Gai2 se obtiene un rescate parcial, el cual se incrementa cuando se microinyectan 100 y 150 pg de Gai2 (70-80% de rescate; Fig. 2C). Asimismo se verificaron los niveles de proteína mediante western blot (Fig. 2D). Esto sugiere que Gai2 estaría participando en la misma vía de señalización de Ric-8A, regulando la migración *in vivo* de las células de CNC.

También se estudió el efecto de la pérdida y ganancia de función de Gai2 durante la migración *in vivo* en embriones de *Xenopus*. Para los ensayos de **pérdida de función** se microinyectó un morfolino específico contra la región 5' UTR de Gai2 en embriones en estadio de 8 células y Rodamina dextrano como trazador de linaje (Fig. 3A). Para evaluar la migración de las células de CNC en embriones completos se realizó hibridación *in situ* empleando una sonda contra el ARN mensajero de *Snail2* como marcador específico de CNC (Fig. 3B), fenotipo que fue cuantificado en base a un número total de embriones con marca visible (n total = 31). Se observó que ya con 15 ng de Morfolino contra Gai2 se obtiene una pérdida leve del fenotipo de migración, el cual pasa a ser severo cuando se microinyectan 20 y 25 ng de MO Gai2 (60-70% de inhibición de la migración; Fig. 3C). Asimismo se verificaron los niveles de proteína mediante western blot (Fig. 3D).

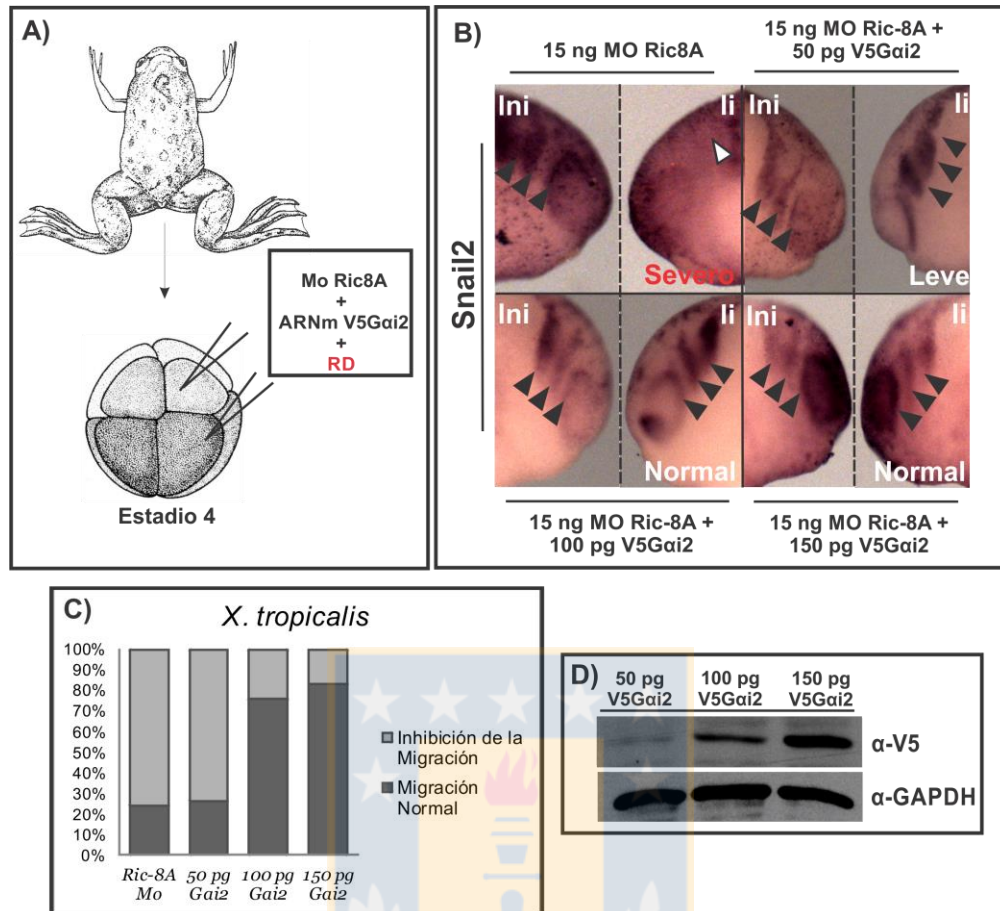


Figura 2. Ensayo de epistasis empleando la subunidad Gai2 en embriones morfantes para Ric-8A

En **(A)** se observa un esquema de co-inyección de embriones en estadio de 8 células en un blastómero dorsal y en uno ventral (dejando el otro lado como control sin inyectar). Se co-inyectó 15 ng de Morfolino de Ric-8A; 50, 100 y 150 pg de ARNm de Gai2V5 y Rodamina Dextrano (RD) como trazador de linaje. **(B)** Hibridación *in situ* contra *Snail2* en embriones en estadio 22-23 para evaluar el fenotipo migratorio (li: lado inyectado, Ini: lado no inyectado). **(C)** Cuantificación de embriones producto de ensayo de epistasis. Se observa que en un 75-80% de embriones sometidos a hibridación *in situ* (n total = 49), que fueron microinyectados tanto con 100 pg como con 150 pg de Gai2, ocurre un rescate del fenotipo de migración *in vivo*. Por lo tanto Gai2 es capaz de rescatar el fenotipo migratorio en embriones morfantes para Ric-8A. **(D)** Western blot que muestra los niveles de sobreexpresión de Gai2V5 en embriones de *Xenopus* morfantes para Ric-8A. Se realizó inmunoblot contra el epítipo V5 para observar la proteína sobreexpresada. Se utilizó como control de carga la detección de GAPDH.

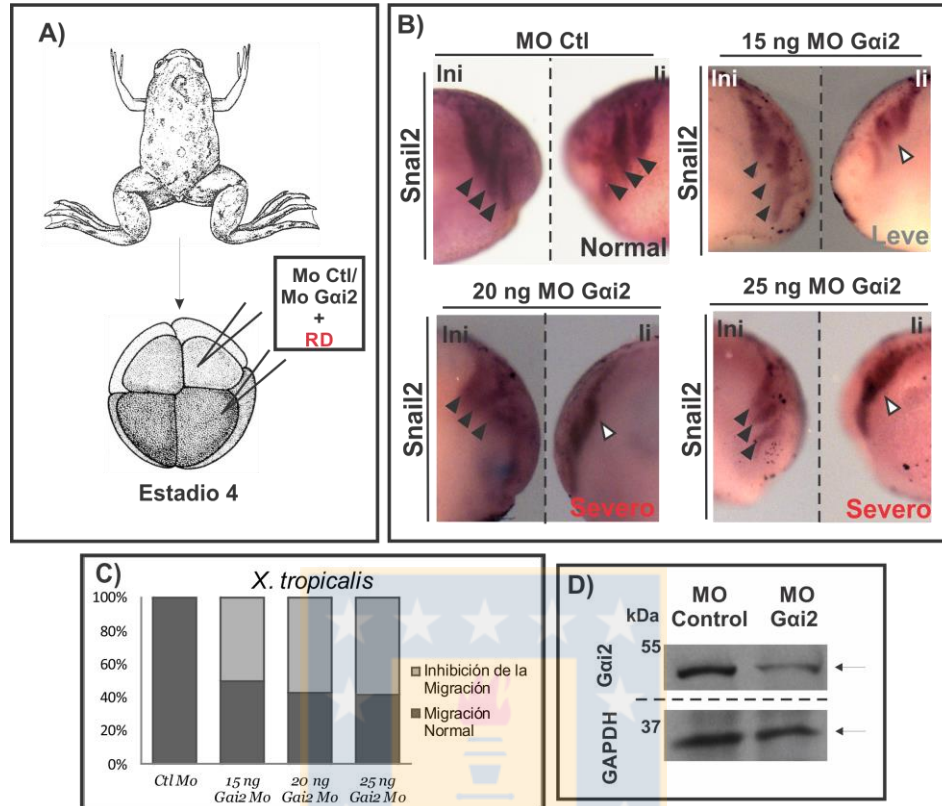


Figura 3. Ensayo de pérdida de función de *Gai2* durante la migración *in vivo* de las células de CNC de *Xenopus*

(A) Esquema de microinyección de embriones en estadio de 8 células en un blastómero dorsal y en uno ventral (dejando el otro lado como control sin inyectar). Se microinyectó 15, 20 y 25 ng de Morfolino de Ric-8A y Rodamina Dextrano (RD) como trazador de linaje. Además se microinyectó un Morfolino Control para evaluar la citotoxicidad de las cantidades equimolares. **(B)** Hibridación *in situ* contra *Snail2* en embriones en estadio 22-23 para evaluar fenotipo migratorio (li: lado inyectado, Ini: lado no inyectado). **(C)** Cuantificación de embriones producto del ensayo de pérdida de función de *Gai2*. Se observa que en un 60-70% de embriones sometidos a hibridación *in situ* (n = 31), que fueron microinyectados tanto con 20 y 25 ng de Mo *Gai2*, ocurre una pérdida severa del fenotipo migratorio *in vivo*. Por lo tanto la pérdida de función de *Gai2* inhibe la migración de las células de CNC. **(D)** Western blot que muestra los niveles de silenciamiento de *Gai2* en embriones de *Xenopus* morfantes para *Gai2*. Se realizó inmunoblot contra la proteína endógena. Se utilizó como control de carga GAPDH.

Por medio de ensayos de ganancia de función se analizó el efecto de la sobreexpresión de *Gai2* donde claramente bajo las condiciones utilizadas, donde se observó una leve inhibición en la migración de las células de CNC entre el lado inyectado y el lado control (Fig. 4C, cuantificación). Como control se microinyectó ARNm de mCherry en embriones “*wild-type*”, efecto que fue cuantificado en comparación a los niveles de sobreexpresión de *Gai2* (Fig. 4C). Los niveles de proteína de *Gai2V5* se analizaron en lisados de embriones mediante western blot, lo que se mostró en la sección anterior (Fig. 2D).

Otra forma de analizar el efecto de los niveles de *Gai2* en la migración es a través de un análisis *in vitro* en explantes de células de CNC, según lo descrito en Carmona-Fontaine y col., 2008. Se incubaron los explantes durante 4 horas y se analizó la dispersión mediante “*time-lapse*”, obteniendo fotografías cada 3 minutos. Para medir el grado de dispersión de los explantes se empleó el método de triangulación de Delaunay, lo cual consiste en medir las áreas que son generadas entre tres núcleos cercanos (vértices del triángulo) [Carmona-Fontaine y col., 2011]. El área total obtenida es proporcional a la migración radial de las células de CNC, dependiendo de las condiciones utilizadas. Al igual que los resultados *in vivo*, las células de CNC pierden su propiedad migratoria al silenciar *Gai2* (Fig. 5A), similar a los resultados obtenidos con el morfolino de Ric-8A [Fuentealba y col., 2013]. Para este ensayo se utilizó una concentración de 20 ng de morfolino contra *Gai2*, la cual fue estandarizada durante los ensayos *in vivo*. Se utilizó 20 ng de un morfolino control como referencia, el cual no afectó la migración de las células de CNC (Fig. 5A). Al cuantificar la dispersión a través de la triangulación de Delaunay se observó una clara disminución de la dispersión en las células morfantes al compararla con el morfolino control (Fig. 5B-C). Esto significa que la relación entre el área final y el área inicial de los triángulos provenientes del análisis de este ensayo es significativamente menor en las células morfantes que la relación obtenida para los controles, lo que sugiere que las células no fueron capaces de migrar radialmente en ausencia de *Gai2*.

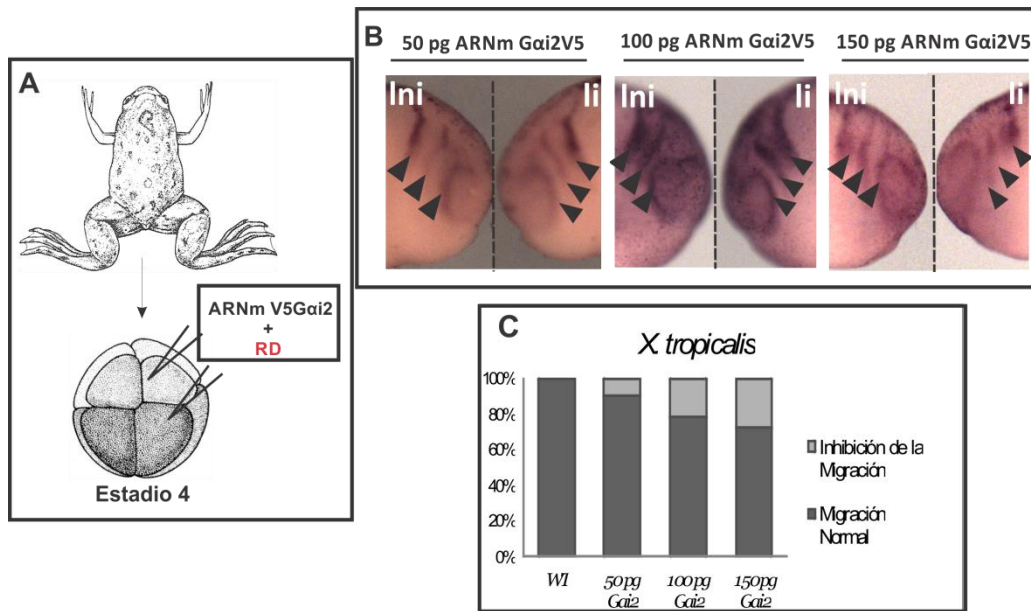


Figura 4. Efecto de la sobreexpresión de Gai2 durante la migración *in vivo* de las células de CNC de *Xenopus*

(A) Esquema de microinyección de embriones en estadio de 8 células en un blastómero dorsal y en uno ventral (dejando el otro lado como control sin inyectar). Se microinyectó 50, 100 y 150 pg de ARNm de Gai2 y Rodamina Dextrano (RD) como trazador de linaje. Como control se microinyectaron embriones Wt con ARNm de mCherry para análisis de citotoxicidad de las cantidades equimolares ARNm. **(B)** Hibridación *in situ* contra *Snail2* en embriones en estadio 22-23 para evaluar fenotipo migratorio (li: lado inyectado, Ini: lado no inyectado). **(C)** Cuantificación de embriones producto del ensayo de ganancia de función de Gai2 donde se observa que sólo un 20% de los embriones presentó inhibición en la migración en la condición de mayor concentración de ARNm (n total = 38).

En resumen, los resultados de este objetivo muestran que el silenciamiento parcial de Gai2 genera un fenotipo similar al observado para las células morfantes para Ric-8A y sugieren que Ric-8A estaría modulando la migración de las células de la CNC a través de la regulación de Gai2.

Objetivo 2: Estudiar la localización de Gai2 en las células de la CNC de *Xenopus tropicalis* y su interacción con Ric-8A.

Debido a que tanto el transcrito de Ric-8A como el de Gai2 se encuentran altamente representados a nivel de las células de CN [Fuentealba, Toro-Tapia y col., 2016], en esta tesis se quiso estudiar la localización de las proteínas endógenas en células de explantes de CNC migratorias. Para ello se realizaron explantes de CNC en embriones en estadio 17, los cuales fueron sembrados sobre un cubreobjeto con fibronectina y se analizó por inmunofluorescencia la localización de las proteínas endógenas. En primer lugar se encontró que tanto la proteína Gai2 como Ric-8A se localizan predominantemente a nivel de la corteza celular, hacia el borde director y no hacia los contactos célula-célula (Fig. 6A-B). También se analizó la localización de Ric-8A y Gai2 sobreexpresadas, para lo cual se microinyectaron embriones en estadio de 8 células en un blastómero dorsal y uno ventral con el ARN mensajero de 6MycRic-8A y el ARNm de Gai2V5. Se extrajeron explantes de células de CNC desde embriones en estadio 17 y se cultivaron en una matriz de fibronectina para inmunofluorescencia, donde se observó por microscopía confocal que ambas proteínas sobreexpresadas también se localizaban preferentemente en la corteza celular (Fig. 6C-D).

Por otro lado se estudió la interacción de Ric-8A y Gai2 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, donde se observó que ambas proteínas coimmunoprecipitan indicando que se encuentran formando parte de un complejo proteico (Fig. 6E), lo que apoya los resultados de colocalización de ambas proteínas. Además como ya se ha descrito, Ric-8A es un GEF para la subunidad $G\alpha$, el cual también cumple una función como chaperona [Tall y col., 2003; Gabay y col., 2011].

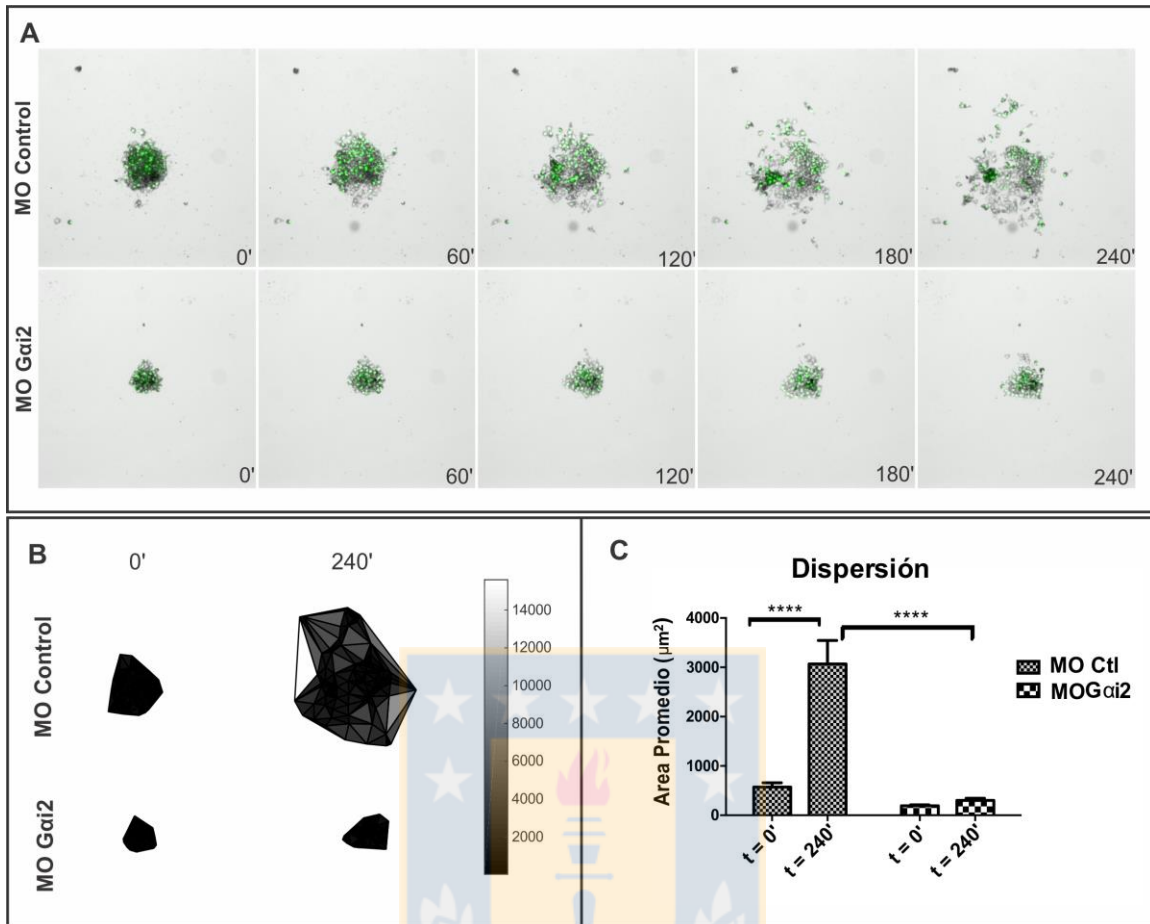


Figura 5. Estudio del efecto de la pérdida de función de Gai2 sobre la migración *in vitro* de las células de CNC de *Xenopus*

(A) Explantes de CNC fueron extraídos desde embriones de *Xenopus tropicalis* en estadio 17, previamente inyectados. Estos se incubaron sobre una placa de vidrio con fibronectina y la dispersión de las células de cada condición fue evaluada durante 4 horas a través de un sistema de estereomicroscopía de fluorescencia mediante “time-lapse”. Todos los embriones fueron inyectados con GFP nuclear para cuantificación de la dispersión. Se evaluaron dos condiciones: morfolino control y morfolino contra Gai2. (B) Representación de la triangulación de Delaunay de un explante representativo de cada condición al tiempo 0 y tiempo final (4 horas). (C) El radio entre las áreas promedio correspondientes entre el tiempo inicial y final fueron graficadas a las 0 y 4 horas. Se evaluó la significancia con un test de ANOVA con comparaciones múltiples (****, $p < 0,0001$). Barras de error: Error estándar. Aumento 10X. MO Control n total = 16 explantes; MO Gai2 n total = 13 explantes; 2 ensayos.

También durante esta tesis mediante ensayos de inmunofluorescencia, se corroboró la pérdida de la expresión de Gai2 en explantes morfantes para Gai2, (Fig. 7B), comparándolo con explantes control (Fig. 7A). Además, como se ha descrito a Ric-8A actuando como chaperona molecular para las diferentes subunidades G α , en esta tesis se estudió el efecto de la pérdida de función de Ric-8A en la localización sub-celular de Gai2 en las células de CNC. Como se observa en la fig. 7C, la localización de Gai2 endógena se ve alterada en células morfantes para Ric-8A, observándose desaparición total de Gai2. Como control positivo se analizó la localización sub-celular de Ric-8A en explantes morfantes para Ric-8A, donde se evidencia claramente el silenciamiento de esta proteína (Fig. 7D). También se analizaron los niveles de la proteína Gai2 en embriones morfantes para Ric-8 y para Gai2 mediante “western blot”, donde se encontró que disminuyen los niveles de Gai2 en embriones morfantes para Gai2 (como era de esperarse), sin embargo los niveles de Gai2 se mantienen constantes en embriones morfantes para Ric-8A (Fig. 7E-F).

En resumen, todos estos resultados demuestran que Ric-8A y Gai2 colocalizan preferentemente en el borde director, en las protrusiones en explantes de CNC y no en la unión célula-célula, e interaccionan o al menos forman parte de un complejo durante la migración de estas células, apoyando la función como chaperona de Ric-8A para Gai2.

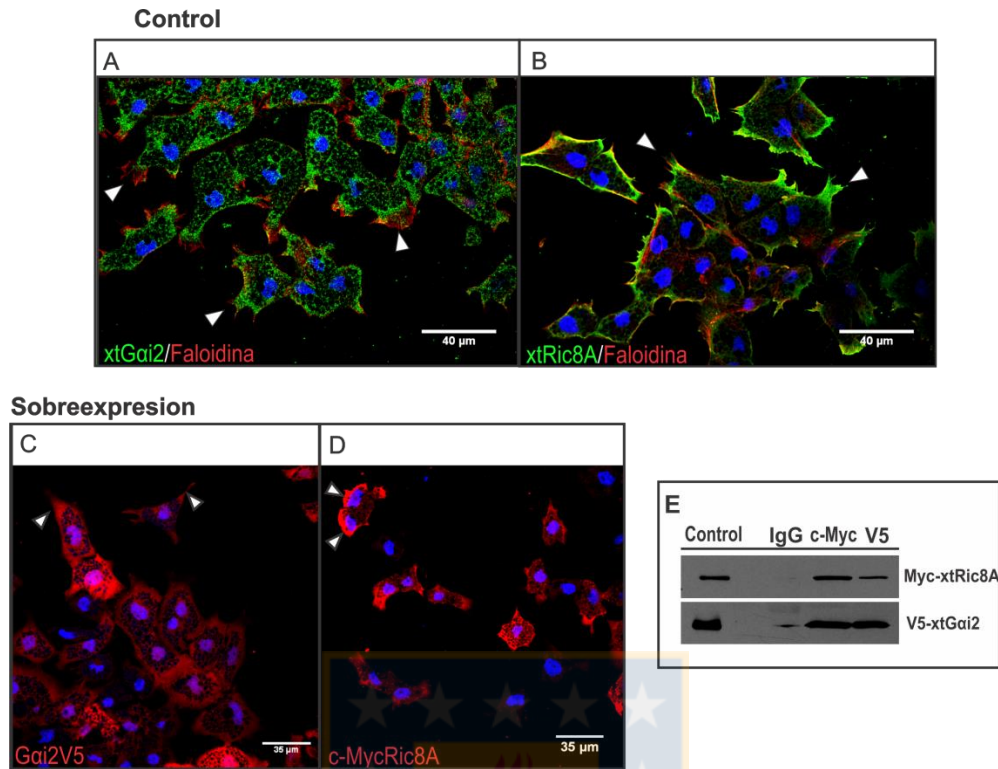


Figura 6. Localización subcelular de Gai2 y Ric-8A en explantes de células de CNC y su interacción

Por medio de ensayos de inmunofluorescencia contra las proteínas endógenas se determinó la localización sub-celular de Gai2 y Ric-8A en explantes de CNC extraídos a partir de embriones en estadio 17 **(A-D)** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. En **(A)** se observa la localización de Gai2 (en verde) en corteza celular y borde director (puntas de flecha) y de la misma manera en **(B)** se observa la localización en el borde director de Ric-8A endógena (también en verde). Faloidina se observa en rojo. **(C-D)** Localización de Gai2 y Ric-8A sobreexpresadas (rojo) mediante microinyección de sus respectivos ARNm. En azul se observan los núcleos. **(E)** Co-inmunoprecipitación entre Gai2V5 y MycRic-8A. IgG: Inmunoglobulina G no relacionada.

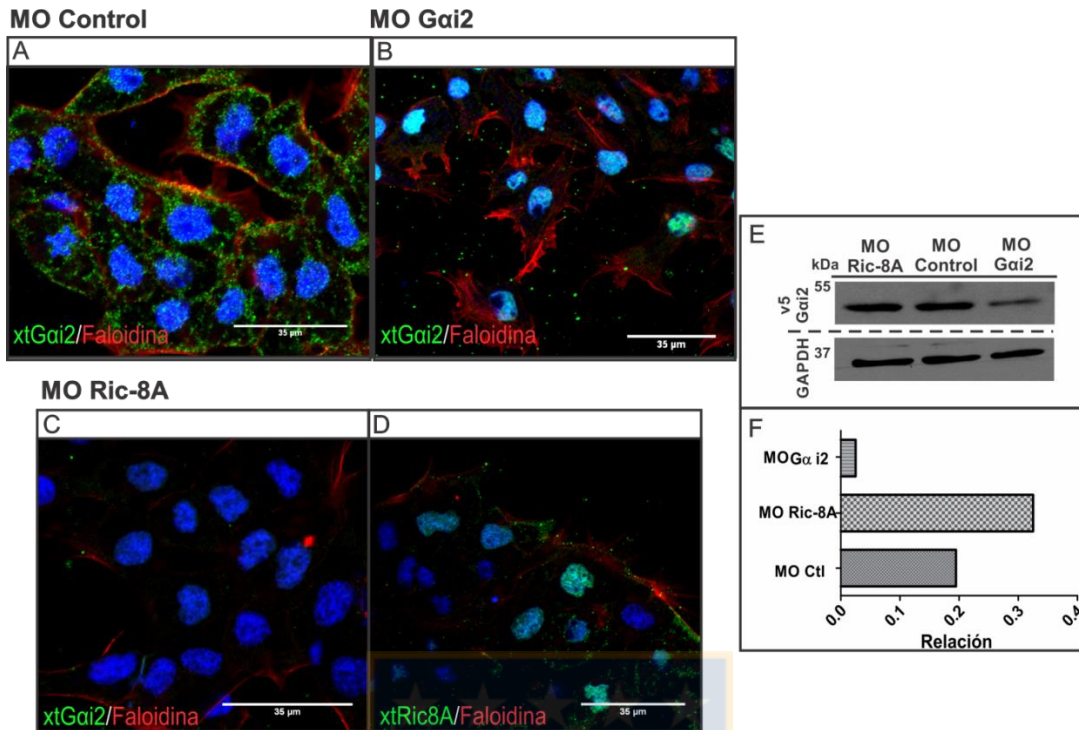


Figura 7. Localización subcelular de Gai2 y Ric-8A en explantes de células de CNC morfantes para Ric-8A

Por medio de ensayos de inmunofluorescencia contra las proteínas endógenas se determinó la localización sub-celular de Gai2 y Ric-8A en explantes de CNC extraídos a partir de embriones morfantes para Gai2 y Ric-8A. **(A-D)** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. En **(A)** se observa la localización sub-celular de Gai2 en explantes control (verde). En **(B)** se observa la pérdida de la localización sub-celular de Gai2 (en verde) debido al silenciamiento de Gai2 (núcleos verdes producto de la co-inyección de H2B-GFP como trazador de linaje). **(C)** Se observa la pérdida de la localización de Gai2 en explantes morfantes para Ric-8A. **(D)** Disminución de la expresión de Ric-8A (verde) en las células de CNC producto de la pérdida de función de Ric-8A. Faloidina se observa en rojo y los núcleos en turquesa debido a DAPI y H2B-GFP como trazador de linaje. **(E-F)** Niveles de expresión de la proteína Gai2 en las distintas condiciones celulares, determinadas por “western blot” **(E)** y cuantificadas por densitometría **(F)**.

Objetivo 3: Analizar la función de Ric-8A y Gai2 en la morfología y polaridad celular durante la migración de las células de CNC.

Con el fin de poder estudiar el mecanismo a través del cual Ric-8A y Gai2 estarían regulando la migración, se analizó el efecto de la pérdida de función de estas proteínas en la morfología celular durante la migración. Para lo cual, en primer lugar se analizó el citoesqueleto de tubulina en explantes de embriones morfantes para Gai2 y morfantes para Ric-8A. Los resultados mostraron diferencias notorias en la distribución de α -tubulina en explantes de CNC morfantes para Gai2 (Fig. 8B), observándose formación de microtúbulos estables hacia el borde director de las células (puntas de flecha blancas) en las células líderes, en el borde del explante, mientras que en las células del centro del explante casi no es posible observar tubulina polimerizada. A diferencia de esto, en las células control es posible visualizar la distribución de la tubulina de forma homogénea (Fig. 8A) tanto en las células del borde como en las del centro. Asimismo se observó que la distribución de la tubulina en embriones morfantes para Ric-8A se concentra hacia las protrusiones (Fig. 8C, pseudo-color) en las células del borde, pero también es posible encontrarla polimerizada en las células del centro del explante aunque menos que en los controles.

Para analizar el efecto en el tamaño de las protrusiones se estudió la morfología del citoesqueleto de actina y la formación de protrusiones en cada condición (Fig. 9A-F). Se encontró que en embriones morfantes para Ric-8A las protrusiones son más pequeñas en comparación a las células control (Fig. 9B), y muy por el contrario las protrusiones de las células morfantes para Gai2 son evidentemente más grandes que las protrusiones de los explantes control (Fig. 9C). Para cuantificar el largo de las protrusiones (en las células líderes) se midió la distancia desde el núcleo hasta el borde director y se obtuvo una longitud promedio. Para los explantes que son morfantes para Ric-8A se obtuvo un promedio de 8,9 μm de largo de las protrusiones ($\pm 2,8 \mu\text{m}$; n total = 45), bastante menor a la longitud de las protrusiones de los explantes control, cuyo promedio fue de 13,2 μm ($\pm 2,4 \mu\text{m}$; n total = 40). Sin embargo, en el caso de los explantes morfantes para Gai2 se

obtuvo una longitud promedio de 25,3 μm (\pm 6,9 μm ; n total = 38), significativamente mayor que las células control (test ANOVA de una vía; ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,1$).

En resumen estos resultados indican que la pérdida de función de Ric-8A y Gai2 afecta la remodelación del citoesqueleto de actina y tubulina, lo que se evidencia en cambios notorios a nivel de las protrusiones.



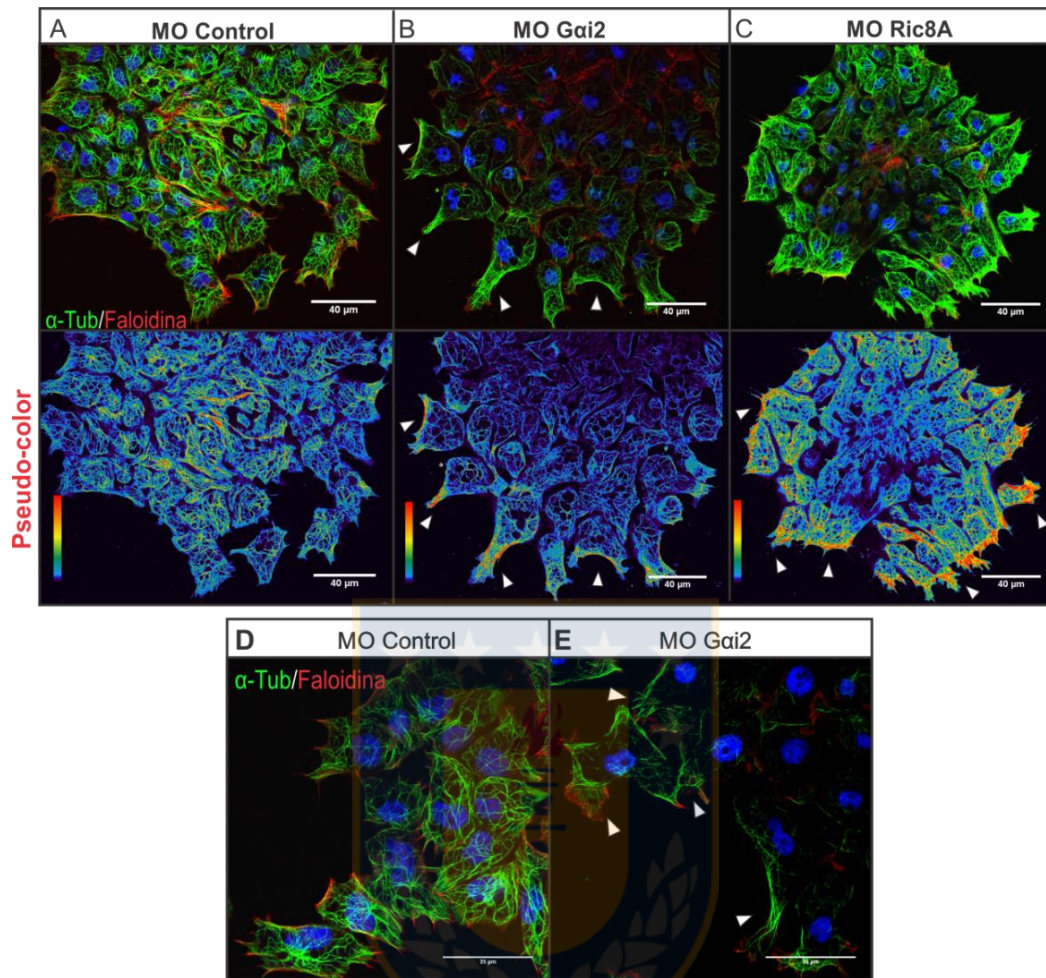


Figura 8. Cambios en la estructura del citoesqueleto de tubulina en células morfantes para Gai2 y Ric-8A

(A-E) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. En (A) se observa el citoesqueleto de tubulina en explantes control (verde), distribución que fue analizada mediante el plugin de “pseudo-color” de ImageJ. En (B) se observa el cambio en la distribución de α -tubulina y en la morfología de las células debido al silenciamiento de Gai2, lo que se evidencia en la imagen obtenida por “pseudo-color” (las zonas rojas muestran las zonas de mayor concentración de la tubulina). En (C) citoesqueleto de tubulina en explantes de embriones morfantes para Ric-8A. (D-E) Cuadro comparativo con mayor amplificación del citoesqueleto de tubulina en embriones control versus embriones morfantes para Gai2 donde se evidencian claramente los cambios en la polimerización de los microtúbulos (puntas de flecha blancas).

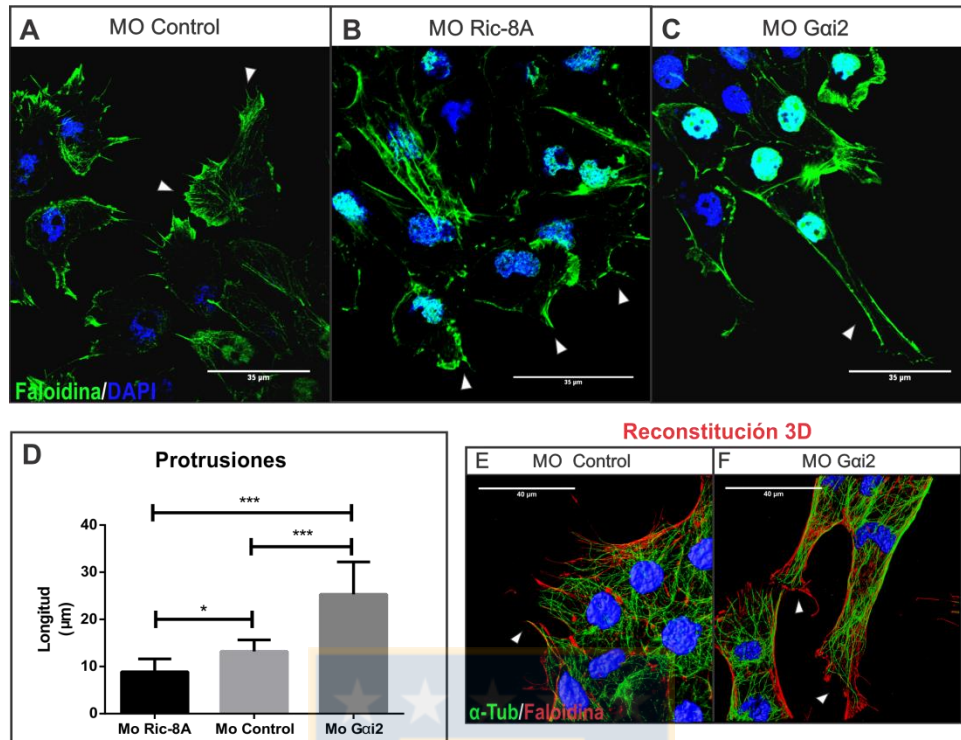


Figura 9. Estudio de los cambios en la estructura del citoesqueleto de actina y en el largo de las protrusiones en células morfantas para Gai2 y Ric-8A

(A-C) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. (E-F) Imágenes obtenidas por microscopía de super-resolución, las cuales fueron reconstituidas en 3D. En (A) se observa el citoesqueleto de actina en explantes control (verde). Las puntas de flecha indican las zonas de alta actividad de la actina para la formación de lamelipodias. En (B) se observa el cambio en el citoesqueleto de actina y en la morfología celular al silenciar Ric-8A, donde se observan protrusiones más pequeñas (puntas de flecha). Núcleos verdes producto de la expresión de H2B-GFP como trazador de linaje. Por otro lado, en (C) se observan cambios en la actina y en la morfología de las células debido al silenciamiento de Gai2. Las protrusiones son evidentemente más grandes que las células control y que las células morfantas para Ric-8A (puntas de flecha). Núcleos verdes por la expresión de H2B-GFP como trazador de linaje. (D) Cuantificación de la longitud de las protrusiones y análisis estadístico mediante ANOVA de una vía (***, $p < 0,001$; *, $p < 0,1$). (E) Reconstitución 3D de un explante control donde se visualiza la distribución de actina y tubulina. (F) Reconstitución 3D de un explante morfante para Gai2 donde se evidencia el aumento evidente de la longitud de las protrusiones (puntas de flecha blancas indican protrusiones).

Como se ha descrito, las células de la CNC para que puedan comenzar a migrar es necesario que sufran una transición epitelio-mesénquima, adoptando así propiedades morfológicas que les permita migrar, entre ellas el cambio en la expresión de E-cadherinas a N-cadherina [Nandadasa y col., 2009; Theveneau y col. 2010]. Se pensó que el aumento evidente en la longitud de las protrusiones en explantes morfantes para Gai2, en conjunto con la baja dispersión y migración radial que presentaron las células con pérdida de función de Gai2, probablemente corresponde a que las células no eran capaces de separarse producto de una inhibición del cambio de cadherinas necesario para que ocurra la transición de epitelio a mesénquima. Es por esta razón, que se analizó la expresión de ambas cadherinas en células de explantes de CNC en estadio migratorio, comparándolas con la expresión de E-cadherina en células en estadio pre-migratorio. Como se puede observar en la Fig. 10C, las células “migratorias” morfantes para Gai2 no muestran expresión evidente de E-cadherina, en comparación a las células pre-migratorias (en verde) (Fig. 10A). Asimismo tampoco se observa expresión de E-cadherina en células migratorias controles específicamente en la unión célula-célula, sin embargo sí es posible observarla en algunos casos en el núcleo en las células control (Fig. 10B) y células pre-migratorias (Fig. 10A). Se sabe que en algunos tipos de cáncer, E-cadherina se localiza en el núcleo debido a que puede regular de forma negativa a Wnt/ β -catenina [Su y col., 2015]. Por otro lado en las células “migratorias” (tanto control como morfantes para Gai2) es posible observar la correcta localización de N-cadherina (en verde, unión célula-célula) (Fig. 10D y 10E). Por lo tanto la pérdida de función de Gai2 no afectaría el cambio de E-cadh/N-cadh, lo que sugiere que las células sí estarían sufriendo TEM.

Como se vio en resultados anteriores, tanto las células morfantes para Gai2 como morfantes para Ric-8A presentan defectos en la migración y muestran cambios evidentes en la morfología celular y principalmente en la longitud de sus protrusiones, lo que podría estar relacionado con la dinámica y estabilidad de las adhesiones focales. Para evaluar esto, se realizó una inmunocitoquímica contra β -integrina y fosfopaxilina (P-Pax), ambas proteínas claves en el ensamblaje de las

adhesiones focales. Como se mencionó en la introducción, las integrinas una vez que se encuentran en su conformación activa reclutan a varias proteínas adaptadoras con actividad quinasa, entre ellas Fak, Src y Paxilina (esta última es fosforilada por Src) [Parsons y col., 2010]. En primer lugar, las células con pérdida de función de Gai2 muestran adhesiones focales más grandes, en comparación a células control (Fig. 11E-H), mientras que en las células morfantes para Ric-8A casi no es posible visualizar adhesiones focales (Fig. 11I-L). La longitud de las adhesiones focales fue cuantificada a través del programa ImageJ y el análisis estadístico se realizó mediante test ANOVA de una vía, encontrándose que la longitud promedio de las adhesiones focales de células morfantes para Gai2 es de $13,2 \mu\text{m}$ ($\pm 1,9 \mu\text{m}$, n total = 48), significativamente mayor a la longitud de las células controles ($8,11 \mu\text{m}$; $\pm 2,95 \mu\text{m}$, n total = 49). Asimismo, las células morfantes para Ric-8A muestran adhesiones focales significativamente más cortas ($1,34 \mu\text{m}$; $\pm 0,75 \mu\text{m}$, n total = 48); (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$). También se cuantificó el número de adhesiones focales por condición encontrándose una disminución significativa de adhesiones focales en células morfantes para Ric-8A (valor que se normalizó con respecto al control; n total = 20; ***, $p < 0,001$) con respecto al control, mientras que el número de adhesiones focales de células morfantes para Gai2 aumentó con respecto al control, aunque esta diferencia no es significativa (ns, n total = 25). Estos resultados sugieren que la inhibición de la migración en células morfantes para Gai2 y Ric-8A es producto de un efecto sobre la formación y dinámica de las adhesiones focales.

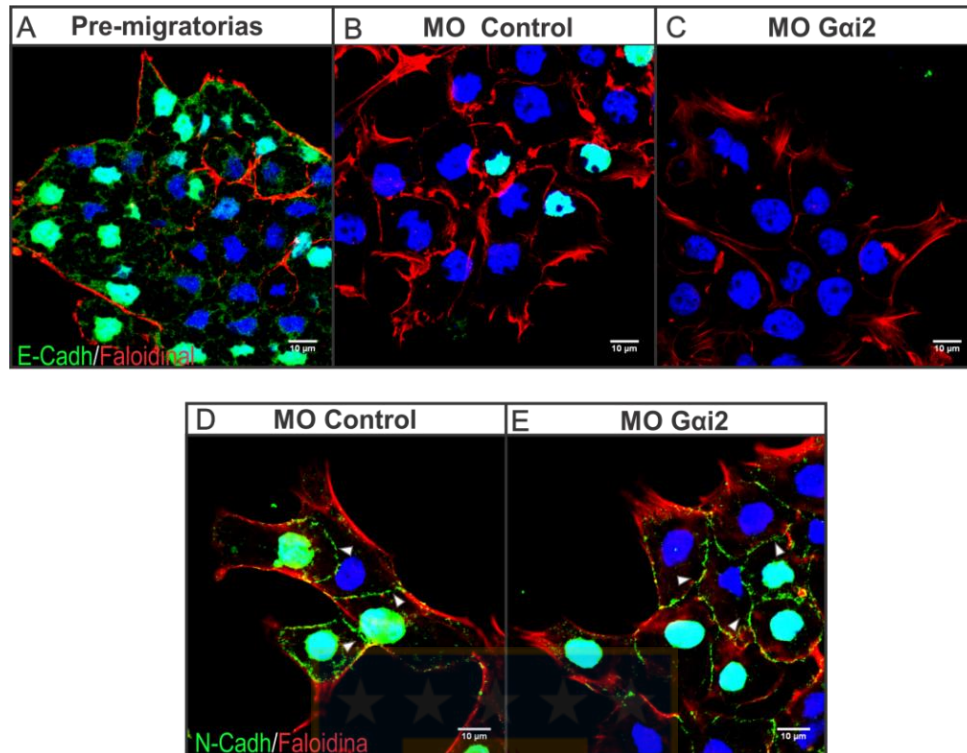


Figura 10. Estudio de la expresión de cadherinas en explantes controles y morfantes para Gai2 en estadios pre-migratorios y migratorios de CNC

(A-E) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. En (A) se observa la expresión de E-cadherina (verde) en las uniones célula-célula de CNC pre-migratorias controles. (B-C) Explantes de embriones control y morfantes para Gai2 en etapa “migratoria”, respectivamente. En ellas no es posible observar la expresión de E-cadh en la unión célula-célula. (D-E) Explantes de CNC control y morfantes para Gai2 en etapa migratoria, respectivamente. En verde se observa la expresión de N-cadh en la unión célula-célula.

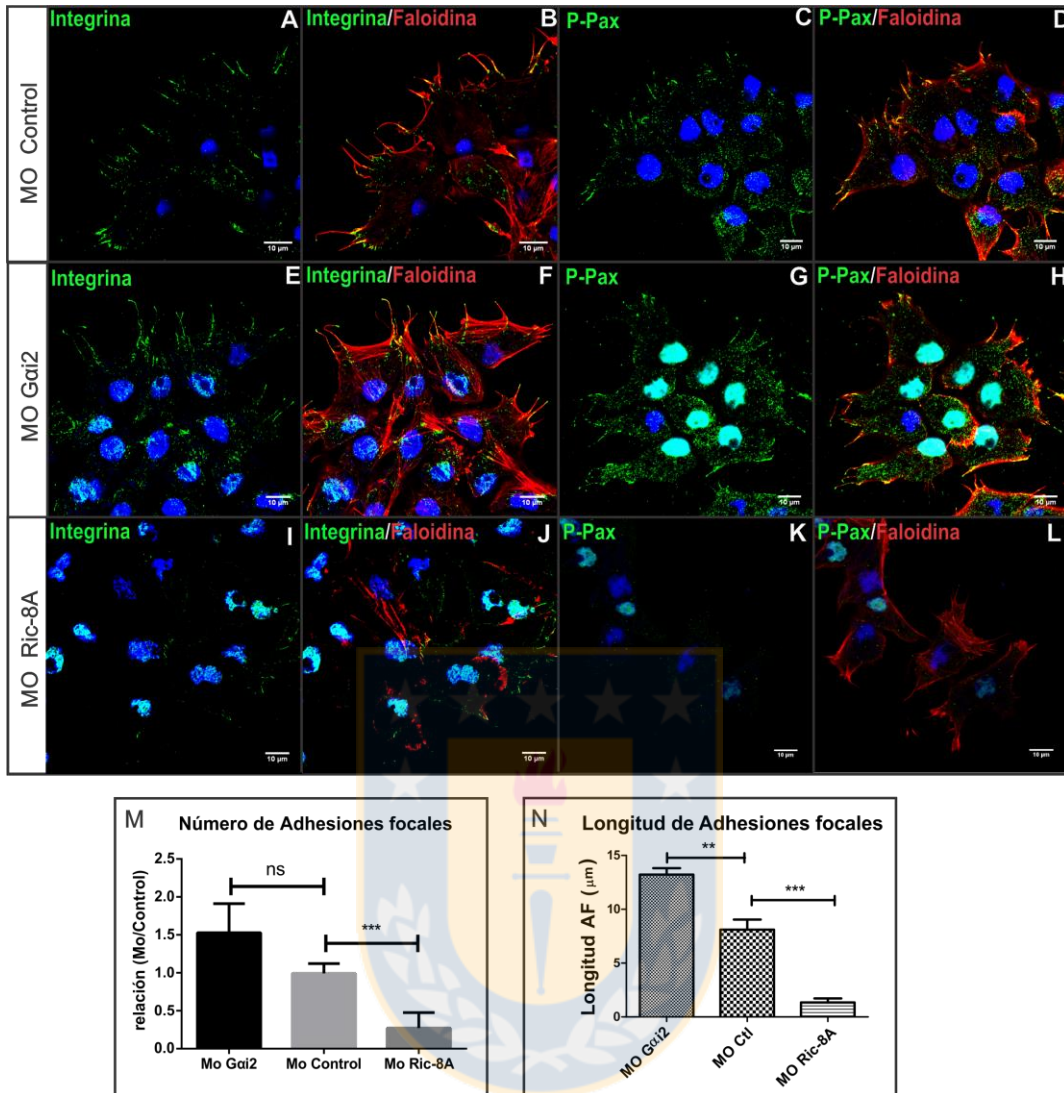


Figura 11. Análisis del efecto de la pérdida de función de Gai2 y Ric-8A en la formación de las adhesiones focales

(A-L) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. En (A-D) se observan (en verde) las adhesiones focales de células controles, visualizadas con anticuerpo anti β -integrina (A-B) y P-Pax (C-D). (E-H) Adhesiones focales de células morfantes para Gai2 visualizadas con anticuerpo anti β -integrina (E-F) y P-Pax (fosfopaxilina) (G-H). (I-L) Adhesiones focales de células morfantes para Ric-8A visualizadas con anticuerpo anti β -integrina (I-J) y P-Pax (K-L). En rojo se observa la marca con faloidina. En (M-N) se observa la cuantificación del número y longitud de adhesiones focales de las células en las tres condiciones de estudio por ImageJ. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía (ns: no significativo; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$).

Como se describió en la introducción, es la inhibición de la locomoción por contacto (CIL) el mecanismo propuesto que le otorga a la célula de la CNC la polaridad antero-posterior durante la migración colectiva [Mayor y col., 2010; Theveneau y col., 2011]. Durante este proceso deben ocurrir una serie de cambios a nivel de los componentes celulares, de los cuales ya hemos estudiado algunos de ellos, en esta tesis: el citoesqueleto de microtúbulos se encarga de orientar núcleo y golgi en la dirección de la migración, además del transporte de diferentes proteínas adaptadoras a la membrana celular (por ejemplo para el ensamblaje de las adhesiones focales); el citoesqueleto de actina debe formar fibras de estrés y protrusiones en la dirección de la migración, etc [Lodish y col., 2000]. Sin embargo, para que estos cambios ocurran deben activarse ciertas proteínas G pequeñas. Cdc42 es el encargado de la organización de los microtúbulos, la que a su vez activa a Rac1 (encargada de la formación de protrusiones a través de la remodelación del citoesqueleto de actina), y esta última inhibe a RhoA [Nobes y col., 1999; Vicente-Manzanares y col., 2009; Machacek y col., 2009; Spiering y col., 2011; Ridley y col., 2015]. Es así entonces que la forma activa de estas proteínas G pequeñas pueden ser utilizadas como marcadores de polaridad durante un proceso migratorio [Carmona-Fontaine y col., 2008; Matthews y col., 2008; Theveneau y col., 2010].

Por lo tanto, durante este trabajo de tesis, una de los métodos utilizados para el estudio de la polaridad celular, fue el análisis de la localización de la proteína G pequeña activa Rac1 durante la migración colectiva de las células de la CNC, en las diferentes condiciones celulares. Para ello se microinyectó el ARN mensajero del constructo pGBD-GFP, el cual corresponde a un dominio de unión a proteína G de la proteína PAK1 (un efector de Rac1) [Breznau y col., 2015]. Como este constructo se encuentra fusionado a GFP, esto permite que podamos seguir la expresión de Rac1 activa *in vivo* en las células de la CNC. Como podemos observar en la Fig. 12, durante CIL las células control experimentan una disminución de la expresión de Rac1 activa en la zona de colisión, ya que en esa zona se activa RhoA (punta de flecha blanca, escala de pseudocolor de ImageJ); sin embargo, las células que son morfantes para Gai2 experimentan un aumento

en la expresión de Rac1 en la zona de colisión (Fig. 13, punta de flecha blanca – escala de pseudocolor de ImageJ). Las imágenes se obtuvieron cada 2 minutos durante 1 hora a 26°C, tiempo y temperatura suficientes para favorecer la migración radial de las células control. Sin embargo este resultado es aún preliminar, necesitamos mayor número de ensayos para estandarizar mejor y poder cuantificar los resultados.

Dentro del mismo contexto, se ha visto a la proteína Par3 involucrada en establecer la polaridad celular en el modelo de CNC en *Xenopus*, ya que estaría regulando negativamente a Rac1 en el contacto célula a célula y la zona de colisión, promoviendo la catástrofe o desensamblaje de los microtúbulos y contribuyendo de esta forma al mecanismo de CIL durante la migración colectiva de las células de CNC [Moore, R., y col. 2013]. Es por esta razón que se decidió estudiar la localización de Par3 en células control y morfantes para Gai2, ya que estas últimas muestran deslocalización de Rac1 durante CIL. Como se observa en la Fig. 14 A, en células controles, Par3 se localiza en las zonas de colisión durante la migración de las células de CNC (puntas de flecha blanca indican unión célula-célula y zonas de colisión). No obstante, en explantes morfantes para Gai2 ocurre una deslocalización evidente de Par3 (Fig. 14 B), incluso prácticamente no se observa expresión de Par3.

Todos estos resultados sugieren que la pérdida de función de Gai2 afecta la localización de marcadores de polaridad celular durante la inhibición de la locomoción por contacto.

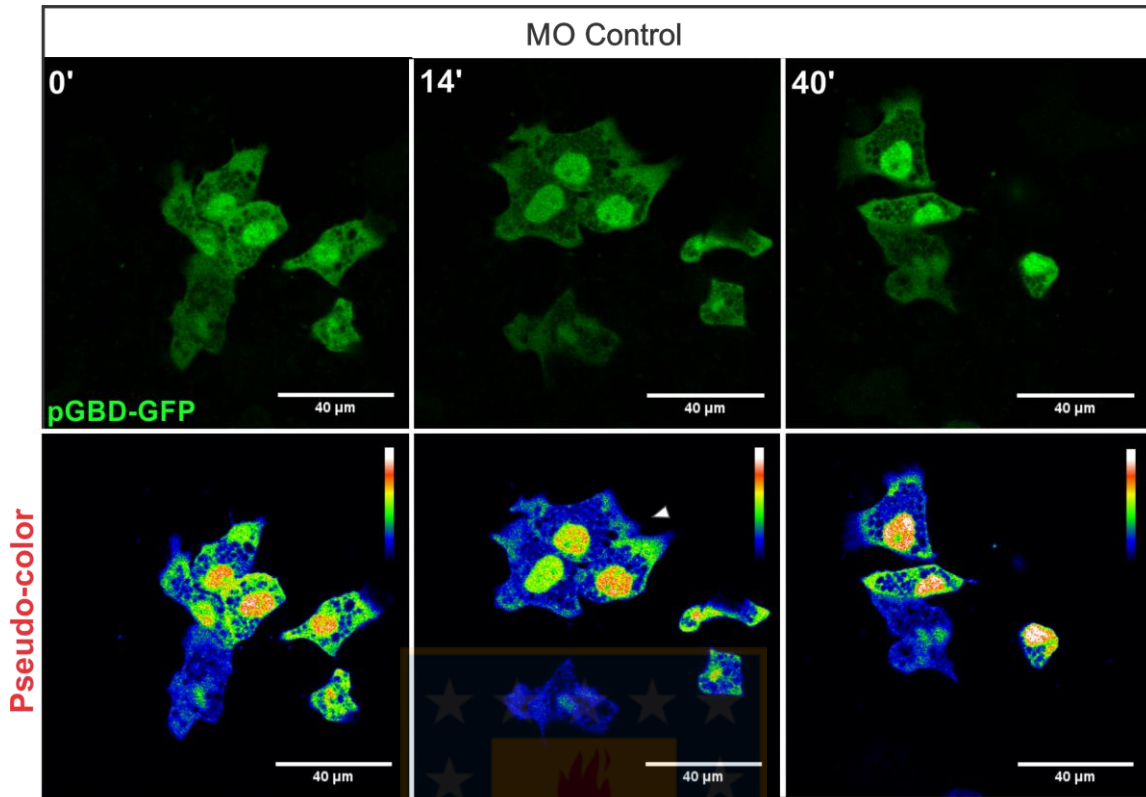


Figura 12. Expresión de Rac1 activa en células de CNC controles durante CIL

“Time-lapse” de explantes controles provenientes de embriones microinyectados con la sonda pGBD-GFP. En verde se observa la localización de la proteína Rac1 activa (panel superior). En el panel inferior se observa la escala de pseudo-color de ImageJ, el cual mide intensidad de fluorescencia (desde azul a blanco). La punta de flecha blanca indica la zona de colisión durante CIL, evidenciando la baja expresión de Rac1 en esa zona.

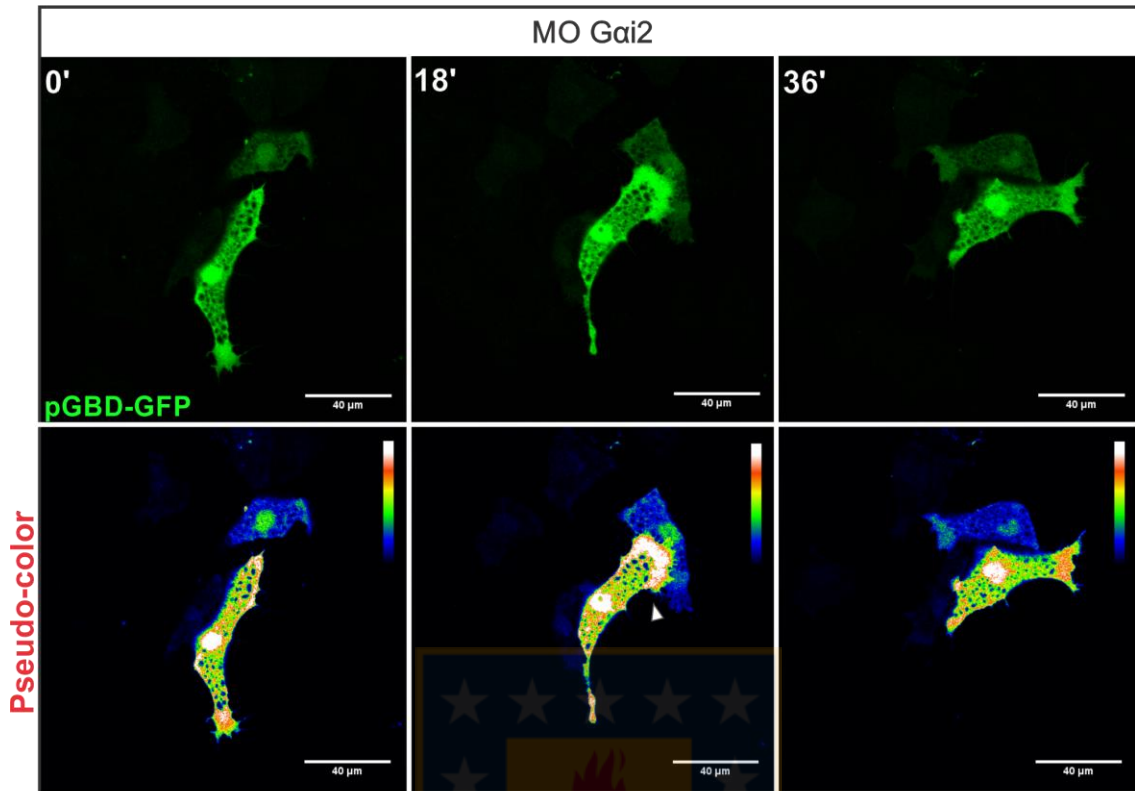


Figura 13. Expresión de Rac1 activa en células de CNC morfantes para Gai2 durante CIL

“Time-lapse” de explantes morfantes para Gai2 provenientes de embriones microinyectados con la sonda pGBD-GFP. En verde se observa la localización de la proteína Rac1 activa (panel superior). En el panel inferior se observa la escala de pseudo-color de ImageJ, el cual mide intensidad de fluorescencia (desde azul a blanco). La punta de flecha blanca indica la zona de colisión durante CIL, donde se muestra una alta expresión de Rac1 activa.

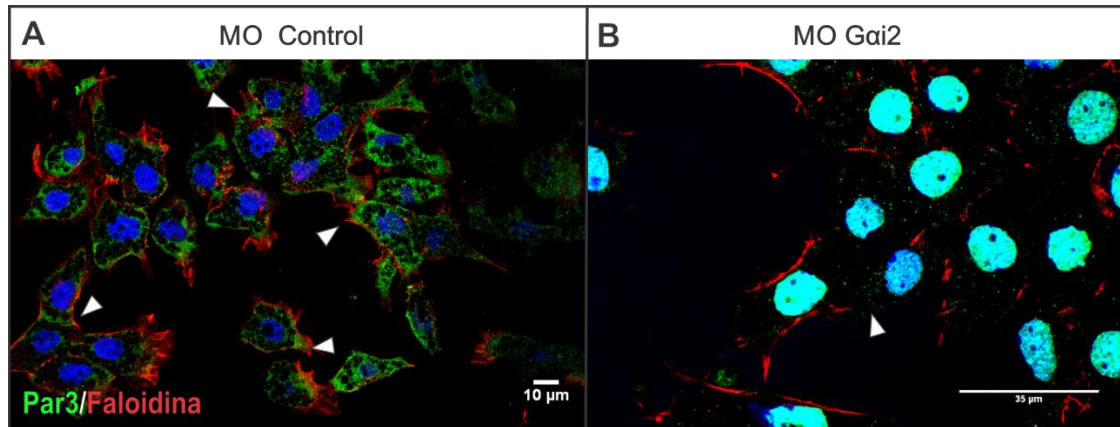


Figura 14. Localización de Par3 en células de la CNC controles y morfantes para Gai2

(A-B) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia. **(A)** Localización de Par3 en células microinyectadas con MO Control durante la migración colectiva (verde, flechas blancas indican localización en unión célula-célula, zonas de colisión y protrusiones). **(B)** Localización de Par3 en condiciones morfantes para Gai2 (núcleos verdes producto de la expresión de H2B-GFP utilizado como trazador de linaje).

Discusión

I) Gai2 y Ric-8A regulan la migración de las células de CNC

Ric-8A es una proteína citosólica altamente conservada en la evolución e identificada inicialmente en *Caenorhabditis elegans*, a la cual se le asignó un papel regulador en las divisiones celulares asimétricas [Afshar y col., 2004; Couwenbergs y col., 2004; Afshar y col., 2005]. Esta proteína constituye un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para la familia de las proteínas Gai, Gaq y Gα12/13 y ha sido descrita también como chaperona molecular requerida para la asociación inicial de las subunidades Gα nacientes con membranas celulares [Gabay y col., 2011; Chan y col., 2013]. Dentro de la familia de Gai se han identificado 4 tipos: Gai1, Gai2, Gai3 y Gao, pero fundamentalmente se ha relacionado a Gai2 en eventos de migración celular [Wiege y col., 2012]. Gai2 ha sido descrita regulando la migración de macrófagos y células T hacia los sitios de inflamación, en el tráfico de linfocitos B y neutrófilos en respuesta a señales quimioattractantes y durante la migración de células metastásicas en cáncer de próstata [Hwang y col., 2007; Cho y col., 2012; Wiege y col., 2012; Zhong y col., 2012; Hwang y col., 2015]. Además, en nuestro laboratorio ya habíamos identificado a Ric-8A como regulador clave en la migración de las células de CNC en *Xenopus* [Fuentealba y col., 2013], lo que concuerda con varios trabajos donde se ha silenciado Ric-8A y se ha observado la pérdida de la capacidad migratoria tanto en fibroblastos de embriones de ratón [Wang y col., 2011] como en linfocitos B [Boullaran y col., 2015].

Durante el desarrollo de esta tesis se identificó a la subunidad Gai2 cumpliendo un papel regulatorio en la misma vía de señalización de Ric-8A, ya que Gai2 es capaz de rescatar el fenotipo morfante para Ric-8A, recuperando así la migración de las células de CNC en ensayos *in vivo* (Fig. 2B). Sin embargo, Ric-8A no es capaz de rescatar el fenotipo inducido por el silenciamiento de Gai2 (Anexo IA), lo que sugiere que Gai2 se encuentra río abajo de la cascada de señalización, lo que es

coherente con su función como GEF y como chaperona descrita previamente [Gabay y col., 2011].

Con respecto a la metodología, en nuestro laboratorio ya se había estandarizado la cantidad de morfolino de Ric-8A necesaria para inhibir la migración de las células de CNC en *Xenopus tropicalis* [Fuentealba y col., 2013], por lo tanto sólo fue necesario estandarizar la cantidad óptima de morfolino contra Gai2 capaz de inhibir la migración de estas células *in vivo* e *in vitro* en el modelo de *Xenopus tropicalis* (Fig. 3B). La cantidad estandarizada (20 ng) no fue capaz de afectar la inducción de las células de la CNC (Anexo IB). Al mismo tiempo, el morfolino contra Gai2 también fue validado en el modelo *Xenopus laevis* (Anexo IC) mediante la estandarización de la cantidad necesaria para afectar la migración de las células de CNC, sin afectar la inducción de éstas, donde se determinó que 35 ng de MOGai2 eran suficientes para inhibir la migración de las células de CNC de *Xenopus laevis in vivo*, demostrando también la alta conservación de estos genes en estos modelos cercanos.

Consecutivamente se analizó la migración *in vitro* de las células de la CNC en ausencia de una señal quimiotáctica. Para ello fue necesario estandarizar la técnica que consiste en la extracción de explantes de CNC en estadio 17 de desarrollo embrionario, para sembrarlos sobre una matriz de fibronectina, esto debido a que las células de CNC expresan integrinas las cuales participan como “receptores de fibronectina” para establecer adhesiones focales [Clark y col., 1995]. Esta técnica se aplicó para células extraídas de embriones microinyectados con morfolino contra Gai2 y comparados con embriones microinyectados con un morfolino control (Fig. 5). Previamente en nuestro laboratorio ya se había analizado la migración radial de las células de CNC morfantes para Ric-8A, observándose que no son capaces de dispersarse, lo que no fue necesario replicar en esta tesis [Fuentealba y col., 2013]. Las imágenes fueron obtenidas cada 3 minutos por 4 horas a 26°C, tiempo suficiente y temperatura óptima para favorecer la migración radial de las células. Se observó que las células de CNC

morfantes para Gai2 pierden totalmente su capacidad de dispersarse sobre el sustrato, al igual que las células morfantes para Ric-8A, como se describió en Fuentealba y col., (2013), y a diferencia de lo que ocurre en los explantes control, los cuales se dispersan eficientemente a las 4 horas. Estos resultados, en conjunto con los obtenidos *in vivo* estarían validando la participación de Gai2 y Ric-8A durante la migración celular, además Gai2 se encontraría río abajo de la señalización de Ric-8A, apoyando su función como GEF y chaperona [Gabay y col., 2011], y por otro lado apoyando también la función de Gai2 ya descrita regulando la migración en otros tipos celulares derivados del sistema inmune [Hwang y col., 2007].

Con el fin de ahondar en el mecanismo de cómo Ric-8A y Gai2 regulan la migración, se estudió la localización subcelular de Ric-8A y Gai2 en las células de la CNC durante la migración *in vitro*. Se encontró que ambas proteínas se ubican en la zona de la corteza celular hacia las protrusiones que forma el borde director, y no en la unión célula-célula (Fig. 6A-B). Además se validó la especificidad del morfolino contra Gai2 mediante inmunofluorescencia contra la proteína endógena (Fig.7A-B) y “*western blot*” (Fig. 7E), encontrándose una baja expresión de la proteína en células morfantes para Gai2. Por otro lado, la pérdida de función de Ric-8A en las células de CNC muestra la deslocalización evidente de Gai2 (Fig. 7C), prácticamente pareciera que estuviera ausente, lo que podría estar relacionado con la actividad chaperona de Ric-8A sobre las diferentes subunidades G α , permitiendo que éstas se plieguen de forma correcta y sean eficientemente translocadas a membrana [Gabay y col., 2011]. Por otro lado se observó mediante “*western blot*” que los niveles de la proteína Gai2 en condiciones morfantes para Ric-8A se mantienen constantes (Fig. 7E), lo que no concuerda con estudios en los cuales se ha visto que líneas “knock-out” para Ric-8A derivadas de linfocitos B embrionarios muestran defectos en la señalización de la proteína G heterotrimérica y una pérdida de aproximadamente un 85% de los niveles proteicos de Gai1, **Gai2**, Gai3 y Gai4 producto de una tasa acelerada de degradación de las proteínas [Boullaran y col., 2015]. Se cree que lo observado en

esta tesis se debe al protocolo de medición de los niveles proteicos, donde se co-inyectó el morfolino contra Ric-8A y el ARN mensajero de Gai2 asociado a V5 (para análisis por “*western blot*”), epítoto que podría estar interfiriendo con la señal de degradación (Fig. 7E). Cabe destacar además que el anticuerpo que se utilizó para los análisis es monoclonal (tanto el anticuerpo anti Gai2 como el anticuerpo anti V5), lo que podría explicar que no seamos capaces de ver la proteína Gai2 por inmunofluorescencia (ya que la proteína se encuentra mal plegada producto de la ausencia de Ric-8A, lo que podría “enmascarar” el epítoto) pero sí por “*western blot*”, donde la proteína se encuentra denaturada y por ende el epítoto se encuentra expuesto. Para corroborarlo sería interesante utilizar un anticuerpo policlonal contra la proteína Gai2 endógena en embriones morfantes para Ric-8A.

II) Gai2 y Ric-8A regulan las propiedades de adhesión de las células migratorias

Con el fin de continuar con el estudio del mecanismo de regulación de estas proteínas sobre la migración, y considerando que previamente en nuestro laboratorio se describió que células de la CNC morfantes para Ric-8A presentan defectos en la formación de adhesiones focales [Fuentelba y col., 2013], se analizó la expresión del marcador de adhesiones focales maduras fosfopaxilina (PPax) en células morfantes para Gai2 y se comparó con el fenotipo morfante para Ric-8A. Al igual que lo descrito por Fuentelba y col., 2013; se observó que las células morfantes para Ric-8A presentan una disminución en el número y tamaño de las adhesiones focales (Fig. 11K-L), no así las células morfantes para Gai2 las cuales presentan adhesiones focales de mayor longitud que las células control (Fig. 11G-H). Se ha descrito que la fosforilación en residuos de tirosina de la proteína paxilina que normalmente ocurre en respuesta a la adhesión con la matriz extracelular a través de la activación de la “quinasa de adhesión focal” (FAK) y Src [Burrige y col., 1992], puede ser promovida por otras proteínas efectoras de diferentes subunidades $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica [Rozenfurt, 2007]. Es por esta razón que se cree que en los ensayos de pérdida de función de Ric-8A,

los niveles de fosforilación de la proteína paxilina podrían estar drásticamente reducidos, lo que explicaría el fenotipo observado. Al silenciar Ric-8A estaríamos afectando distintas vías de señalización, ya que esta proteína interacciona y actúa como GEF sobre distintas subunidades $G\alpha$, las cuales podrían ser sumatorias sobre un mismo efector final o en contraposición.

Por lo tanto, el aumento de la longitud de la adhesión focal en las células morfantes para Gai2 observada en este trabajo de tesis, podría ser producto de una disminución en la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales, impidiendo el recambio, estabilizando la adhesión focal y con ello disminuyendo la motilidad celular. Esta explicación concuerda con estudios en los que se ha observado en fibroblastos humanos y células endoteliales que el tratamiento temprano de células migratorias con toxina pertussis (PTX) inhibe el desmontaje de la adhesión focal [Sugiura y col., 1996; Orr y col., 2002; Orr y col., 2003]. Asimismo también el tratamiento con péptidos permeables a la membrana que bloquean la subunidad **Gai2** inhiben el desensamblaje de la adhesión focal mediado por trombospondina (TSP), una proteína matricelular que promueve el desensamblaje de fibras de estrés y adhesiones focales vía **PI3K** [Orr y col., 2002]. La proteína trombospondina también ha sido estudiada durante la migración de las células de CN en embriones de pollo, donde se ha visto que las células son capaces de migrar más rápido en presencia de trombospondina [Tucker y col., 1999].

Clásicamente sabemos que la quinasa de adhesión focal “FAK” es una tirosina quinasa citoplasmática que se localiza en adhesiones focales y es capaz de unirse a varias proteínas de adhesión focal, incluyendo **paxilina** [Hildebrand y col., 1995], talina [Chen y col., 1995] y el dominio citoplasmático de las **integrinas** [Schaller y col., 1995], activándose en eventos de migración celular. Sin embargo, FAK se ha vinculado a una extensa red de proteínas de señalización que regulan el nacimiento, maduración y recambio de la adhesión focal [Clark y Brugge, 1995]. Esta red proteica incluye a algunas proteínas como Grb2 [Schlaepfer y col., 1994]

y **PI3K** [Chen y Guan, 1994], esta última anteriormente descrita en la regulación del desensamblaje de la adhesión focal y actualmente vinculada a la proteína **Gai2** [Orr y col., 2002]. Es por esta razón que sería interesante evaluar la dinámica de las adhesiones focales en ausencia de Gai2 y Ric-8A, ya que se cree que **Gai2** estaría regulando el desensamblaje de las adhesiones focales a través de PI3K y **Ric-8A** el ensamblaje, a través de proteínas efectoras de la familia de proteínas G que regularían la fosforilación de paxilina. No obstante también se describió que la sobreexpresión de G α 12/13 estimula la formación de fibras de estrés y de adhesiones focales a través de la activación de la proteína G pequeña Rho [Buhl y col., 1995], lo que sugiere que Ric-8A podría regular la formación de adhesiones focales a través de G α 13. Al respecto en nuestro laboratorio hemos demostrado previamente que Ric-8A también es capaz de regular la migración de las células de CNC junto con G α 13, a través de la regulación de la formación del complejo de adhesiones focales vía Src-FAK lo que se relaciona con la vía “*in side out*” de las integrinas [Toro-Tapia G., Tesis doctoral, 2016]. Sin embargo no se descarta que Ric-8A regule también el desensamblaje junto con Gai2, efecto que se ve “enmascarado” debido a la falta de formación de adhesiones focales en las células morfantes para Ric-8A.

Por otro lado, Ric-8A no es el único GEF relacionado con la señalización de las integrinas. El GEF **GIV/Girdin** es una proteína que ha sido descrita regulando las adhesiones focales en células metastásicas a través de la activación de la subunidad Gai3 y se ha relacionado con la remodelación del citoesqueleto y la mantención de la integridad de las adhesiones focales mediante la activación de FAK [Leyme, A., y col., 2015; Lopez-Sanchez, I., y col., 2015]. No obstante, GIV/Girdin ha sido ampliamente estudiado como GEF para la proteína Gai, por lo que tampoco se descarta que Gai2 esté participando junto con GIV en la dinámica de adhesiones focales [Leyme y col., 2015; Lopez-Sanchez y col., 2015]

III) Gai2 y Ric-8A regulan la morfología y polaridad celular durante la migración colectiva

Citoesqueleto de actina

En esta tesis se observó que la pérdida de función de Ric-8A y Gai2 afecta fuertemente la morfología celular, observándose una disminución considerable en la longitud de las protrusiones de células migratorias morfantes para Ric-8A y un aumento significativo en la longitud de las protrusiones de células migratorias morfantes para Gai2 (Fig. 9A-C). La formación de las protrusiones (filopodios, lamelipodios, invadopodios/podosomas) es impulsada por la polimerización de actina regulada espacial y temporalmente en el borde director de la célula, lo que permite mantener la polaridad antero-posterior durante la migración [Pollard y col., 2003]. Una de las proteínas G pequeñas remodeladoras del citoesqueleto de actina que regula la polaridad celular es la GTPasa Rac1, la cual se encuentra principalmente activa en el borde director de la célula migratoria regulando la formación de lamelipodias [Nobes y col., 1995; Ridley y col., 2015]. Un estudio reciente demostró que el quimioattractante CXCL12 (Sdf1) se une al receptor CXCR4 en células de cáncer de mama, estimulando la asociación de **Gai2** (activa) con Elmo1, promoviendo la translocación del complejo Elmo1/Dock180 a la membrana celular lo que conduce a la activación de Rac1, lo que a su vez promueve la remodelación del citoesqueleto de actina, la migración e invasión [Li y col., 2013]. Esto también fue descrito en macrófagos para la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina durante la fagocitosis [Huang y col., 2014], lo que concuerda con el cambio en la morfología celular de explantes morfantes para Gai2 (Fig. 9C) observado por nosotros, posiblemente debido a una desregulación en la activación de Rac. Asimismo otros estudios han demostrado la participación de Ric-8A en la remodelación del citoesqueleto de actina a través de la formación de “ruffles” vía proteína Gα13 [Wang y col., 2011], además de organizar la actina cortical y reforzar la resistencia de las células contra la deformación [Kanesaki y col., 2013], lo que podría explicar el cambio drástico en la morfología celular en ensayos de pérdida de función de Ric-8A (Fig. 9B), probablemente producto de la

falta de resistencia a la deformación y/o a la desregulación de proteínas G pequeñas remodeladoras del citoesqueleto de actina.

Ric-8A y Gai2 Citoesqueleto de tubulina

La migración celular es un proceso polarizado el cual depende de un borde anterior protrusivo que se opone a un borde posterior retráctil. Desde el frente hacia atrás, las fuerzas mediadas por actina son capaces de promover secuencialmente la formación de protrusiones, la adhesión, contracción y retracción [Mattila y col., 2008]. Sin embargo, en la última década los microtúbulos han adoptado un papel fundamental en el proceso de migración celular debido a que se han descrito regulando todos los eventos esenciales para la migración a través de sus funciones en la mecánica celular, el tráfico intracelular y la señalización, lo que se asocia a la dinámica y estabilidad de la red de microtúbulos a lo largo del eje de migración [Etienne-Manneville, 2013]. Durante el desarrollo de esta tesis se observó que las células morfantes para Gai2 mostraron defectos a nivel de la distribución del citoesqueleto de tubulina (Fig. 8B) en comparación a las células control, observándose un aumento en la polimerización de tubulina hacia el borde director de los explantes donde se encuentran las células “líderes”, y muy disminuido hacia las células más internas del explante (Fig. 8B, escala de pseudocolor). Se ha descrito que la despolimerización de la red de microtúbulos o incluso una ligera alteración en la dinámica de los microtúbulos produce una alteración severa en la formación de las protrusiones [Laan y col., 2008], ya que clásicamente se sabe que el crecimiento de los microtúbulos activa a la proteína G pequeña Rac, que a su vez promueve la formación de lamelipodios [Waterman-Storer y col., 1999]. Asimismo, otros estudios han demostrado que los microtúbulos son capaces de interactuar con filamentos intermedios, los cuales forman una zona densa y resistente, contribuyendo a la correcta morfología celular durante la migración [Herrmann y col., 2000], lo que podría explicar el aumento de la longitud de las protrusiones de células de CNC morfantes para Gai2, evidenciando una completa falta de “resistencia a la deformación” producto de alteraciones en el citoesqueleto de tubulina.

Por otro lado, la pérdida de función de Ric-8A también provocó un cambio en el citoesqueleto de tubulina, aunque no tan drástico como en células morfantes para Gai2, aumentando las zonas de polimerización de ésta hacia el borde director de las células “líderes” (Fig. 8C, escala de pseudocolor). La morfología celular también se vio drásticamente afectada, en este caso por la formación de protrusiones más pequeñas, lo que podría tener relación con la disminución en la formación de las adhesiones focales provocando una mayor inestabilidad de las protrusiones y con ello un menor tamaño de éstas [Fuentealba y col., 2013; Toro-Tapia G., Tesis doctoral, 2016]. Cabe destacar que las tres condiciones celulares fueron analizadas 1 hora post-disección, de manera de que los explantes control no alcanzaran a dispersarse.

Resumiendo, las células morfantes para Gai2 además de protrusiones grandes presentan adhesiones focales de mayor longitud, lo que sugiere potenciales defectos en la dinámica de desensamblaje de la adhesión focal. Por otro lado, el fenotipo de los microtúbulos observado en las células morfantes para Gai2 se relaciona con que los microtúbulos también se encuentran participando en el tráfico celular, de manera de que un potencial cambio a nivel de los microtúbulos puede desencadenar defectos en el tráfico de diferentes cargos hacia o desde la membrana, entre ellos por ejemplo, el ensamblaje y desensamblaje de la adhesión focal [Lodish y col., 2000]. Estudios han relacionado una interacción indirecta de los microtúbulos sobre las adhesiones focales, facilitando el desmontaje de la adhesión focal desacoplando las integrinas de la matriz extracelular (reciclaje de integrinas) [Ezratty y col. 2005; Chao y Kunz 2009; Margadant y col., 2011]. En este contexto, otra proteína que interacciona con los microtúbulos es la dinamina, la cual es requerida para el desmontaje de la adhesión focal [Shpetner y Vallee 1992; Ezratty y col. 2005; Chao y Kunz 2009], por lo que sería interesante evaluar el tráfico de dinamina e integrinas en células morfantes para Gai2. No obstante, debido a que el fenotipo de las células morfantes para Ric-8A no es tan drástico como el fenotipo observado para Gai2, se hace necesario evaluar el tráfico de ambas proteínas en células morfantes para Ric-8A para así evaluar su participación en el desensamblaje de la adhesión focal.

Gai2 durante la Inhibición de la locomoción por contacto

Como se mencionó en la introducción, el proceso de inhibición de la locomoción por contacto (CIL) es el principal mecanismo propuesto por el cual las células de la CNC migran en ausencia de señales externas. Las células al encontrarse, colapsan sus protrusiones y se repolarizan posterior al contacto con otra célula, cambiando de dirección de migración [Mayor y col., 2010; Theveneau y col., 2011]. Algunos reguladores moleculares de CIL se han identificado en los últimos años, tales como **GTPasas pequeñas**, señalización de polaridad celular planar (PCP), N-cadherina y Eph/ephrinas [Carmona-Fontaine y col., 2008, Kadir y col., 2011; Matthews y col., 2008; Theveneau y col., 2010], pero aún continúa siendo desconocido cómo estas moléculas pueden controlar la remodelación del citoesqueleto para una respuesta de inhibición de la locomoción por contacto.

Recientemente se ha descrito que durante CIL existe la formación de una adhesión celular transitoria por **inhibición de Rac1** en el contacto celular entre las células de la CN, lo que promueve el colapso de las protrusiones y desensamblaje de adhesiones focales [Theveneau y col., 2010, Theveneau y col., 2013]. Por otro lado en las células epiteliales, Par3 se asocia con complejos de adhesión célula-célula y parece ser importante para establecer la polaridad apico-basal de la célula, al igual que **Gai** [Hao y col., 2010]. Asimismo, Par3 ha sido relacionado con la regulación de la dinámica de los microtúbulos y la activación de Rac1 a través de la interacción con el Rac-GEF Tiam1 [Chen y col., 2013]. Además, recientemente se encontró que Par3 regula la inhibición de la locomoción por contacto en las células de CNC en *Xenopus*, promoviendo la catástrofe o desensamblaje de los microtúbulos en el contacto celular (durante la colisión) a través de la **inhibición de la señalización de Rac1/Trio** [Moore y col., 2013]. Debido a que nuestros resultados sugieren que Gai2 posiblemente se encuentra regulando la dinámica de microtúbulos y el desensamblaje de adhesiones focales en las células de CNC, decidimos estudiar la localización espacio-temporal de Rac1 activa en células morfantes para Gai2 durante CIL, encontrándose que Rac1 permanece fuertemente activa en el sitio de colisión (Fig. 13, escala de

pseudocolor), lo que no ocurre en las células control (Fig. 12, escala de pseudocolor). Este hallazgo, pese a ser preliminar, podría dar cuenta del posible papel que podría estar cumpliendo Gai2 en la inhibición de la locomoción por contacto, probablemente regulando la dinámica del citoesqueleto de tubulina y el desensamblaje de adhesiones focales. Sería interesante estudiar a través de qué mecanismo Gai2 podría estar controlando este proceso, y si es que Ric-8A estaría participando junto con Gai2.

Finalmente, observamos que Par3 en las células de CNC de *Xenopus* se localiza en las uniones célula-célula y zonas de colisión durante CIL (Fig. 14A), a diferencia de lo observado en células morfantes para Gai2 donde sorprendentemente Par3 se encuentra deslocalizada (Fig. 14B), lo que nos permite sugerir un modelo donde Gai2 podría estar junto con Par3 regulando la inhibición de la locomoción por contacto a través de la dinámica de microtúbulos y desensamblaje de adhesiones focales (Fig 15, modelo final).

IV) Modelo Final

A partir de los resultados de esta tesis se propone el siguiente modelo de la posible función de Ric-8A y Gai2 durante la migración colectiva y direccional de las células de CNC:

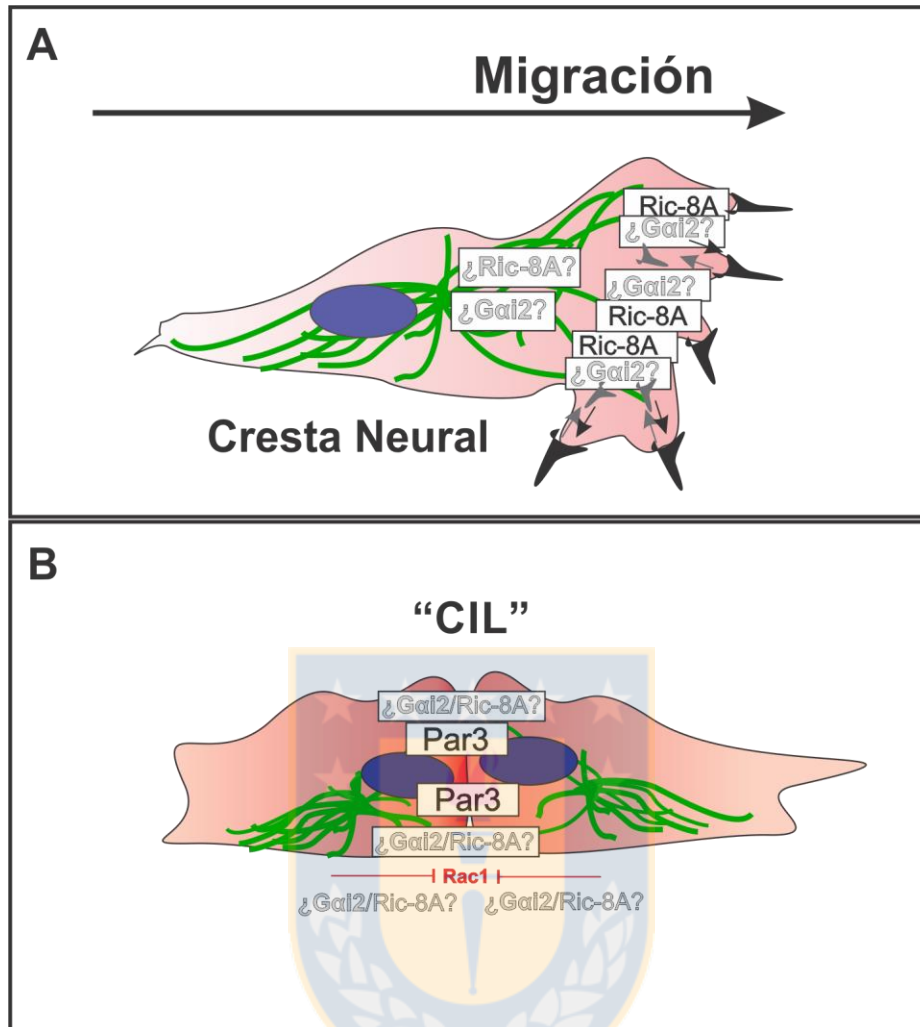


Figura 15. Modelo Final

(A) La flecha negra muestra la direccionalidad de la migración. El gradiente de color representa la polarización celular durante la migración. Las espinas negras representan el montaje de las adhesiones focales y las espinas grises representan el desmontaje de las adhesiones focales. El citoesqueleto de tubulina está representado en verde. Se sugiere que Ric-8A a través de Gai2 podría estar controlando la dinámica de adhesión y la organización de los microtúbulos de las células de CNC, regulando así la morfología, específicamente la formación de las protrusiones durante la migración direccional. En la figura B se representa la “inhibición de la locomoción por contacto” donde actúa Par3 (en negro, zona de colisión). El gradiente de color representa la polarización celular durante la colisión. En gris se observa a Gai2 posiblemente inhibiendo a Rac1 (en la zona de colisión) en el cambio de polaridad celular durante CIL, actuando junto con Ric-8A ya que cumple un rol de chaperona para Gai2. [Fuente: Elaboración propia].

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se puede concluir que:

1. Ric-8A junto a Gai2 regulan la migración de las células de CNC *in vivo*.
2. El silenciamiento de Gai2 inhibe la migración radial de las células de CNC *in vitro*, en ausencia de señales externas.
3. Ric-8A y Gai2 se localizan en la zona del borde director de la célula migratoria y no en el contacto célula-célula, además forman parte del mismo complejo de interacción.
4. Ric-8A y Gai2 participan en la formación de protrusiones en las células de CNC a través de la remodelación del citoesqueleto de actina.
5. Tanto el silenciamiento de Gai2 como de Ric-8A muestran cambios en el citoesqueleto de tubulina en las células de CNC de *Xenopus*.
6. La pérdida de función de Ric-8A y Gai2 afecta el número y longitud de adhesiones focales en las células de CNC de *Xenopus*.
7. La pérdida de función de Gai2 mantiene fuertemente activa a Rac1 durante la inhibición de la locomoción por contacto en la zona de colisión.
9. En ausencia de Gai2 se observa deslocalización de Par3.

Agradecimientos

Proyecto FONDECYT N° 1140394 por el financiamiento para el desarrollo de esta tesis.

Centro de Microscopía avanzada – CMA Biobío, fundamentalmente a Germán Osorio, Joanna Tereszczuk y Gustavo Cerda por toda la ayuda brindada.

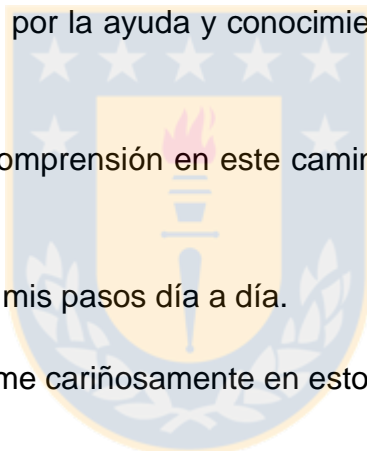
A mi tutora, Dra. Marcela Torrejón por su guía, compañía, el apoyo incondicional y la confianza puesta en mi trabajo.

A mis compañeros de trabajo del laboratorio de Señalización y Desarrollo de la Universidad de Concepción, por la ayuda y conocimientos que siempre estuvieron dispuestos a brindarme.

A mi familia por el amor y comprensión en este camino, a quienes les debo todos mis logros.

A mi abuela Sonia por guiar mis pasos día a día.

A Francisco por acompañarme cariñosamente en estos 6 años de carrera.



Referencias

Afshar K., F. S. Willard, K. Colombo, C. A. Johnston, C. R. McCudden, D., P. Siderovski, P. Gönczy. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* 119: 219–230.

Afshar K., F. S. Willard, K. Colombo, D. P. Siderovski, P. Gönczy. (2005). Cortical localization of the Galpha protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development* 132:4449–4459.

Alexandrova A.Y., Arnold K., Schaub S., Vasiliev J.M., Meister J.J., Bershadsky A.D., Verkhovsky A.B. (2008) Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS One* 3(9):e3234.

Alfandari, D., Cousin, H., & Marsden, M. (2010). Mechanism of *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Cell Adhesion & Migration*, 4(4), 553–560.

Arriagada C. (2012). Análisis de la localización subcelular de XtRic-8A y de su participación en la polarización celular en embriones de *X. tropicalis*. Tesis de Magíster, Universidad de Concepción.

Basch, L.M., García-Castro, M., Bronner-Fraser, M. (2004). Molecular Mechanisms of neural crest induction. *Birth Def Res. 72*: 109-123.

Birnbaumer L. (2007). Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: From 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *BiochimBiophysActa* 1768:772–793.

Boullaran, C., Hwang, I.-Y., Kamenyeva, O., Park, C., Harrison, K., Huang, Z., & Kehrl, J. H. (2015). B Lymphocyte-Specific Loss of Ric-8A Results in a G α Protein Deficit and Severe Humoral Immunodeficiency. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(5), 2090–2102.

Breznau E.B., Semack A.C., Higashi T., Miller A.L. (2015). MgcRacGAP restricts active RhoA at the cytokinetic furrow and both RhoA and Rac1 at cell-cell junctions in epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 26(13):2439-55.

Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., & Johnson, G. L. (1995). G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 24631–24634.

Burrige, K., Turner, C., Romerw, L. 1992. Tyrosine Phosphorylation of Paxillin and pp125 FAK Accompanies Cell Adhesion to Extracellular Matrix: A Role in Cytoskeletal Assembly. *The Journal of Cell Biology* 119(4), 893-903.

Carmona-Fontaine C., Matthews H., Kuriyama S., Moreno M., Dunn G., Parsons M., Stern C, Mayor R. (2008). Contact inhibition of locomotion *in vivo* controls neural crest directional migration. *Nature*. 456:957–961.

Carmona-Fontaine C., Theveneau E., Tzekou A., Woods M., Page K., Tada M., Parsons M., Lambris J., Mayor R. (2011). Complement fragment C3a controls mutual cell attraction during collective cell migration. *Developmental Cell*. 21:1026–1037.

Chan P., C. J. Thomas, S. R. Sprang, G. G. Tall. (2013). Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 3794–3799.

Chao WT, Kunz J. (2009). Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *FEBS Lett*. 583:1337–43

Chen H.C., Guan J.L. (1994) Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci*. 91(21):10148-52.

Chen H.C., Appeddu P.A., Parsons J.T., Hildebrand J.D., Schaller M.D., Guan J.L. (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J. Biol. Chem*. 270: 16995–16999

Chen, S., Chen, J., Shi, H., Wei, M., Castaneda-Castellanos, D. R., Bultje, R. S., Pei, X., Kriegstein, A. R., Zhang, M. and Shi, S. H. (2013). Regulation of microtubule stability and organization by mammalian Par3 in specifying neuronal polarity. *Dev. Cell.* 24, 26-40.

Chishiki, K., Kamakura, S., Yuzawa, S., Hayase, J., & Sumimoto, H. (2013). Ubiquitination of the heterotrimeric G protein α subunits Gai2 and G α_q is prevented by the guanine nucleotide exchange factor Ric-8A. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 435(3), 414–419.

Cho H., Kamenyeva O., Yung S., Gao J.L., Hwang I.Y., Park C., Murphy P.M., Neubig R.R., Kehrl J.H. (2012). The loss of RGS protein-G $\alpha(i2)$ interactions results in markedly impaired mouse neutrophil trafficking to inflammatory sites. *Mol Cell Biol.* 32(22): 4561-71

Choi C.K., Vicente-Manzanares M., Zareno J., Whitmore L.A., Mogilner A., Horwitz A.R. (2008) Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol.* 10, 1039-50

Clark E.A., Brugge J.S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 268 (5208): 233-9.

Cotton M., Claing A. (2009). G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cellular Signalling.* 21:1045–1053.

Couwenbergs C., A. C. Spilker, M. Gotta. (2004). Control of embryonic spindle positioning and Galpha activity by *C. elegans* RIC-8. *Curr. Biol.* 14: 1871–1876.

Curtis, A. S. (1964) The Mechanism of Adhesion of Cells to Glass. A Study by Interference Reflection Microscopy. *J Cell Biol.* 20, 199-215

David, N. B., Martin, C. A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., Bellaiche, Y. (2005) *Drosophila* Ric-8 regulates Gai cortical localization to promote

Gai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nature Cell Biology*. 7(11): 1083-1090.

Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2003). Cell polarity: Par6, aPKC and Cytoskeletal crosstalk. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(1), 67–72.

Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev Biol*. 29: 12.1–12.29

Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG. (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat. Cell Biol*. 7:581–90

Friedl, P. & Gilmour, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 10, 445–457 (2009).

Fuentealba, J. (2012). Participación de Ric-8A en la formación de la Cresta Neural durante el desarrollo embrionario de *Xenopus*. Tesis de Magister, Universidad de Concepción.

Fuentealba J, Toro-Tapia G, Arriagada C, Riquelme L, Beyer A, Henriquez JP, Caprile T, Mayor R, Marcellini S, Hinrichs MV, Olate J, Torrejón M. (2013). Ric-8A, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. *Dev Biol*. 378:74-82.

Fuentealba J., Toro-Tapia G., Rodriguez M., Arriagada C., Maureira A., Beyer A., Villaseca S., Leal J.I., Hinrichs M.V., Olate J., Caprile T., Torrejón M. (2016). Expression profiles of the G α subunits during *Xenopus tropicalis* embryonic development. *Gene Expr Patterns*. 22(1):15-25.

Gabay M, Pinter ME, Wright FA, Chan P, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Tall GG. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein α subunit membrane association. *Sci Signal*. 4:200

Giannone G., Dubin-Thaler B.J., Rossier O., Cai Y., Chaga O., Jiang G., Beaver W., Döbereiner H.G., Freund Y., Borisy G., Sheetz M.P. (2007). Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell*. 128, 561-75.

Gilbert S.F. (2006). *Developmental Biology*. 8th edition. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachusetts.

Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26:3122–3142.

Hall, B. K. (2008). The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *Journal of Biosciences*, 33(5), 781–793.

Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S., Dunican D., Knoblich, J. (2005). *Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nat. Cell Biol.* 7(11):1099-1105.

Hao Y., Du Q., Chen X., Zheng Z., Balsbaugh J. L., Maitra S., Shabanowitz J., Hunt D. F. and Macara I. G. (2010). Par3 Controls Spindle Pole Orientation in Epithelial Cells by aPKC-Mediated Phosphorylation of Pins at the Apical Cortex. *Curr Biol.* 20(20): 1809–1818.

Harland, R.M. “Whole Mount *In Situ Hybridization*”, Harland *Xenopus tropicalis* Site.

Heath, J. P. & Dunn, G. A. (1978). Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study. *J Cell Sci.* 29, 197-212

Herrmann H., Aebi U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:79–90

Hildebrand J.D., Schaller M.D. and Parsons J.T. (1995). Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol. Biol. Cell* 6, 637-647.

Horgan A., Lagrange M., Copenhaver P. (1994). Developmental expression of G proteins in a migratory population of embryonic neurons. *Development*. 120:729-742.

Huang N., Becker S., Boularan C., Kamenyeva O., Vural A., Hwang I., Shi S., and Kehrl J. H. (2014). Canonical and Noncanonical G-Protein Signaling Helps Coordinate Actin Dynamics To Promote Macrophage Phagocytosis of Zymosan. *Mol Cell Biol*. 34(22): 4186–4199.

Hwang, I. Y., C. Park, and J. H. Kehrl. (2007). Impaired trafficking of Gnai2+/- and Gnai2-/- T lymphocytes: implications for T cell movement within lymph nodes. *J. Immunol*. 179: 439–448.

Hwang I.Y., Park C., Harrison K., Boularan C., Galés C., Kehrl J.H. (2015). An essential role for RGS protein/Gai2 interactions in B lymphocyte-directed cell migration and trafficking. *J Immunol*. 194(5): 2128-39.

Iden S., Collard JG. (2008) Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 846-59

Itoh, R. E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N. and Matsuda, M. (2002). Activation of Rac and Cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Molecular and Cell Biology*. 22 :6582-6591.

Izzard, C. S. & Lochner, L. R. (1976) Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci*. 21, 129-59.

Jaffe AB, Hall A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21:247-269.

Kadir, S., Astin, J. W., Tahtamouni, L., Martin, P. and Nobes, C. D. (2011). Microtubule remodelling is required for the front-rear polarity switch during contact inhibition of locomotion. *J. Cell Sci.* 124, 2642-2653.

Kanesaki, T., Hirose, S., Grosshans, J., & Fuse, N. (2013) Heterotrimeric G protein signaling governs the cortical stability during apical constriction in *Drosophila* gastrulation. *Mechanisms of Development*, 130(2-3), 132–142.

Klein R.S., Rubin J.B. (2004) Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol.* (6):306-14.

Kuriyama S., Mayor R. (2008) Molecular analysis of neural crest migration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 1349–1362.

LaBonne, C. y Bronner-Fraser, M. (2000) Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev. Biol.* 221: 195–205.

Laan L., Husson J., Munteanu E.L., Kerssemakers J.W., Dogterom M. (2008) Force-generation and dynamic instability of microtubule bundles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:8920–25

Lazarides, E. & Burridge, K. (1975) Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell* 6, 289-98

Le Douarin, N., Kalcheim, C. (1999). *The Neural Crest*, Ed. Cambridge University Press Cambridge.

Leyme, A., Marivin, A., Perez-Gutierrez, L., Nguyen, L. T., & Garcia-Marcos, M. (2015). Integrins activate trimeric G proteins via the nonreceptor protein GIV/Girdin. *The Journal of Cell Biology* 210(7), 1165–1184.

Li H., Yang L., Fu H., Yan J., Wang Y., Guo H., Hao X., Xu X., Jin T. and Zhang N. (2013). Association between Gai2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis. *Nat Commun.* 4: 1706.

Lin, F., Sepich, D. S., Chen, S., Topczewski, J., Yin, C., Solnica-Krezel, L., & Hamm, H. (2005). Essential roles of Gα12/13 signaling in distinct cell behaviors driving zebrafish convergence and extension gastrulation movements. *The Journal of Cell Biology*, 169(5), 777–787.

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4th edition.

Lopez-Sanchez, I., Kalogriopoulos, N., Lo, I.-C., Kabir, F., Midde, K. K., Wang, H., & Ghosh, P. (2015). Focal adhesions are foci for tyrosine-based signal transduction via GIV/Girdin and G proteins. *Molecular Biology of the Cell* 26(24), 4313–4324.

Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., et al. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461(7260), 99–103.

Margadant C, Monsuur HN, Norman JC, Sonnenberg A. (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:607–14

Matthews, H. K., Marchant, L., Carmona-Fontaine, C., Kuriyama, S., Larraín, J., Holt, M. R., Parsons, M. and Mayor, R. (2008). Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development* 135, 1771-1780.

Mattila, P. K., Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 446-454.

Mayor R., Theveneau E. (2014) The role of the non-canonical Wnt-planar cell polarity pathway in neural crest migration 19-20.

Mayor R., Etienne-Manneville S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 17, 97–109

Mitchison, T and Cramer, LP (1996). Actin-Based Cell Motility and Cell Locomotion. *Cell*. 84 (3): pp. 371–9

Miller, K.G., Emerson, M.D., McManus, J.R., Rand, J.B. (2000). RIC-8 (synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signalling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron*. 27, 289–299.

Moore, R., Theveneau, E., Pozzi, S., Alexandre, P., Richardson, J., Merks, A., et al. (2013). Par3 controls neural crest migration by promoting microtubule catastrophe during contact inhibition of locomotion. *Development (Cambridge, England)*, 140(23), 4763–4775.

Nandadasa, S., Tao, Q., Menon, N. R., Heasman, J., & Wylie, C. (2009). N- and E-cadherins in *Xenopus* are specifically required in the neural and non-Neural ectoderm, respectively, for F-actin assembly and morphogenetic movements. *Development (Cambridge, England)*, 136(8), 1327–1338.

Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1967). Normal Table of *Xenopus laevis* (Doudin). Amsterdam: Elsevier-North Holland Publishing.

Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia. *Cell*, Vol. 81, 53-62.

Nobes, C. D. and Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* 144, 1235 -1244.

Oka Y., Saraiva L.R., Kwan Y.Y., Korsching S.I. (2009). "The fifth class of Galpha proteins". *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(5):1484-9.

Oldham W. M., Hamm H. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 39:117–166.

Orr A. W., Pallero M. A. and Murphy-Ullrich J. E. (2002) Thrombospondin Stimulates Focal Adhesion Disassembly through Gi- and Phosphoinositide 3-Kinase-dependent ERK Activation. *J Biol Chem*. 277(23):20453-60

Orr A. W, Pedraza C. E. , Pallero M. A., Elzie C. A., Goicoechea S., Strickland D. K. and Murphy-Ullrich J.E. (2003) Low density lipoprotein receptor–related protein

is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly. *J Cell Biol.* 161(6): 1179–1189.

Parri, M., & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 8(1), 23.

Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 8), 1409–1416.

Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L. and Hahn, K. M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*. 440: 1069-1072.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:639–650.

Pollard T.D., Borisy G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003;112:453–465.

Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., et al. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (New York, N. Y.)*, 302(5651), 1704–1709.

Ridley, A. J. (2015) Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology.* 36:103–112

Romo X, Pastén P, Martínez S, Soto X, Lara P, Ramírez A, Torrejón M, Montecino M, Hinrichs MV, Olate J. (2008). Ric-8 is a GEF for Gas and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Physiol.* 214:673–680.

Rottner, K., Hall, A. & Small, J. V (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Current Biology.* 9, 640-649.

Rozengurt, E. (2007). Mitogenic Signaling Pathways Induced by G Protein-Coupled Receptors. *Journal of Cellular Physiology.* 213: 589–602.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. *Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.*

Sato M, Blumer JB, Simon V, Lanier SM. (2006). Accessory proteins for G proteins: Partners in signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:151–187.

Sauka-Spengler, T. y Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 9, 557-568.

Scarpa, E., Szabó, A., Bibonne, A., Theveneau, E., Parsons, M., & Mayor, R. (2015). Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Developmental Cell*, 34(4), 421–434

Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD and Parsons JT. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J. Cell Biol.*, 130, 1181–1187

Schlaepfer D.D., Hanks S.K., Hunter T., Van der Geer P. (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* 372 (6508): 786-91.

Shpetner HS, Vallee RB. (1992). Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature.* 355:733–35

Spiering, D., & Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhesion & Migration*, 5(2), 170–180.

Steventon, B., Carmona-Fontaine, C. and Mayor, R. (2005). Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16: 647.

Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuryama S. and Mayor R. (2009). Differential requirements of BMP and Wnt signaling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development.* Vol. 136: 771-779.

Su Y., Chang Y., Lin W., Liang C. and J. Lee (2015). An aberrant nuclear localization of E-cadherin is a potent inhibitor of Wnt/ β -catenin-elicited promotion of the cancer stem cell phenotype. *Oncogenesis*. 4(6): e157.

Sugiura T., Shirasuna K., Hayashido Y., Sakai T., Matsuya T. (1996). Effects of human fibroblasts on invasiveness of oral cancer cells in vitro: isolation of a chemotactic factor from human fibroblasts. *Int J Cancer*. 68(6):774-81

Szabó, A., & Mayor, R. (2015). Cell traction in collective cell migration and morphogenesis: The chase and run mechanism. *Cell Adhesion & Migration*, 9(5), 380–383.

Szabó A., Melchionda M., Nastasi G., Woods M.L., Campo S., Perris R., Mayor R. (2016). In vivo confinement promotes collective migration of neural crest cells. *J Cell Biol*. 213(5):543-55.

Tall GG, Krumins AM, Gilman AG. (2003). Mammalian Ric-8A (Synembryn) is a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem*. 278:8356–8362.

Theveneau E., Mayor R. (2012). Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology*. 366(1):34-54.

Theveneau E., Mayor R (2011). Collective cell migration of the cephalic neural crest: The art of integrating information. *Genesis*. 49:164–176.

Theveneau E., Mayor R. (2011). Can mesenchymal cells undergo collective cell migration? *Cell Adhesion & Migration*. 5(6):490–498.

Theveneau E., Mayor R. (2010). Integrating chemotaxis and contact-inhibition during collective cell migration. Small GTPases at work. *Landes Bioscience, Small GTPases*. 2010; 1:2, 1-5.

Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., and Mayor, R. (2010). Collective chemotaxis requires contact dependent cell polarity. *Developmental Cell*. 19, 39 – 53.

Tõnissoo T, Koks S, Meier R, Raud S, Plaas M, Vasar E, Karis A. (2006). Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behav Brain Res*. 167:42–48.

Toro-Tapia G., Villaseca S., Leal J.I., Beyer A., Fuentealba J., Torrejón M. (2017). *Xenopus* as a model organism to study heterotrimeric G-protein pathway during collective cell migration of neural crest. *Genesis*. 55(1-2). Review.

Toro-Tapia G. (2016). Estudio de la función de Ric-8A y Gα13 durante la migración de las células de la cresta neural craneal en *Xenopus*. Tesis Doctoral, Universidad de Concepción.

Tucker R.P., Hagios C., Chiquet-Ehrismann R., Lawler J., Hall R.J., Erickson C.A. (1999). Thrombospondin-1 and neural crest cell migration. *Dev Dyn*. 214(4):312-22.

Vicente-Manzanares M. , Ma X., Adelstein R. S., Horwitz A. R. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10(11): 778–790

Wang H, Ng KH, Qian H, Siderovski DP, Chia W, Yu F. (2005). Ric-8 controls *Drosophila* neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol*. 7:1091–1098.

Wang, L., Guo, D., Xing, B., Zhang, J. J., Shu, H.-B., Guo, L., & Huang, X.-Y. (2011). Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A (Ric-8A) is critical for growth factor receptor-induced actin cytoskeletal reorganization. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 31055–31061.

Wang, C., Chowdhury S., Driscoll M., Parent C., Gupta S., Losert W. (2014). The interplay of cell-cell and cell-substrate adhesion in collective cell migration. *J. R. Soc. Interface.* 11, 20140684

Waterman-Storer CM, Worthylake RA, Liu BP, Burridge K, Salmon ED. (1999). Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 1:45–50

Weijer, C. J. Collective cell migration in development. *J. Cell Sci.* 122, 3215–3223 (2009).

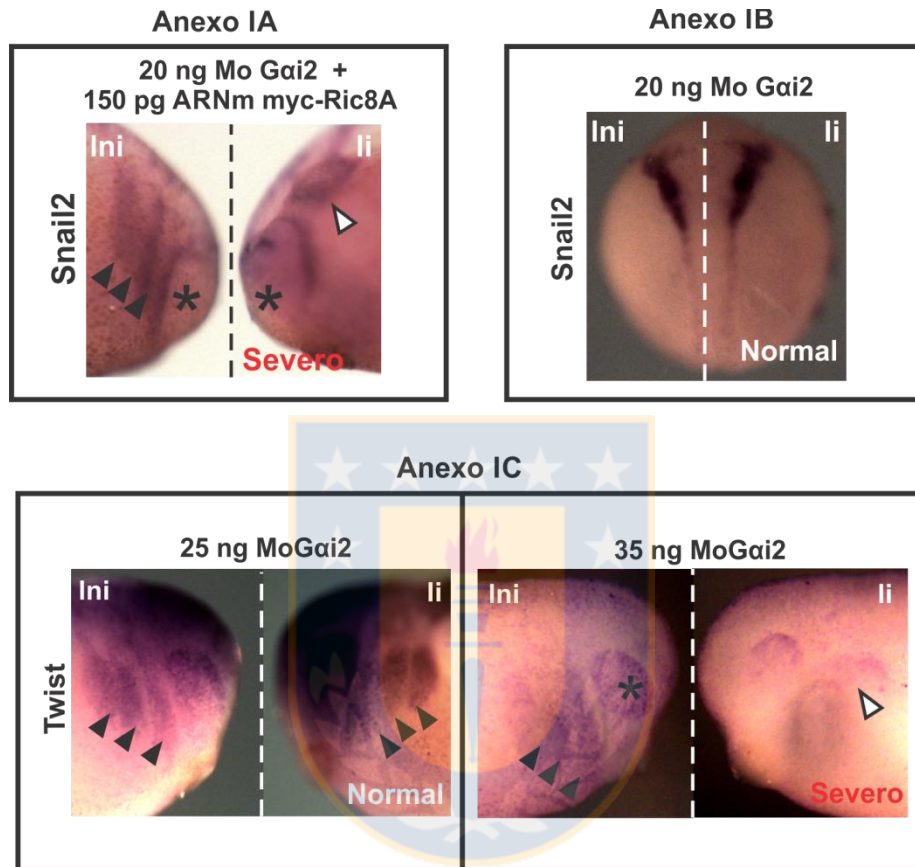
Wiese K., Le D.D., Syed S. N., Ali S., Novakovic A., Beer-Hammer S., Piekorz R.P, Schmidt R. E., Nürnberg B., Gessner J.E. (2012). Defective macrophage migration in Gai2 but not Gai3-deficient mice. *The Journal of Immunology.* 189:980-987.

Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z. & Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 116, 4605-13.

Zamir E., Geiger B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 114(Pt 20):3583-90.

Zhong M., Clarke S., Vo B.T., Khan S.A. (2012). The essential role of G α 2 in prostate cancer cell migration. *Mol Cancer Res.* 10(10): 1380-8.

Anexos



Anexo I.

(IA) Hibridación *in situ* contra Snail2 en embriones en estadio 22-23, co-inyectados con 20 ng de morfolino contra Gai2 y 150 pg de ARNm myc-Ric8A, donde se observa que fenotipo morfante no es rescatado por la sobreexpresión de Ric-8A (n = 10). **(IB)** Hibridación *in situ* contra Snail2 en embriones en estadio 16 (néurula temprana) microinyectados con 20 ng de morfolino contra Gai2, cantidad que no es capaz de afectar la inducción de las células de CNC (n = 6). **(IC)** Validación de morfolino contra Gai2 en embriones de *Xenopus laevis*, observándose que 35 ng de morfolino son suficientes para inhibir la migración de las células de CNC en este modelo (n = 21).